



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



Nanoplataforma entre complexo nitrosilo de rutênio e pontos de carbono

Bianca Soares Astolfi

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ituiutaba-MG

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Nanoplateforma entre complexo nitrosilo de rutênio e pontos de carbono

Bianca Soares Astolfi

Prof^ª. Dr^ª. Renata Galvão de Lima

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção
do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ituiutaba-MG

2020

Dedico este trabalho a pessoa que me tornei, nestes últimos quatro anos. O processo até aqui não foi nada fácil e me exigiu muito esforço. Começar um novo estilo de vida que me permitisse aproveitar o máximo e ser o melhor possível para a profissão que eu escolhi, foi uma das melhores experiências e mais complicadas da minha vida. E hoje enquanto escrevo aqui, olho para trás e sinto muito orgulho por tudo que passei até esse momento, por não ter desistido e sempre ter acreditado que iria dar tudo certo mesmo nos momentos mais difíceis. Encerro este primeiro ciclo com muita gratidão a mim e a todos que participaram comigo nessa jornada. Dedico também a uma grande amiga, que em um dos momentos mais difíceis da minha vida, disse que me via como uma ave que ainda não sabia voar, mais que escalava até chegar onde eu queria. Que desistir não combinava comigo. Tauane, você não sabe o quanto essas palavras tiveram força, para me fazerem chegar até aqui.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Renata Galvão de Lima, uma mulher forte e um grande exemplo como pesquisadora. Renata, você fez muito mais que me ajudar a dar meus primeiros passos como pesquisadora, com sua paixão e dedicação a ciência, você me inspirou a querer ser uma profissional tão apaixonada pelo meu trabalho e competente como você. A você deixo meus sinceros agradecimentos por ter me ensinado tanto.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rosana e Júlio César, e aos meus pais que a vida me deu de presente, Cássia e Bruno. Obrigada por tanto amor e mostrarem que sempre vão estar aqui por mim, acreditando no meu potencial e me dando força, até mesmo quando nem eu acreditei e pensei que não conseguiria. Se não fosse vocês nada disso seria possível, amo muito vocês.

Aos meus avós, Maria Helena e José Braz, e minha tia Adriana vocês me incentivaram não só quando decidi quais caminhos ir seguir como profissional, como também me incentivaram com amor a ser quem eu sou toda minha vida, vocês são os melhores do mundo. Amo vocês.

Ao meu namorado Bruno, que nesses anos fez parte do meu processo de amadurecimento, sua paciência, amor e companheirismo, foi essencial para que eu chegasse até aqui. Obrigada por ter sido meu porto seguro nestes 4 anos, e ter me ajudado a enxergar tantas coisas boas na minha vida. Amo muito você.

Aos meus amigos, Beatriz, Gabriel, Jaqueline, Tauane Raíssa e Wesley. Vocês se tornaram minha segunda família, agradeço muito por todo companheirismo que construímos nessa jornada. Sempre fizeram tudo parecer ser mais leve, sem dúvidas somos parte do que cada um se tornou no encerramento deste ciclo, levarei um pouco de cada um de vocês comigo. Vocês são as melhores pessoas que eu poderia ter conhecido.

Em especial agradeço a minha amiga Beatriz. Você foi essencial em todo esse processo, crescemos pessoalmente e profissionalmente juntas. Obrigada por nunca desistir de mim apesar do meu humor inconstante, você foi uma grande inspiração de persistência, e me fez ver que eu poderia ser qualquer coisa que eu quisesse. Você foi o maior alicerce na minha vida acadêmica. Amo você minha querida Bea.

Agradeço as integrantes do grupo de pesquisa em Bioinorgânica, Evelyn, Gabriela, Larissa, Luciana, Mayara, Naiara e Rafaela. A conquista de uma é de todas nós! Em especial deixo meus sinceros agradecimentos a Naiara, por toda sua paciência e cuidado com todas nós, sempre disposta a ajudar sem hesitar, o mundo precisa de mais pessoas como você.

Aos professores da Ciências Biológicas, que cada um em sua área, contribuíram para que eu tivesse certeza e meu amor só aumentasse por ter escolhida ser uma profissional bióloga. Vocês foram minhas grandes inspirações para a carreira que pretendo construir!

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro.

Este trabalho foi redigido no formato de artigo científico, em português, respeitando as normas da revista *Bioscience Journal* as quais podem ser acessadas no endereço eletrônico: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/about/submissions>

RESUMO

Os pontos de carbono (PCs) são partículas semicondutoras em nanoescala. A característica mais explorada deste tipo de nanomaterial são suas propriedades de emissão de luz, além de possuírem baixa toxicidade possibilitando sua aplicação como marcadores celulares biocompatíveis. A sua elevada solubilidade em meio aquoso lhe confere a oportunidade de aplicação em meio fisiológico. Destacam-se também, seu potencial foco de pesquisas como nanoplataforma em sistemas de bioimagem, para estudos de acompanhamento e perfil de liberação de fármacos. Assim sendo, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de metodologia de preparação de PCs através do processo hidrotérmico tendo como matéria prima, gelatina bovina comercial. Além disso, o trabalho descreve através de métodos espectroscópicos a interação de PCs e complexo de rutênio doador de óxido nítrico, do tipo $[Ru^{II}(NH.NHq-COOH)(tpy)(NO)](PF_6)_3$ (RuBDQ). Os resultados que acercam a síntese e caracterização dos PCs, demonstraram que em solução aquosa, exibem emissão máxima na região de 400 nm em pH=7. A suspensão aquosa de PCs permanece estável até 30 dias a 5°C. Os perfis de emissão de fluorescência apresentam dependência com comprimento de onda de excitação, sendo neste trabalho demonstrado maior intensidade de fluorescência quando excitado em 320 nm. O rendimento quântico de fluorescência indicou correlação com a temperatura, ocasionando um decaimento da intensidade de fluorescência com o aumento da temperatura. A microscopia de força atômica, indicou que os PCs possuem cerca de 10 nm de diâmetro em tamanho de partícula. O potencial zeta demonstrou uma carga negativa de -21mV para os PCs, o que confere a eles a possibilidade de interação com complexos carregados positivamente. O mecanismo de interação entre PCs e o complexo RuBDQ, podem ser dinâmicos ou estáticos, dependendo das condições de temperatura. Os parâmetros termodinâmicos demonstraram que a interação entre as duas espécies se trata de uma interação eletrostática.

Palavras-chave: Pontos de Carbono, Complexo Nitrosilo de Rutênio, Nanoplataforma.

ABSTRACT

Carbon dots (CDs) are particles nanoscale semiconductors. The more explored feature of this type of nanomaterial is its light emission properties, besides to having low toxicity, allowing its application as biocompatible cellular markers. Its high solubility in aqueous medium gives the opportunity to be applied in physiological medium. Also noteworthy is its potential research focus as a nanoplatform in bioimaging systems, for follow-up studies and drug release profiles. Therefore, this work objectives to develop a methodology for preparing CDs through the hydrothermal process, using commercial bovine gelatine as the raw material. In addition, the work describes methods of spectroscopy and interaction of CDs and nitrosyl ruthenium complex as nitric oxide donor, of the type $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH.NHq-COOH})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (RuBDQ). The results that obtained the demonstration and characterization of CDs, demonstrated that the aqueous solution, exhibited the maximum emission in the region of 400 nm at pH = 7. The aqueous suspension of the CDs stays stable until 30 days at 5°C. The fluorescence emission profiles are dependent on the excitation wavelength, and this work demonstrated a higher fluorescence intensity when excited at 320 nm. The quantum fluorescence yield indicates a correlation with temperature, causing a decrease in fluorescence intensity with an increase in temperature. An atomic force microscopy indicates that CDs are about 10 nm in diameter in particle size. The zeta potential demonstrated a negative charge of -21mV for CDs, or gives them the possibility of interacting with positively charged complexes. The interaction mechanism between CDs and the RuBDQ complex, can be dynamic or static, depending on the temperature conditions. The thermodynamic parameters demonstrated that the interaction between the two species is an electrostatic interaction.

Keywords: Carbon Dots, Ruthenium Nitrosyl Complex, Nanoplatform.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação da estrutura dos pontos de carbono, demonstrando sua constituição principal de carbonos e outros grupos funcionais (DEMCHENKO, 2013).....	2
Figura 2. Representação das transições eletrônicas envolvidas nos fenômenos de fluorescência (a) e fosforescência (b). (Fonte: BONTURIM, 2017)	3
Figura 3. Esquema da obtenção de pontos de carbono dentro das abordagens Top-Down e Bottom-Up (HABIBA, 2014).	5
Figura 4. Estrutura química do complexo $[Ru^{II}(NH.NHq-COOH)(tpy)NO]^{3+}$	7
Figura 5. Esquema da metodologia de preparação dos pontos de carbono de gelatina	8
Figura 6. Rota de síntese para o complexo $[Ru^{II}(NH.NHq-COOH)(tpy)(NO)](PF_6)_3$	9
Figura 7. Resultado da síntese dos PCs, a esquerda a solução sobre a luz branca e a direita fluorescência emitida quando exposta a luz UV.....	11
Figura 8. Suspensão de pontos de carbono após a passagem em diferentes tempos de irradiação no micro-ondas, $\lambda_{exc} = 320$ nm. Janelas de excitação e emissão 5 e 10 nm. 2,5 minutos (-); 8 minutos (-); 10 minutos (-); Gelatina (-).....	12
Figura 9. Espectros de emissão de fluorescência em diferentes comprimentos de onda de excitação para PCs. Janelas de excitação e emissão 10 e 5 nm. $\lambda_{exc} = 300nm$ (-); $320nm$ (-); $340nm$ (-); $360nm$ (-); $380nm$ (-); $400nm$ (-).....	13
Figura 10. Espectro eletrônico na região do UV-visível da suspensão aquosa de PCs de gelatina em $pH=7,0$	13
Figura 11. Espectros vibracionais na região do infravermelho para os PCs.....	14
Figura 12. Espectros de emissão de fluorescência de PCs acondicionados em refrigeração (≈ 5 °C). $\lambda_{exc} = 320$ nm, janelas de excitação e emissão 5 e 10nm. Após 8 minutos de preparo (-); 24 horas em diálise (-); 7 dias refrigerado (-); 25 dias refrigerado (-).	14
Figura 13. Espectro de emissão de fluorescência de PCs em diferentes valores de pH sob excitação em $320nm$ (janela de excitação 5 e emissão 10). $pH=7$ (-); NaOH (-); HCl (-).	15
Figura 14. Espectros de emissão de fluorescência de PCs sobre variação de temperatura. $\lambda_{exc} = 320$ nm, janelas de excitação e emissão 5 e 10 nm. $15^{\circ}C$ (-); $20^{\circ}C$ (-); $25^{\circ}C$ (-); $37^{\circ}C$ (-).....	16

Figura 15. Representação ilustrativa dos PCs, com bandas duplas de fluorescência, atribuídas ao core e seus grupos de carbono, e a emissão do estado da superfície. (Fonte: TANG, 2012)	18
Figura 16. Espectro de fluorescência dos PCs variando a temperatura, sobre o tratamento matemático de deconvolução Gaussiana. $\lambda_{exc}= 320$ nm, janelas de excitação e emissão 5 e 10 nm.	19
Figura 17. Distribuição do potencial zeta dos PCs em suspensão aquosa.	19
Figura 18. Estrutura química da gelatina apresentando seus respectivos resíduos de aminoácidos. (Fonte: Modificado de (LI & CHEN, 2011).....	20
Figura 19. Imagem obtida sobre resolução da microscopia de força atômica, e sua imagem topográfica.	20
Figura 20. Espectros de supressão de fluorescência para os PCS em presença do complexo RuBDQ variando a temperatura em 20, 25 e 35°C. $\lambda_{exc}= 320$ nm. Janelas de excitação/emissão 5 e 10nm. [RuBDQ]= 0 -72,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 0 (—); 0,99 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—); 2,66 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—); 4,98 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—); 8,26 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—); 13,20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—); 19,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—); 27,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—); 36,90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—); 47,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—); 59,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—).	22
Figura 21. Representação ilustrativa dos possíveis mecanismos de interação entre os Pcs (fluoróforo) e complexo RuBDQ (supressor), sendo (a) mecanismo estático e (b) mecanismo dinâmico. .	23
Figura 22. Gráfico de Stern-Volmer acerca das interações entre PCs e RuBDQ. $\lambda_{exc}= 320\text{nm}$. Janelas de excitação e emissão 5 e 10nm.....	24
Figura 23. Gráfico para equação modificada de Stern-Volmer acerca das interações entre PCs e complexo RuBDQ. $\lambda_{exc}= 320\text{nm}$. Janelas de excitação e emissão 5 e 10nm.....	24
Figura 24. Gráfico de log em função da concentração do complexo RuBDQ. $\lambda_{exc}= 320\text{nm}$. Janelas de excitação e emissão 5 e 10nm.....	26
Figura 25. Gráfico de Van't Hoff para o complexo PCs/RuBDQ.....	28
Figura 26. Gráfico para o modelo multi sítios acerca a interação do complexo PCs/RuBDQ.	29
Figura 27. Gráfico para o modelo mono sítios acerca a interação do complexo PCs/RuBDQ.	29
Figura 22. Representação ilustrativa da proposta de interação entre os grupos carboxilatos dos pontos de carbono e o ligante nitrosil (NO^+), do complexo RuBDQ.	31
Figura 29. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo RuBDQ.....	31

Figura 30. Espectros vibracionais na região do infravermelho para os PCs (-) e complexo RuBDQ (-).

..... 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de Φ_F para PCs em pH=7,0 em diferentes temperaturas	16
Tabela 2. Valores obtidos através da média aritmética $\pm$ desvio padrão para o tempo de vida de fluorescência em diferentes temperaturas.....	17
Tabela 3. Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) em diferentes temperaturas para os PCs em presença do complexo RuBDQ.	24
Tabela 4. Tempo de vida de fluorescência dos PCs em função da concentração do complexo RuBDQ.	26
Tabela 5. Valores obtidos para a constante de associação (K_a) e os parâmetros termodinâmicos do complexo PCs/RuBDQ.....	27
Tabela 6. Parâmetros termodinâmicos obtidos através do tratamento matemático de Langmuir para o complexo PCs/RuBDQ.....	30

LISTA DE SÍMBOLOS

λ	Comprimento de onda
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{exc}	Comprimento de onda de excitação
ϕ	Rendimento quântico de fluorescência
τ_F	Tempo de vida de fluorescência
$\tau_{médio}$	Tempo de vida de fluorescência médio
τ_0	Tempo de vida de fluorescência médio da biomolécula em ausência do supressor
K_a	Constante de associação
K_{SV}	Constante de Stern-Volmer
k_q	Constante de velocidade bimolecular de supressão
Δ	Delta
F_0	Intensidade de fluorescência da biomolécula em ausência do supressor
F	Intensidade de fluorescência da biomolécula em presença do supressor
R	Constante dos gases
Pl_{sat}	Valor da intensidade de fluorescência
Pl_{ref}	Valor da intensidade de fluorescência do ponto quântico na ausência do supressor
Pl_x	Valores de intensidade de fluorescência do ponto quântico a depender da concentração do supressor
$[S]$	Concentração de supressor
θ	Teta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Nanotecnologia e Nanomateriais.....	1
1.2. Pontos de Carbono (Carbon dots).....	1
1.2.1. Fotoluminescência.....	3
1.2.2. Síntese e precursores	4
1.3. Aplicabilidade de Pontos de Carbono.....	5
2. OBJETIVOS.....	7
2.1. Objetivo geral.....	7
2.2. Objetivos específicos.....	7
3. METODOLOGIA.....	7
3.1. Síntese dos pontos de carbono (PCs).....	8
3.2. Caracterização dos pontos de carbono.....	9
3.2.1. Espectroscopia de Fluorescência	9
3.2.3. Rendimento quântico de fluorescência.....	9
3.2.4. Potencial Zeta	10
3.2.5. Tempo de vida de Fluorescência	10
3.2.6. Microscopia de força atômica (MFA)	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	11
4.1. Síntese dos pontos de carbono.....	11
4.1.2 Efeito do tempo de irradiação em micro-ondas sobre a intensidade de fluorescência.	12
4.1.3 Perfil Espectral de Fluorescência	12
4.1.4. Perfil espectral na região do UV-visível e infravermelho.	13
4.1.5. Estabilidade térmica e pH dos pontos de carbono.....	14
4.1.6. Determinação do rendimento quântico de fluorescência.....	16
4.1.7. Tempo de vida de fluorescência	17
4.1.8. Determinação do potencial zeta.....	19
4.1.9. Microscopia de força atômica.....	20
4.2. Avaliação do perfil de interação entre PCs e Complexo Nitrosilo de Rutênio.....	21
.....	21
4.2.1. Mecanismos de supressão de fluorescência.....	22

4.2.2. Determinação dos parâmetros termodinâmicos.....	27
5. CONCLUSÕES.....	32
6. REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

1.1. Nanotecnologia e Nanomateriais

A Nanotecnologia é um campo multidisciplinar, que se baseia no princípio que os átomos de um material podem passar por reorganizações, afim de obter um material com novas propriedades (MAZZEO & SANTOS, 2018), e desta forma os nanomateriais passam a ter suas propriedades físicas alteradas quando comparados a sistemas maiores, e suas novas propriedades diferente de sua macroestrutura ostentam propriedades ópticas, electrónicas, físicas e químicas (MIRANDA, 2014), passando a serem vantajosos em diferentes cenários de aplicações.

Neste contexto, a nanotecnologia visa manipular materiais em escala nanométrica com dimensões entre 1 e 100 nm, e integra-los para originar produtos (FERREIRA & RANGEL, 2009; MAZZEO & SANTOS, 2018). Na escala nanométrica, os materiais podem exibir diferentes propriedades físicas e químicas, que são determinadas pelo efeito de confinamento quântico e de sua área superficial ao depender também do tipo de síntese e material a ser utilizado (MORAES, 2016). As dimensões e as propriedades desses materiais vêm trazendo altas expectativas de que nanotecnologia a curto e a longo prazo, pode melhorar processos e produtos existentes e até mesmo revolucionar sistemas, causando importantes impactos como, revolucionar tratamentos na medicina, aumentando das velocidades das reações através do uso de nanocatalisadores, entre outros, que tornam promissores o uso deste tipo de material (HELLAND & KASTENHOLZ, 2007; FERREIRA & RANGEL, 2009).

Com isso, as propriedades dos nanomateriais vem ganhando destaque em diversas áreas do conhecimento, assim como na medicina, no qual o desenvolvimento de nanopartículas tem um potencial avaliado como promissor em sistemas de tratamento e diagnostico para inúmeras doenças. Pesquisas sobre a inclusão da nanotecnologia na medicina, deve-se a características de alguns nanomateriais que apresentam, alta absorção, bioavaliabilidade e propriedades ópticas (MACHADO, *et al*, 2015).

Assim, sua aplicabilidade pode desempenhar um papel crucial como novas perspectivas tecnológicas para estudos de doenças a nível celular, pois vem sendo utilizados como biomarcadores celulares *in-vitro* para diagnóstico, na monitorização da eficiência terapêutica de fármacos ativos e em sistemas de liberação de fármacos (SANTOS, *et al*, 2014).

Nesta perspectiva, nanomateriais a base de carbono, é uma classe de nanomateriais que desde sua descoberta acidental em 2004, como subproduto da purificação de nanotubos de carbono, vem atraindo pesquisas sobre a elucidação das propriedades únicas que viabilizam sua aplicação em sistemas biológicos aplicados a área médica.

1.2. Pontos de Carbono ("Carbon dots")

Os pontos de carbono (PCs) ou carbon dots são definidos como partículas esféricas semicondutoras de tamanho aproximado de 10 nm, no qual sua estrutura baseia-se principalmente em carbonos (figura 1). Além da constituição principal de carbonos, em sua estrutura também se encontra heteroátomos que podem

interferir em propriedades como a fluorescência, e conferir aos mesmos funcionalidades adicionais (SAGBAS & SAHINER, 2019).

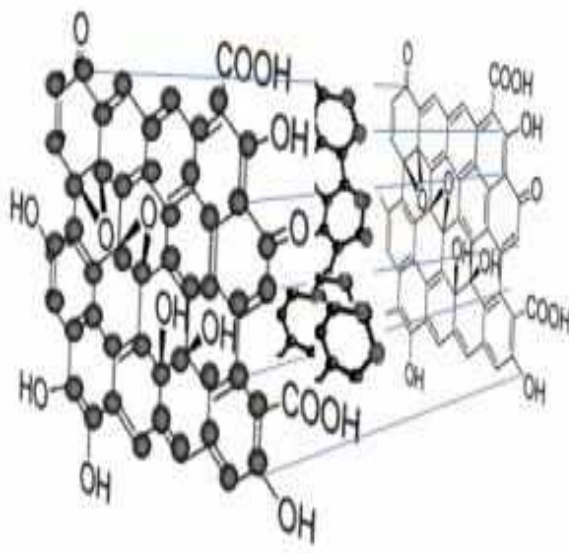


Figura 1. Representação da estrutura dos pontos de carbono, demonstrando sua constituição principal de carbonos e outros grupos funcionais (DEMCHENKO, *et al*, 2013).

Os PCs podem ser obtidos a partir da quebra de materiais como polímeros biológicos e grafite. Ademais, os métodos de síntese costumam ser simples e seus precursores podem advir de matérias-primas abundantes em natureza, que os colocam dentro da perspectiva sustentável da nanotecnologia verde (MORAES, 2016).

Conforme descrito por Ng (2018), suas principais propriedades de interesse são sua fotoluminescência ajustável com alto rendimento quântico e biocompatibilidade, demonstrando características ópticas similares aos pontos quânticos semicondutores. Entretanto, sua estrutura de carbonos os torna mais vantajosos em relação aos pontos quânticos, por acusar baixa toxicidade, alta solubilidade, ampla faixa espectral dependendo de seu precursor e rota sintética. Dentro desta abordagem Sagbas & Sahiner, (2019), afirmam que os pontos de carbono fluorescentes podem ser um substituto para metais tóxicos apresentados pelos pontos quânticos.

A fotoluminescência é a propriedade dos PCs que possui maior destaque, o controle da emissão de luz permite sua aplicação em diversas áreas. Entretanto até pouco tempo, materiais a base carbono eram considerados como um material preto com baixa solubilidade e pouca fluorescência (LI, *et al*, 2012). Com isso, devido à recente descoberta da fotoluminescência destes nanomateriais, os processos envolvidos em sua fluorescência ainda não foram elucidados de forma completa, sugerindo-se que as propriedades de fotoluminescência dos PCs possam ser atribuídas ao efeito de confinamento quântico devido aos tamanhos nanométricos das partículas e pelos grupos funcionais distribuídos em sua superfície (MOREIRA, 2017).

Entre suas aplicabilidades, exibem potencial abrangentes nas áreas de bioimagem, administração de medicamentos, biossensor, detecção de doenças (NASROLLAHZADEH, *et al*, 2019), além disso, suas propriedades eletrônicas também permitem aplicações em viabilizam seu emprego nas áreas de catálise, optoeletrônica e sensores (MORAES, 2016).

1.2.1. Fotoluminescência

A detecção baseada em fluorescência recebeu muita atenção em últimos anos devido aos benefícios ofertados, atraindo a projeção de vários materiais fluorescentes, como corantes orgânicos, quantum dots, estruturas metal-orgânicas, proteínas fluorescentes, entretanto o uso desses materiais não os deixa isentos de problemas como sua toxicidade conhecida e o perigo ambiental potencial associados a muitos desses materiais podem representar graves limitações (SUN, *et al*, 2006). Com isso, os pontos de carbono por suas características notáveis como, luminescência ajustável e não citotoxicidade, tem demonstrado vantagens diante aos demais materiais (DAS; BANDYOPADHYAY; PRAMANICK, 2018).

Os métodos de fluorescência e fosforescência, também denominados métodos luminescentes, são baseados na excitação de uma molécula, via absorção de fótons, a qual é promovida, do estado fundamental para o estado excitado. Quando tal molécula retorna, do estado excitado para o estado fundamental, há a emissão de radiação eletromagnética na região do visível, sendo esta compreendida entre 400 e 700 nm. No entanto, é importante ressaltar que a excitação de uma molécula via absorção de fótons em fluorescência e fosforescência resultará em transições eletrônicas distintas (LAKOWICZ, 2006)

Na fluorescência, a primeira etapa consiste, os elétrons são promovidos de um estado fundamental singlete, para um estado excitado singlete ($S_0 \rightarrow S_1$), conforme apresentado na Figura 2. Assim, não há a mudança do número quântico de spin dos elétrons. Então, os mesmos retornam, do estado excitado S_1 para um dos níveis vibracionais do estado fundamental S_0 ($S_1 \rightarrow S_0$). Portanto, a fluorescência exibe tempos de vida extremamente curtos, da ordem de 10^{-9} a 10^{-6} s (LAKOWICZ, 2006)

Na fosforescência, os elétrons são do estado excitado singlete, são transferidos para um estado excitado tripleto ($S_n \rightarrow T_1$), com mudança do número quântico de spin dos elétrons. Então, os mesmos retornam, do estado excitado T_1 para um dos níveis vibracionais do estado fundamental S_0 . Portanto, a fosforescência exibe tempos de vida mais longos, se comparados àqueles para a fluorescência, da ordem de 10^{-4} a 10 s (LAKOWICZ, 2006)

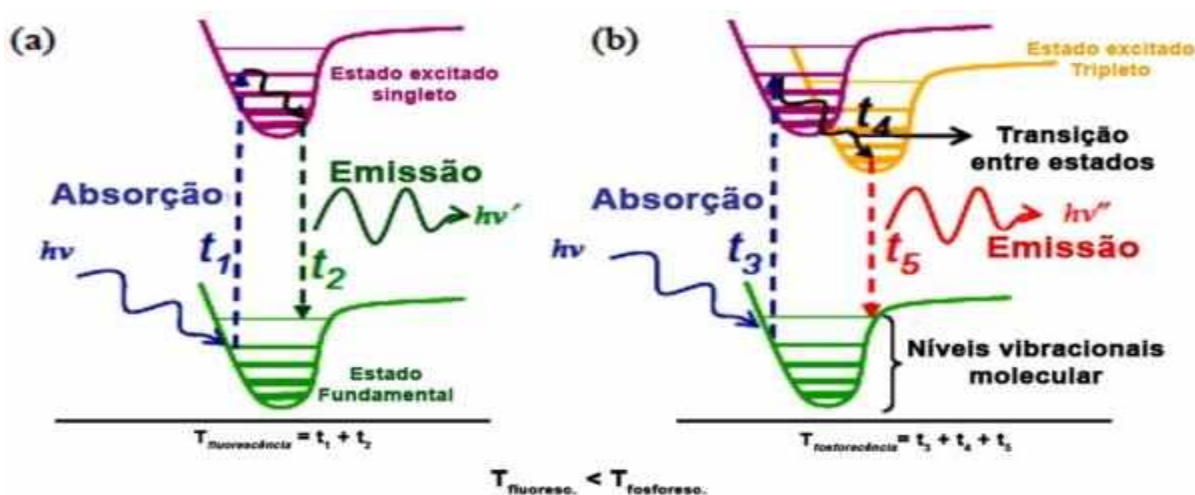


Figura 2. Representação das transições eletrônicas envolvidas nos fenômenos de fluorescência (a) e fosforescência (b). (Fonte: BONTURIM, 2017)

O mecanismo dos PCs, pelo qual ocorre a emissão de fluorescência ainda não está completamente elucidado, acreditando que a fluorescência pode ser dependente de seu tamanho dos PCs, grupos superficiais, comprimento de onda de excitação e defeitos de superfície (SOUZA, 2017).

O tamanho da partícula é um dos mecanismos envolvidos na emissão de fluorescência, pois o tamanho é essencial no ajuste das propriedades dos PCs. O tamanho nos PCs, leva ao efeito de confinamento quântico, que é o aprisionamento de elétrons que leva a estados de energia que influenciam diretamente no comprimento de onda. Além do tamanho nanométrico, os grupos funcionais exercem efeito sobre a emissão de fluorescência. As aminas e carboxilas expostas na superfície dos PCs, podem gerar defeitos, estabelecendo ligação entre os defeitos e a dependência do comprimento de onda de excitação na luminescência (VAZ, *et al.* 2015). A presença de defeitos na superfície altera o mecanismo de luminescência, e sob essa condição, a luminescência pode ser melhorada aumentando a concentração em relação aos defeitos, pois essa concentração resulta em diferentes níveis de emissão gerando aumento nas bandas. (SILVA, *et al.*, 2011; SOUZA 2017).

1.2.2. Síntese e precursores

Como apresentando anteriormente, as potencialidades dos PCs estão relacionadas com suas propriedades e as numerosas metodologias que costumam ser simples com abundantes precursores a serem utilizados. A respeito da abordagem sintética, Habiba, *et al.*, (2014) aponta que é necessário o entendimento da metodologia de escolha para fabricar novas estruturas. Ao depender da metodologia empregada pode-se controlar estruturas de interesse, tais como tamanho da partícula e as propriedades do material.

Em seu trabalho Moreira (2017), explica que os variados métodos de síntese, estão empregados dentro de duas abordagens: Top-down e Bottom-up (Figura 3), a primeira abordagem refere-se a decomposição de moléculas maiores de carbono, com a aplicação de uma fonte de energia até atingirem a escala nanométrica, e a segunda origina os PCs através de uma reorganização atômica por reações químicas, de uma forma mais concentrada.

Dentro das abordagens citadas, existem métodos que possuem muitas vantagens elucidadas, entretanto eles podem envolver etapas de tratamento para melhorar as propriedades dos PCs obtidos, tornando o processo de obtenção mais extenso. Com isso tem-se levantado à busca por métodos que pontos de carbono que são passivados em uma única etapa, o método de hidrotérmico através do uso do micro-ondas, tem-se mostrado eficaz pelo baixo custo e facilidade de manipulação (MORAES, 2016; LIMA, 2018). O micro-ondas ainda proporciona rápido tratamento térmico, permitindo a formação de materiais com diferentes morfologias, em baixas temperaturas e em curtos períodos (SOUZA, 2016).

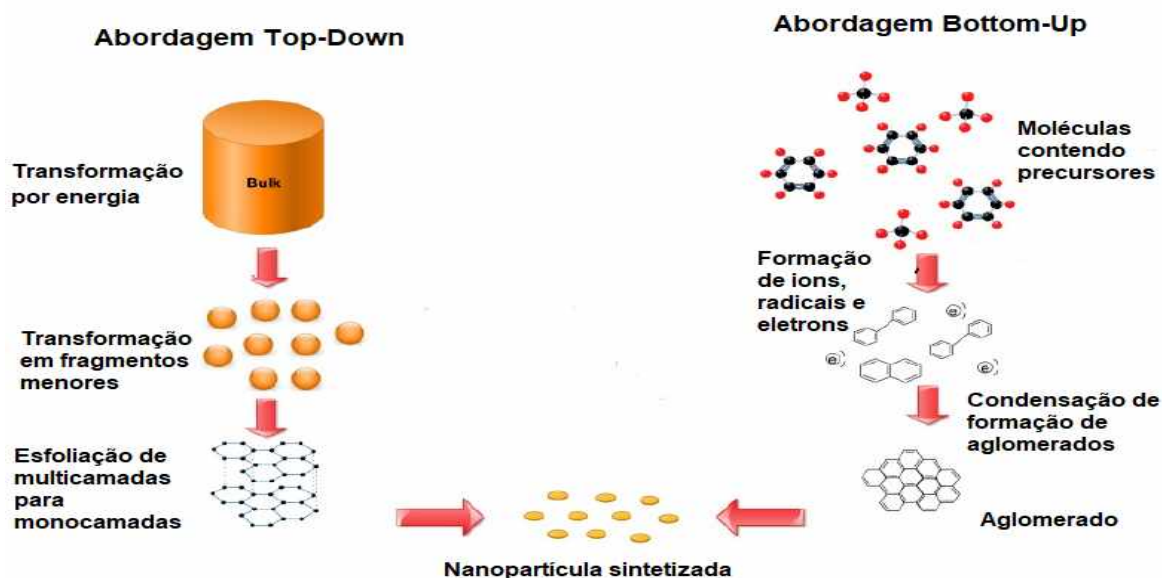


Figura 3. Esquema da obtenção de pontos de carbono dentro das abordagens Top-Down e Bottom-Up (HABIBA, *et al*, 2014).

Os pontos de carbono podem ser obtidos a partir de matéria orgânica e de resíduos produtos naturais pelo método hidrotérmico ou por queima simples, em sua síntese, as partículas obtidas podem incorporar hidroxilas, grupos carbonila e carboxila que ficam expostos na superfície da nanoestrutura formada (DEMCHENKO, *et al*, 2013), que como mencionado anteriormente, influenciam de forma direta nas propriedades dos PCs formados. Os nanomateriais sintéticos também são amplamente aplicados, porém suas fontes não renováveis costumam ter alto custo e em sua produção pode ser criado subprodutos ambientalmente agressivos (NASROLLAHZADEH, *et al*, 2019). Com isso tem-se empregado cada vez mais no método hidrotérmico, precursores naturais constituídos, sobretudo, por proteínas e carboidratos, algumas fontes naturais já utilizadas na produção de PCs, e foram relatadas em literatura como mel, suco e casca de frutas, leite de soja, gelatina e gramíneas (MORAES, 2016).

Como exemplo, Nasrollahzadeh, *et al*, (2019) em seu trabalho relata o uso de suco de banana para obtenção dos PCs, que após o aquecimento do suco via micro-ondas sem o uso de qualquer outro agente, foi possível obter PCs com alto rendimento quântico de fluorescência e luminosidade dependente do pH.

Outra fonte de obtenção dos PCs, que se tem demonstrado promissora para esse tipo de aplicação e que foi utilizada neste trabalho, é a gelatina obtida a partir do colágeno, possuindo características como, biocompatibilidade em meios fisiológicos, e solubilidade além de ser uma fonte com baixo custo benéfico.

1.3. Aplicabilidade de Pontos de Carbono

Os pontos de carbono apresentam vários fatores biológicos, físicos e químicos atraentes, no qual diferentes estudos realizados, relataram sua baixa citotoxicidade em diferentes linhas celulares, e biocompatibilidade *in vivo* (D'AMORA & GIORDANI, 2018).

Acredita-se que os PCs são internalizados pela célula via endocitose, ou seja, neste processo os PCs devem ser englobados por invaginações da membrana extracelular, e através da vesícula formada passam para o meio intracelular ficando concentrados preferencialmente no citoplasma (MIRANDA, 2014). Dentro desta abordagem, estes estudos que apontam sua biodistribuição e baixa citotoxicidade, atrai a perspectiva que técnicas de fluorescência utilizando dos PCs podem ser direcionadas a terapia e diagnostico em células cancerígenas.

Com isso, suas características mencionadas anteriormente, demonstram-se promissoras atraindo sua aplicação em bioimagem. Miranda (2014) em seu estudo, pontua que por mais que recente e ainda escassas pesquisas visam sua aplicação biológica, sua internalização em sistemas *in vivo* e *in vitro* já foram demonstradas.

Silva e colaboradores (2011), apresentam um trabalho no qual foram aplicados PCs em *Escherichia coli*, que serviu como marcador da célula ATCC 25922, marcando a captação celular e observados sobre microscopia de fluorescência, de forma a demonstrar a possibilidade de aplicação até mesmo em células procariontes.

D'Amora e Giordani (2018), levantam a aplicação *in vivo* de PCs em zebra fish, sabendo que este vertebrado é introduzido como modelo de estudo de diversas patologias, neste trabalho foi avaliado uma boa biodistribuição através de técnicas de microscopia.

O biossensoriamento é outro tipo de aplicação dos pontos de carbono que vem se destacando. Este tipo de função compreende sensores ópticos que realizam uma detecção através da interação da luz com os receptores sensores antes e depois de expor a eles ao analito de interesse, que se presente na amostra altera o comprimento de onda (NG, 2018). Os parâmetros de sua aplicação, podem ser detectados da alteração do pH do meio, presença de biomoléculas e sais inorgânicos (MIRANDA, 2014). O grande interesse de sua aplicação se dá devido ao seu tamanho, torna-se possível o diagnostico a nível celular acontecendo em tempo real através de biomoléculas produzidas e prever anormalidades do sistema biológico através dos perfis químicos emitidos pelos PCs (NG, 2018).

Os pontos de carbono também demonstram potencial para serem aplicados em sistemas de liberação de fármacos, e no monitoramento do efeito e distribuição de drogas. Resultados de pesquisas fazendo uso dos PCs aplicados a uma função teranóstica, indicaram que sua boa biocompatibilidade com os efeitos de bioimagem, auxiliam o processo de distribuição do fármaco indicando região e via de ação, monitorando sua fluidez, além de ajudar na personalização de dosagem do medicamento (RAY & JANE, 2017).

Neste contexto sobre a aplicação dos PCs em sistemas de bioimagem, Xiang e colaboradores (2016), constatou o desenvolvimento de uma nanoplataforma, composta por complexo nitrosilo de rutênio, como liberadores exógenos de óxido nítrico (NO), integrados a pontos de carbono. A nanoplataforma sobre o tratamento fotocontrolado, quando irradiados usando um laser demonstrou boas condições de liberação de NO, simultaneamente os PCs, permitiram que todo o processo de internalização e distribuição, fosse passível de rastreamento a nível celular. Além disso, a nanoplataforma apresentou alta citotoxicidade para células cancerígenas. Concluindo então que o uso desta nanoplataforma possibilita o efeito terapêutico da entrega de NO e seletividade de células-alvo, e imagiologia celular mediada por PCs, em um único sistema.

O uso dos pontos de carbono integrados a esse tipo de sistema, ainda é passível de muitos estudos que demonstrem seus mecanismos de interação entre fluorescência dos pontos de carbono e fármacos em potencial, e sua internalização por sistemas biológicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia de síntese de pontos de carbono fluorescentes, via irradiação micro-ondas, tendo a gelatina bovina tipo B como precursor. Além disso, realizar o estudo de interação dos pontos de carbono com o complexo nitrosilo de rutênio (Figura 4) do tipo $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH.NHq-COOH})(\text{tpy})\text{NO}]^{3+}$ (RuBDQ).

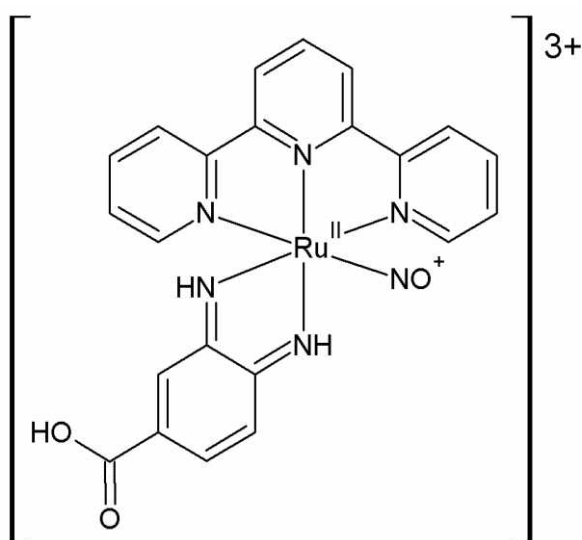


Figura 4. Estrutura química do complexo $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH.NHq-COOH})(\text{tpy})\text{NO}]^{3+}$

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver uma metodologia de síntese reprodutível dos pontos de carbono a partir da gelatina bovina tipo B via irradiação micro-ondas.
- Realizar a caracterização espectroscópica dos pontos de carbono a partir de técnicas de emissão de fluorescência e infravermelho.
- Realizar a caracterização estrutural dos pontos de carbono a partir das técnicas de potencial zeta, microscopia de força atômica.
- Avaliação do mecanismo de interação dos pontos de carbono e complexo de nitrosilo de rutênio do tipo $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH.NHq-COOH})(\text{tpy})\text{NO}]^{3+}$ (RuBDQ).

3. METODOLOGIA

Antes do início dos experimentos, a vidraria a ser utilizada foi devidamente lavada com água destilada e etanol. O procedimento na lavagem criteriosa é essencial para evitar contaminações. Este rigor é importante,

pois qualquer impureza presente no meio pode servir como sítio de nucleação e promover a agregação das nanopartículas em suspensão (VAZ, *et al.* 2015).

3.1. Síntese dos pontos de carbono (PCs)

A metodologia de preparação baseia-se em um método hidrotermal, para obtenção dos pontos de carbono (Figura 5). A princípio, foi preparada uma suspensão de 0,20 g de gelatina do tipo B (Farmácia Homegarvil-Ituiutaba/MG) em 20ml de uma solução etanólica 50% NaOH 1 mol/L. A suspensão de gelatina foi irradiada em micro-ondas doméstico (Midea 700 W) por 8 minutos (em intervalos de 10 segundos) e durante esse período a solução fora ressuspensa com a solução etanólica 50% NaOH. A solução de pontos de carbono foi então submetida a diálise por um período de 48 horas, a fim de se obter uma solução neutra com pH em torno de 7.

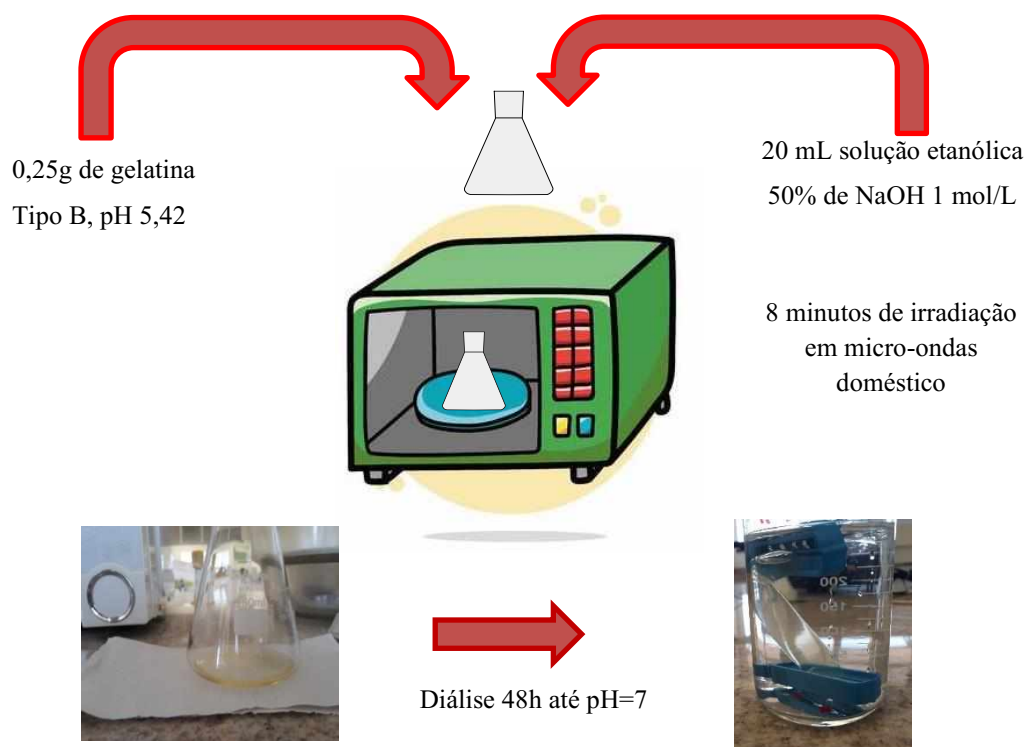


Figura 5. Esquema da metodologia de preparação dos pontos de carbono de gelatina.

3.2. Síntese do complexo nitrosilo de rutênio

O complexo $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_2\text{NHq-COOH})(\text{tpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ (RuBDQ) – onde tpy = 2,2':6',2''-terpiridina; $\text{NH}_2\text{NHq-COOH}$ =ácido 3,4-diaminobenzóico (Figura 6), foi sintetizado conforme descrito por de LIMA e colaboradores (2006).

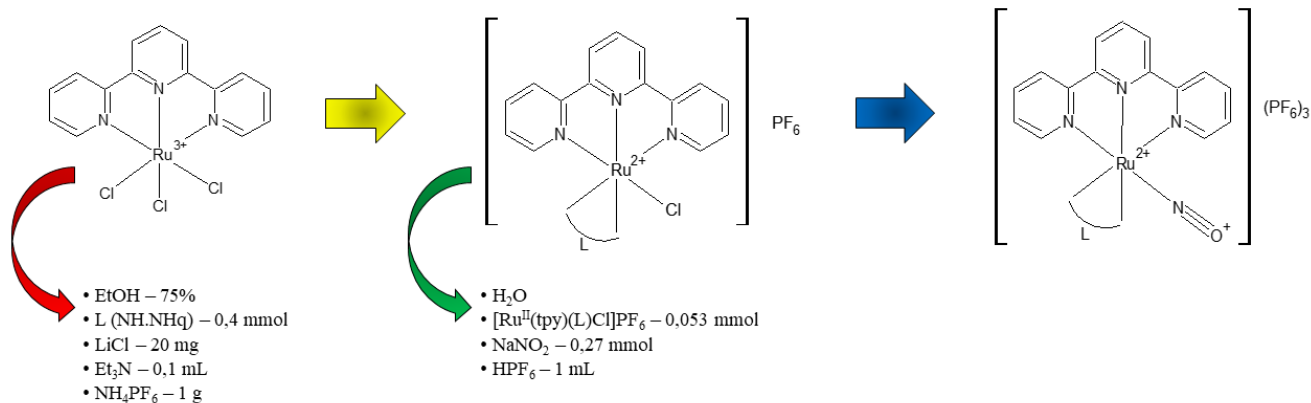


Figura 6. Rota de síntese par ao complexo [Ru^{II}(NH.NHq-COOH)(tpy)(NO)](PF₆)₃.

3.2. Caracterização dos pontos de carbono

3.2.1. Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência dos pontos de carbono foram obtidos utilizando-se um espectrofluorímetro Cary Eclipse, da marca Agilent Technologies®, fazendo uso de uma cubeta de quartzo 1,0 de caminho óptico. Os procedimentos em questão ocorreram no Laboratório e Equipamentos Multiusuários do Pontal (LEMUP), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU.

Os parâmetros experimentais utilizados no desenvolvimento do procedimento se mantiveram constantes correspondendo as janelas de emissão e excitação em 5 e 10nm e submetidas à varredura espectrofotométrica de 300 a 600 nm, com excitação em 320nm. Os experimentos foram realizados utilizando uma suspensão aquosa de 3ml de pontos de carbono adicionados a cubeta de quartzo seguindo os parâmetros anteriormente mencionados.

3.2.2. Espectroscopia da região do infravermelho (IR)

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro FTIR Cary 630, da marca Agilent Technologies® lotado no LEMUP.

As amostras foram analisadas com o auxílio do acessório de Refletância Total atenuada (ATR), com cristal de diamante, foram feitas varreduras espectrofotométricas de 4000 a 400 cm⁻¹.

3.2.3. Rendimento quântico de fluorescência

Para as análises de rendimento quântico de fluorescência dos PCs, utilizou-se um espectrofluorímetro Cary Eclipse, da marca Agilent Technologies®, fazendo uso de uma cubeta de quartzo 1,000 de caminho óptico. O equipamento utilizado pertence ao Laboratório e Equipamentos Multiusuários do Pontal (LEMUP), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU.

O rendimento quântico de fluorescência dos PCs foi determinado, utilizando-se do padrão de fluorescência sulfato de quinino. As soluções aquosas de sulfato de quinino ($\Phi_F = 0,54$) foram preparadas em

H₂SO₄ em 0,1 mol L⁻¹. Os espectros de fluorescência foram obtidos no intervalo de 330 a 600 nm com excitação em 320 nm. Posteriormente, as áreas dos espectros de fluorescência foram obtidas matematicamente através da integral do espectro obtidos pelo software do espectrofluorímetro (Equação 1).

$$\Phi_A = \Phi_{SQ} \left(\frac{\text{Grad}_X}{\text{Grad}_{ST}} \right) \left(\frac{n_X^2}{n_S^2} \right) \quad (1)$$

Os subscritos SQ e A se referem a solução padrão de sulfato de quinino e solução aquosa de PC, respectivamente. Φ representa o valor de rendimento quântico de fluorescência, Grad é a área de intensidade de fluorescência integrada e n é o índice de refração do solvente.

3.2.4. Potencial Zeta

As análises de potencial zeta foi obtido utilizando-se o equipamento da marca Malvern Zetasizer da FCFRP – USP sob coordenação da Prof^a. Dr^a. Renata Fonseca Vianna Lopez. Para a análise as amostras em suspensão de PCs foram diluídas 10 vezes em água ultrapura.

3.2.5. Tempo de vida de Fluorescência

O tempo de vida de fluorescência dos pontos de carbono foi obtida utilizando-se o método de contagem de fótons, com uma fonte de excitação Tsunami 3950 Spectra Physics, laser de titânio-safira e laser pulsado Millenia X Spectra Physics. Para a análise dos dados obtidos foi utilizado o software Edinburgh Instruments®. O equipamento utilizado pertence ao Departamento de Física, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras (FFCLRP-USP).

Para os estudos dos tempos de vida de fluorescência, utilizou-se a suspensão aquosa de pontos de carbono no estado excitado, em uma cubeta de quartzo e excitada em 300 nm.

3.2.6. Microscopia de força atômica (MFA)

As medidas de MFA foram realizadas em um Microscópio modelo SPM 9600, Shimizu. A suspensão aquosa de pontos de carbono foi gotejada na superfície lisa da mica recém clivada e seca durante 24h em dessecador. As medidas foram obtidas em modo intermitente.

3.3. Avaliação do perfil de interação entre Pcs e Complexo Nitrosilo de Rutênio

Os espectros de fluorescência foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro da marca Agilent Technologies®, de modelo Cary Eclipse. O equipamento utilizado pertence ao Laboratório e Equipamentos Multiusuários do Pontal (LEMUP), do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP), da UFU.

Para os estudos que acercam a interação entre o complexo e os PCs via espectroscopia de fluorescência, utilizou-se de uma amostra de 2 ml de pontos de carbono em suspensão aquosa em uma cubeta de quartzo, a seguir foram adicionadas subsequentes alíquotas a suspensão, cada qual passando por um período de incubação de 5 minutos. Dado este tempo os espectros foram obtidos na varredura no intervalo de 330 a

600nm com janelas de emissão e excitação em 5 e 10nm, respectivamente. Os espectros foram obtidos em temperaturas controladas que correspondem a 20°C, 25°C e 35°C.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Síntese dos pontos de carbono

Como precursor para síntese hidrotérmica dos PCs, fez-se uso da gelatina tipo B. A gelatina é uma proteína solúvel obtida a partir da hidrólise parcial do colágeno (MORAES, 2012). Devido a isso possui distintos resíduos de aminoácidos em sua composição. Além disso a gelatina tipo B, é extraída de bovinos sendo acessível ao mercado e de baixo custo.

Desse modo, foi definido as condições experimentais de síntese para que fosse verificado a reprodutibilidade do método e de sua eficiência na obtenção dos PCs. Essas condições foram otimizadas considerando tempo de irradiação, potencial do material do micro-ondas e tempo de dialise.

A suspensão aquosa de PCs apresenta na luz branca coloração amarelo claro e sob irradiação de luz UV, a suspensão exibe fluorescência azul (Figura 7).

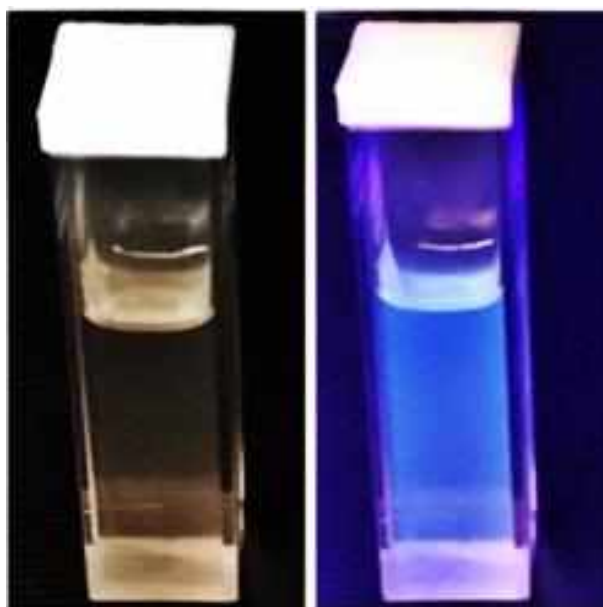


Figura 7. Resultado da síntese dos PCs, a esquerda a solução sobre a luz branca e a direita fluorescência emitida quando exposta a luz UV.

Pressupõe que durante o processo, ocorre a pirólise da estrutura proteica da gelatina em peptídeos e subsequentemente hidrolisada em aminoácidos com abundantes grupos funcionais: amina (NH_2) e carbonila (C=O) e carboxilato (COOH). Com o contínuo processamento hidrotérmico, os aminoácidos podem ser divididos e polimerizados, e depois, o aumento de temperatura promove reações de carbonização para os PCs com os determinados grupos funcionais (MIRANDA 2014; MACHADO, *et al*, 2015).

4.1.2 Efeito do tempo de irradiação em micro-ondas sobre a intensidade de fluorescência.

Os ensaios do efeito do tempo de irradiação sobre a intensidade de fluorescência dos PCs, foram realizados em três tempos diferentes: 2,5; 8; 10 minutos. A variável tempo demonstrou que o aumento do tempo de irradiação em micro-ondas exerce influência positiva sobre a emissão de fluorescência da solução. Diante do exposto, a análise do espectro de fluorescência apresentou que a emissão máxima da solução dos PCs ocorre em um tempo de irradiação de 8 minutos, e após esse tempo, a emissão de fluorescência permanece constante (Figura 8).

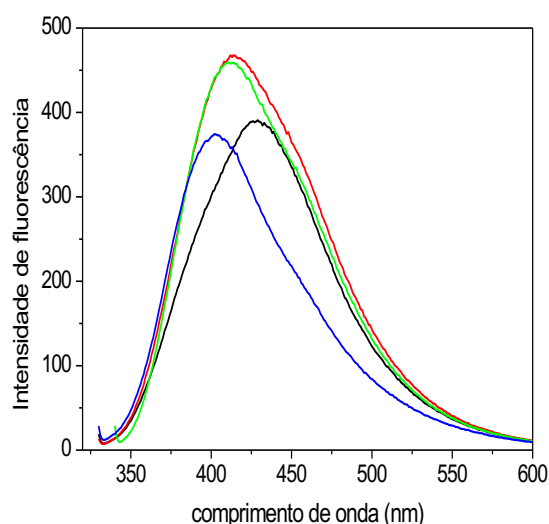


Figura 8. Suspensão de pontos de carbono após a passagem em diferentes tempos de irradiação no micro-ondas, $\lambda_{exc} = 320$ nm. Janelas de excitação e emissão 5 e 10 nm. 2,5 minutos (—); 8 minutos (—); 10 minutos (—); Gelatina (—).

4.1.3 Perfil Espectral de Fluorescência

Os espectros de fluorescência para os PCs foram obtidos variando-se o comprimento de onda de excitação (Figura 9). Os espectros apresentados foram obtidos em comprimento de onda de excitação crescente (300 a 400nm), exibindo o deslocamento dos máximos de emissão de fluorescência para maiores comprimentos de onda, em função do comprimento de onda de excitação, sendo em 320 nm a maior intensidade de fluorescência obtido para o material em estudo, emitindo na faixa de 400 nm. Ressalta-se que com base neste resultado, $\lambda_{exc} = 320$ nm foi utilizado para os estudos subsequentes.

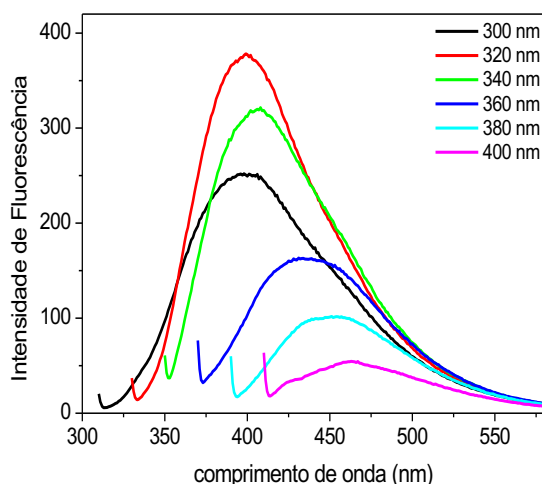


Figura 9. Espectros de emissão de fluorescência em diferentes comprimentos de onda de excitação para PCs. Janelas de excitação e emissão 10 e 5 nm. λ_{exc} = 300nm (—); 320nm (—); 340nm (—); 360nm (—); 380nm (—); 400nm (—).

Os grupos de superfície como, por exemplo, C-O, C=O, NH₂ e COOH, podem apresentar diferentes níveis de energia, tornando a emissão dos PCs dependente da energia de excitação (MACHADO, *et al.*, 2015). Este comportamento, também, pode ser resultante da presença de partículas com diferentes tamanhos e/ou da distribuição de sítios emissivos em sua superfície (MORAES, 2016).

4.1.4. Perfil espectral na região do UV-visível e infravermelho.

O espectro eletrônico na região do UV-visível para a suspensão aquosa de PCs (Figura 10) apresentou duas bandas na região de 276 e 326 nm, que são atribuídas as transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, respectivamente (VAZ, *et al.*, 2015). Sendo que as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ correspondem as transições eletrônicas centradas nos anéis aromáticos e $n \rightarrow \pi^*$ as transições das carbonilas (VAZ, *et al.*, 2015).

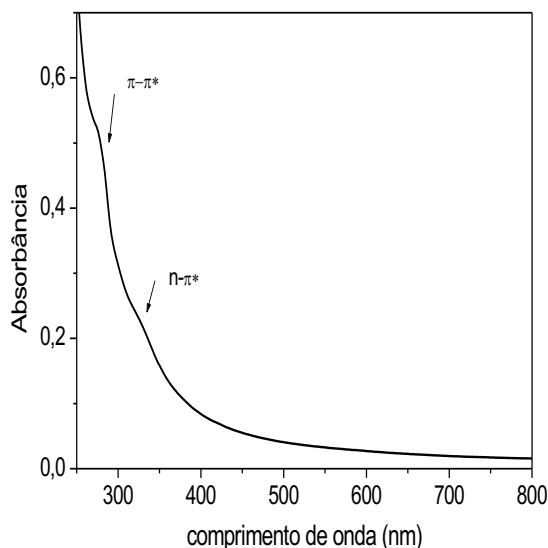


Figura 10. Espectro eletrônico na região do UV-visível da suspensão aquosa de PCs de gelatina em pH=7,0.

O perfil espectral na região do infravermelho, Figura 11, pode se observar as principais bandas características de absorção correspondentes a vibrações de estiramentos de O-H em 3500 cm^{-1} , C=O em 1629 cm^{-1} e C-O próximo à 1149 cm^{-1} que indicam a presença de grupos como ácido carboxílico e hidroxilas. A banda larga em torno do intervalo $3000\text{-}3270\text{ cm}^{-1}$ e a banda em 1518 cm^{-1} são atribuídas ao dobramento N-H, sugerindo a presença de grupos funcionais contendo grupos amino. Estas identificações estão em concordância com o precursor de origem, uma vez que a gelatina é formada por unidades de aminoácidos (VAZ, *et al*, 2015; LIANG, *et al*, 2013)

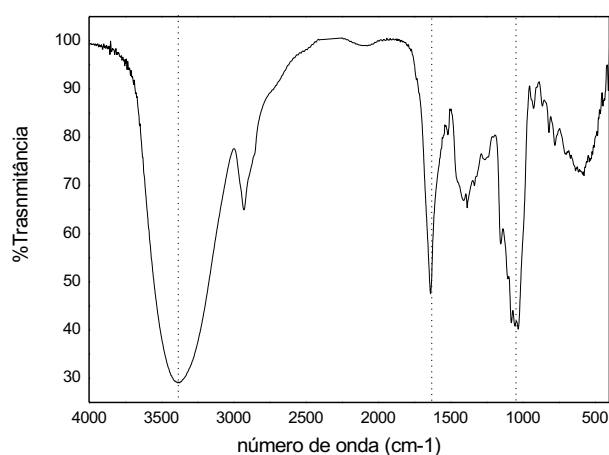


Figura 11. Espectro na região do infravermelho para os PCs.

4.1.4. Estabilidade térmica e pH dos pontos de carbono

Os principais fatores reacionais que exercem influência sobre a fluorescência dos pontos de carbono são a temperatura e pH, com intuito de avaliar a reação dos pontos de carbono a esses fatores uma série de ensaios foram realizados. A fim de otimizar os parâmetros do processo de síntese com o objetivo de maximizar a intensidade luminescente dos PCs (MOREIRA, 2017).

Para os ensaios de estabilidade térmica, os PCs foram acondicionados sob refrigeração ($\approx 5\text{ }^{\circ}\text{C}$), por um período 25 dias após sua síntese. Os resultados apontam que houveram pequenas diferenças entre faixas de variações durante todo o período de refrigeração como apresentado na figura 12. A variação de perfis de emissão de fluorescência com os tempos de refrigeração pode ser discutida com base no efeito de agregação entre os PCs.

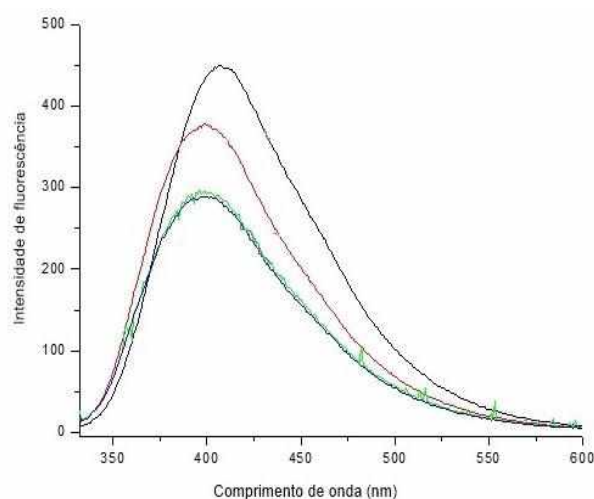


Figura 12. Espectros de emissão de fluorescência de PCs acondicionados em refrigeração ($\approx 5^{\circ}\text{C}$). $\lambda_{\text{exc}} = 320\text{ nm}$, janelas de excitação e emissão 5 e 10nm. Após 8 minutos de preparo (—); 24 horas em dialise (—); 7 dias refrigerado (—); 25 dias refrigerado (—).

A figura 13, apresenta o perfil de emissão de fluorescência dos PCs em virtude da mudança de pH da solução.

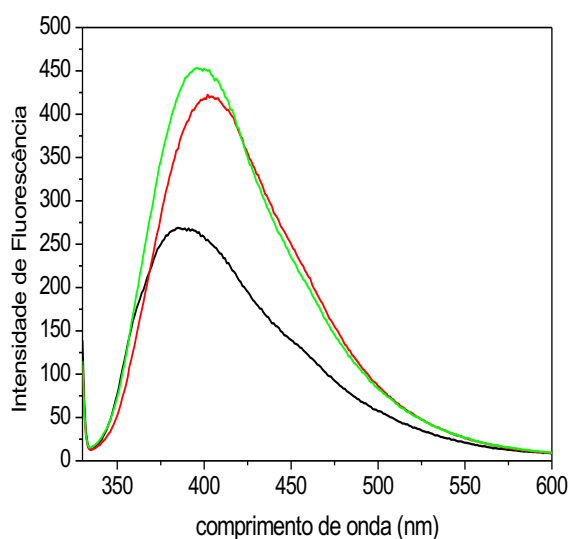


Figura 13. Espectro de emissão de fluorescência de PCs em diferentes valores de pH sob excitação em 320nm (janela de excitação 5 e emissão 10). pH=7 (—); NaOH (—); HCl (—).

As alterações nos valores de pH, demonstraram que ambientes muito ácidos ou muito básicos diminuem a intensidade de fluorescência dos PCs, demonstrando que o pH ideal para máxima intensidade de fluorescência seria um pH em torno de 7,0. Tal alteração ocorre devido a interação dos íons H^+ e OH^- que induzem alterações dos grupos funcionais na superfície dos PCs e consequentemente há alteração na energia das transições eletrônicas promovidas pelos grupos funcionais (LI, *et al*, 2014).

4.1.4. Determinação do rendimento quântico de fluorescência

Os pontos de carbono são caracterizados como nanopartículas semicondutoras. Sendo que materiais semicondutores como os PCs, a eficiência quântica diminui com o aumento de temperatura, antes de determinar o rendimento quântico de fluorescência verificou-se o efeito na temperatura em relação a emissão de fluorescência.

A Figura 14, mostra o perfil de emissão dos PCs quando ocorre variações da temperatura do meio. Com isso, é possível visualizar que ocorre a diminuição da intensidade de fluorescência com o aumento da temperatura.

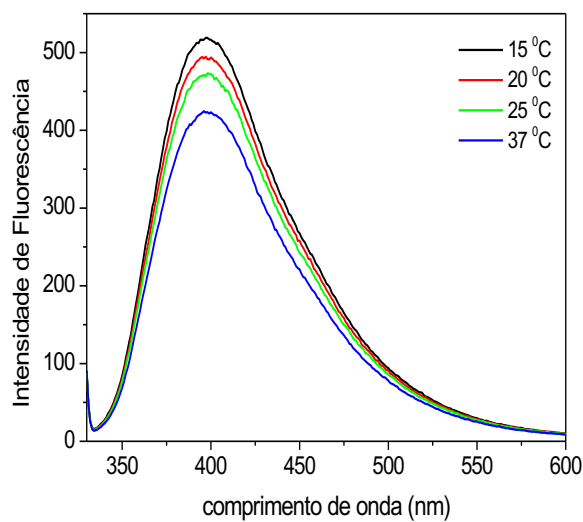


Figura 14. Espectros de emissão de fluorescência de PCs sobre variação de temperatura. $\lambda_{exc}= 320$ nm, janelas de excitação e emissão 5 e 10 nm. 15°C (—); 20°C (—); 25°C (—); 37°C (—).

Conforme Tang e colaboradores (Tang, 2012), em altas temperaturas tem-se uma maior probabilidade de relaxamento dinâmico da fluorescência em consequências de decaimento não radiativo (emissão de calor).

Os resultados de rendimento quântico de fluorescência (Φ_F), dos PCs foram realizados utilizando-se o sulfato de quinino foi utilizado como padrão de fluorescência ($\Phi_F= 0,54$) (LIANG, *et al.* 2013). Este estudo foi realizado em diferentes condições temperaturas, 25, 30 e 37°C (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de Φ_F para PCs em pH=7,0 em diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	Φ_F
25	2,50%
30	2,37%
37	2,29%

Os valores de rendimento quântico de fluorescência para PCs apresentaram diminuição linear com a temperatura. O comportamento apresentado, se deve ao fato que a eficiência quântica do semicondutor tende a diminuir com o aumento da temperatura, o mesmo foi observado na Figura 14, quando o aumento da temperatura levou a uma menor intensidade.

Além da temperatura, os valores rendimento quântico para pontos de carbono são influenciados pela metodologia de obtenção dos mesmos. No caso de PCs obtidos a partir de gelatina, Yang e colaboradores utilizaram a de hidrólise térmica em autoclave a 200 °C por 3h e o valor de $\Phi_F = 31\%$ (emissão em 430 nm, sulfato de quinino como padrão) (LIANG, *et al.*, 2013). Enquanto Das e colaboradores nas mesmas condições de obtenção dos PCs, a partir da hidrólise térmica em autoclave a 200 °C por 3h, obtiveram um valor de $\Phi_F = 26,9\%$ (emissão em 436 nm, rodamina 6G como padrão) (MANDAL, *et al.*, 2019). Em nosso trabalho o valor de Φ_F é inferior aos obtidos na literatura, no entanto, vale ressaltar que a metodologia de obtenção dos PCs a partir da gelatina é mais viável economicamente e acessível.

4.1.5. Tempo de vida de fluorescência

Ao avaliar os tempos de vida de fluorescência (τ_F) em diferentes valores de temperatura (Tabela 2) foi possível observar um decaimento multiexponencial conforme reportado na literatura (LIANG, *et al.* 2013).

Tabela 2. Valores obtidos através da média aritmética $\pm$ desvio padrão para o tempo de vida de fluorescência em diferentes temperaturas.

	τ_1/ns	τ_2/ns	τ_3/ns
298 K	$7,85 \pm 0,11$	$2,60 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,01$
308 K	$7,78 \pm 0,01$	$2,63 \pm 0,01$	$0,47 \pm 0,01$

No τ_3 se deve as transições eletrônicas do tipo $n \rightarrow \sigma^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ aos grupos funcionais na superfície do PCs O-H/C-O-C e C=O/COOH, respectivamente. Os tempos τ_2 ocorrem devido decaimento de transições eletrônicas do tipo sp^2 no caroço (“core”) do PCs (Figura 15) e τ_1 devido variedades de tamanho de PCs produzidos.

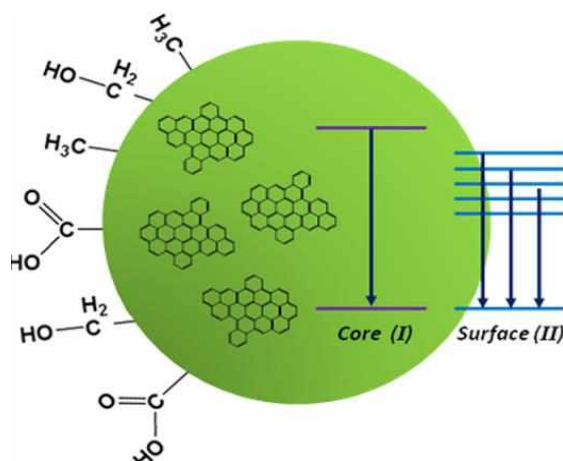


Figura 15. Representação ilustrativa dos PCs, com bandas duplas de fluorescência, atribuídas ao core e seus grupos de carbono, e a emissão do estado da superfície. (Fonte: TANG, *et al*, 2012)

O menor tempo de vida de fluorescência causado pela região da superfície (τ_3) do PCs se deve a capacidade de recombinação radioativa de elétrons e buracos que liberam energia na forma de emissão de fluorescência.

As análises dos perfis de emissão de fluorescência variando-se a temperatura (Figura 16), não demonstram simetria entre os mesmos. Tang e colaboradores (2012), verificaram através do tratamento matemático de deconvolução Gaussiana, que o perfil de emissão de fluorescência de pontos de carbono é formado por duas bandas de emissão. Na Figura 16, as bandas em conformidade ao trabalho de Tang (2012), apresentam uma banda estreita (largura de banda de 49,32 nm a 15 °C) em 394 nm que se refere transição I do caroço dos PCs e em menor energia outra banda larga (largura de banda de 90,03 nm a 15 °C) em 441 nm que se refere a transição II, aos grupos superficiais. Com o aumento de temperatura, os máximos de emissão não são alterados, apenas verificou-se um aumento na largura das bandas (394 nm largura de banda de 49,54 nm a 37 °C e 441 nm largura de banda de 91,05 nm a 37 °C).

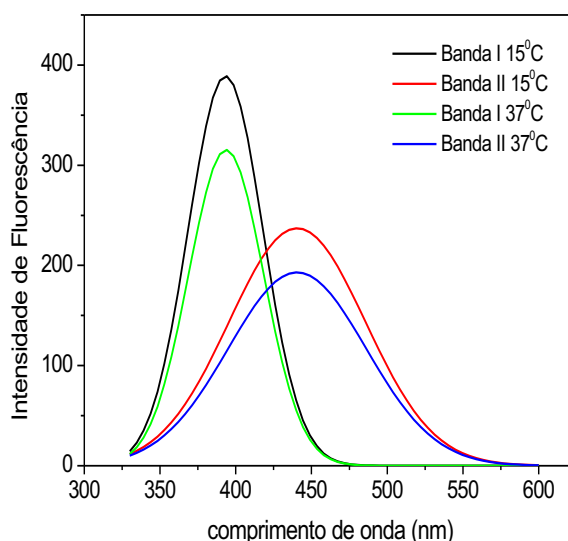


Figura 16. Espectro de fluorescência dos PCs variando a temperatura, sobre o tratamento matemático de deconvolução Gaussiana. λ_{exc} = 320 nm, janelas de excitação e emissão 5 e 10 nm.

4.1.6. Determinação do potencial zeta

Os estudos de sobre o potencial zeta, avaliariam as cargas na superfície na estrutura. A avaliação do potencial zeta para as PCs mostrou um valor de potencial igual a -20,8 mV na superfície. (Figura 17).

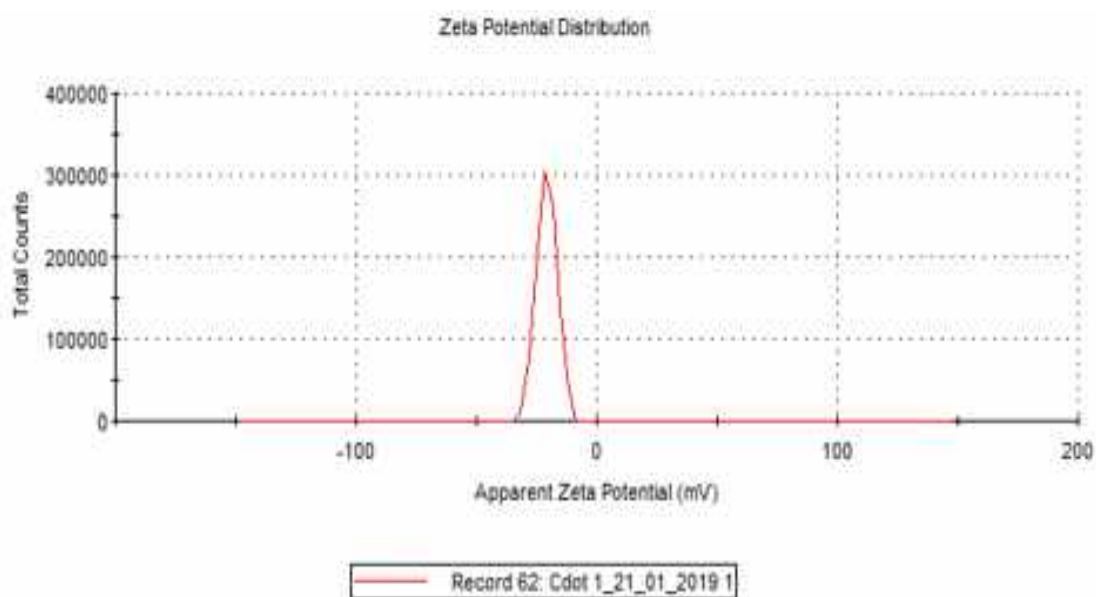


Figura 17. Distribuição do potencial zeta dos PCs em suspensão aquosa.

A carga negativa de -21mV encontrada neste trabalho, estão em concordância com o que encontrado na literatura. Li e colaboradores (2011), apontam que a denominação da carga negativa encontrada na

superfície dos PCs é devido aos grupos carboxilato que residem na superfície de nanopartículas da base de gelatina. Os grupos que compõe a estrutura química da gelatina podem ser observados na figura 18.

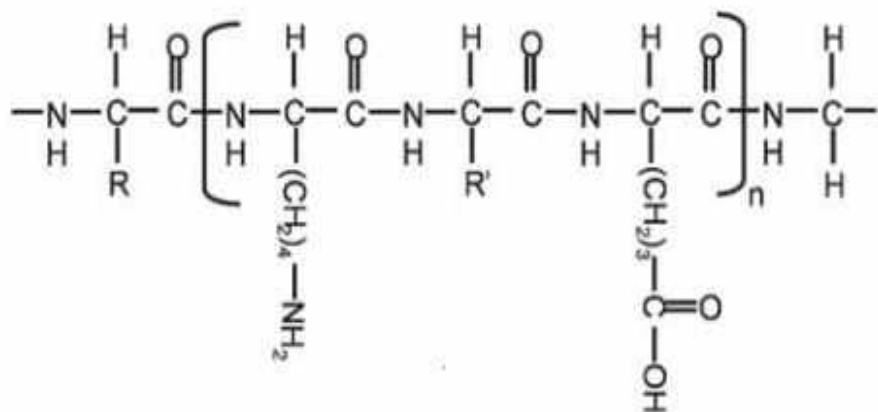


Figura 18. Estrutura química da gelatina apresentando seus respectivos resíduos de aminoácidos. (Fonte: Modificado de (LI & CHEN, 2011))

4.1.7. Microscopia de força atômica

A fim de obter dimensões de tamanho de partícula, realizou-se a microscopia de força atômica (figura 19). A técnica utilizada, consiste em uma microscopia de alta sensibilidade não permitindo o deslocamento dos átomos (PINTO, *et al*, 2013), tornado possível o estudo topográfico da amostra em análise. Os resultados da varredura da superfície dos pontos de carbono, apontaram que os PCs obtidos tem aproximadamente 10 nm de diâmetro. Tal resultado é concordante com o tamanho médio descrito pelos PCs na literatura.

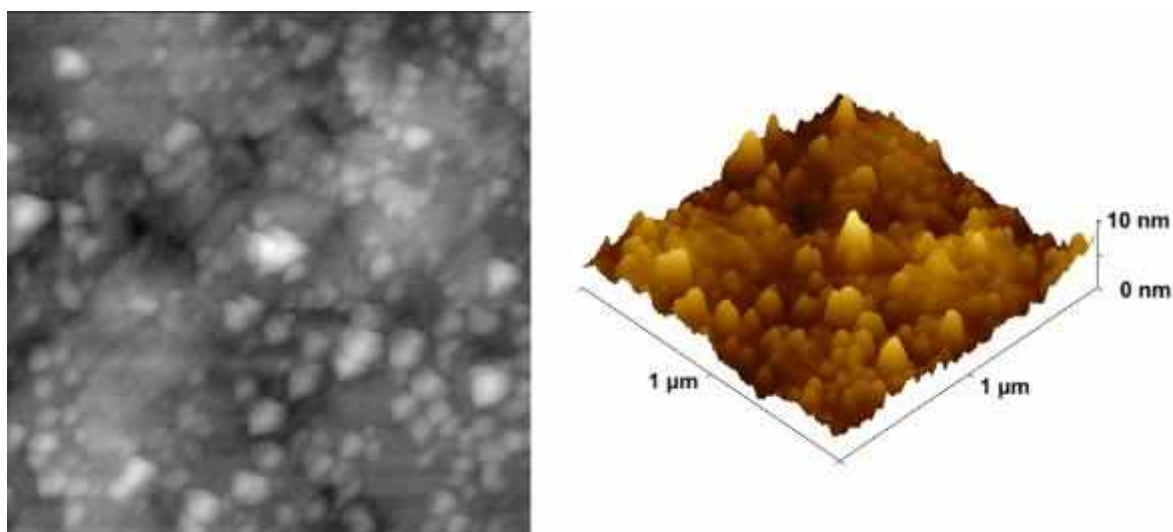
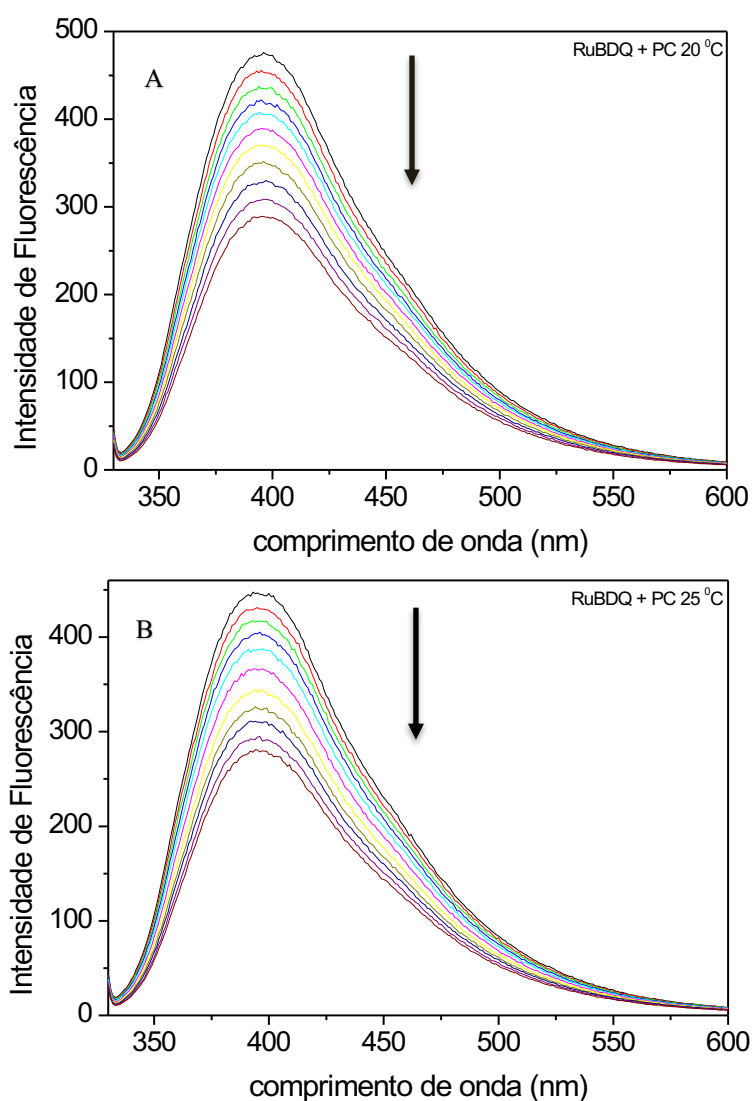


Figura 19. Imagem obtida sobre resolução da microscopia de força atômica, e sua imagem topográfica.

4.2. Avaliação do perfil de interação entre PCs e Complexo Nitrosilo de Rutênio

Visando a aplicação dos PCs como sondas fluorescentes para o entendimento da localização de complexos doadores de óxido nítrico (NO), realizamos estudos de interação entre os PCs e complexo de rutênio do tipo $[\text{Ru}(\text{NH}_2\text{NHq-COOH})(\text{tpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$. O complexo citado atua como doador exógeno de NO, tornaram-se potenciais candidatos a agentes liberadores de NO e, consequentemente, potenciais pró-fármacos.

A fim de se obter os mecanismos no qual ocorre a interação, foi realizado um estudo sobre o perfil da supressão de fluorescência com adição de subsequentes alíquotas do complexo RuBDQ, atuando como agente supressor na suspensão aquosa de pontos de carbono (figura 20).



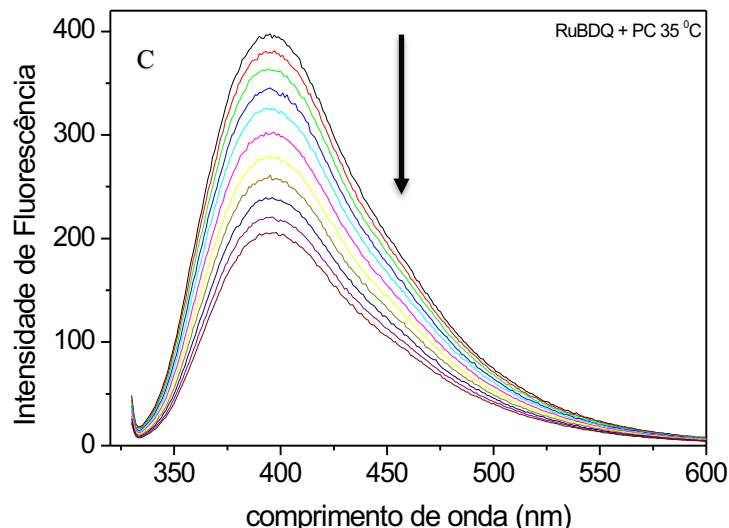


Figura 20. Espectros de supressão de fluorescência para os PCS em presença do complexo RuBDQ variando a temperatura em 20, 25 e 35°C. λ_{exc} = 320 nm. Janelas de excitação/emissão 5 e 10nm. [RuBDQ]= 0 -72,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 0 (—); 0,99 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—); 2,66 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—); 4,98 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—); 8,26 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—); 13,20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—); 19,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—); 27,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—); 36,90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—); 47,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—); 59,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (—).

A ausência de mudança na posição do comprimento de onda em 390 nm, durante os experimentos, indica fortemente que não está ocorrendo agregação dos PCs após a adição do agente supressor (complexo de rutênio) (GAO, *et al*, 2013).

Considerando-se o valor de zeta potencial igual -21 mV para os PCs preparados nesse trabalho, pressupõe-se que a superfície negativamente carregada dos PCs favorece a interação com os complexos de rutênio positivamente carregados, e consequentemente os processos de carga/energia entre eles (BURKS & FORD, 2012).

4.2.1. Mecanismos de supressão de fluorescência

A determinação dos mecanismos das interações faz-se essencial, a fim de investigar-se se os mecanismos das interações PC–RuBDQ são estáticos ou dinâmicos. mecanismo estático ou, também denominado, processo de supressão estática da fluorescência, há a colisão entre o fluoróforo (PCs) e o supressor (complexo de rutênio) no estado fundamental, ocasionando a formação de um complexo não fluorescente (LAKOWICZ, 2006; MOREIRA, *et al.*, 2015). No mecanismo dinâmico ou, também denominado, processo de supressão dinâmico da fluorescência, há a colisão entre o fluoróforo e o supressor no estado excitado, ocasionando a formação de um complexo não fluorescente no estado excitado, o qual retorna ao estado fundamental, consequentemente, sem fluorescência (LAKOWICZ, 2006). A representação ilustrativa dos mecanismos estático e dinâmico é apresentada na Figura 21.

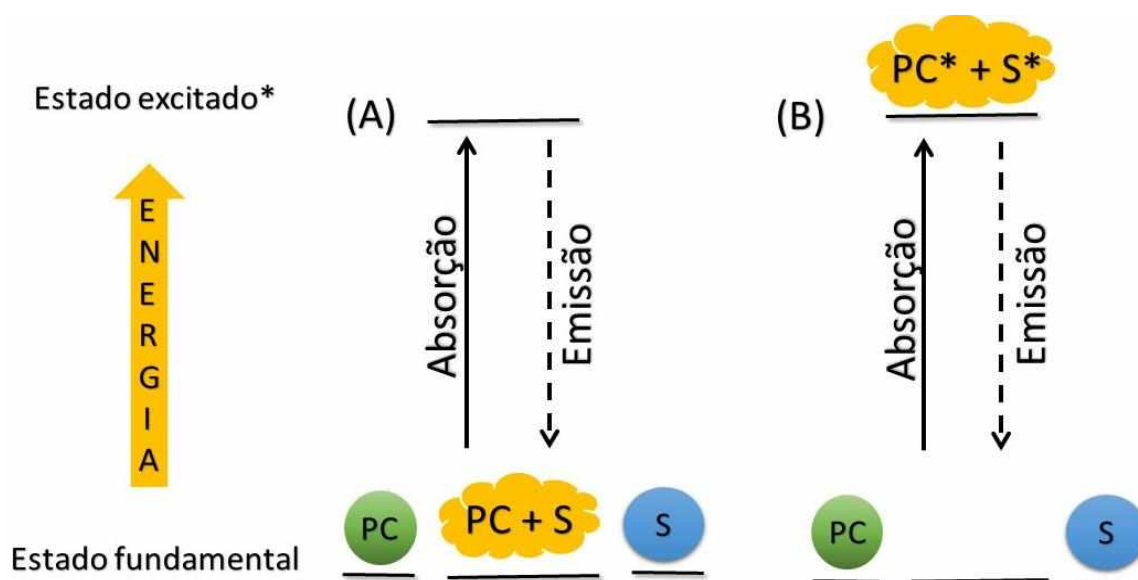


Figura 21. Representação ilustrativa dos possíveis mecanismos de interação entre os PCs (fluoróforo) e complexo RuBDQ (supressor), sendo (a) mecanismo estático e (b) mecanismo dinâmico.

A distinção dos mecanismos estáticos ou dinâmicos dar-se-á analisando-se a tendência da constante de Stern-Volmer (K_{SV}), a depender da temperatura (LAKOWICZ, 2006).

No mecanismo estático, a elevação da temperatura diminuirá a estabilidade deste complexo formado e, conseqüentemente, haverá a diminuição de K_{SV} . No mecanismo dinâmico, a elevação da temperatura diminuirá a viscosidade do meio, favorecendo a difusão do supressor em direção à espécie fluoróforo no estado excitado e, conseqüentemente, haverá o aumento de K_{SV} (LAKOWICZ, 2006).

Os dados de supressão de fluorescência foram obtidos através do tratamento de Stern-Volmer (equação 2).

$$F_0/F = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q] \quad (2)$$

onde F e F_0 são as intensidades relativas de fluorescência da PCs em presença e em ausência do complexo, respectivamente; k_q é a constante de velocidade bimolecular de supressão; τ_0 é o tempo de vida de fluorescência médio em ausência do supressor; $[Q]$ é a concentração do complexo, e a constante de Stern-Volmer (K_{SV}) é o produto $k_q\tau_0$ (LAKOWICZ, 2006). Os gráficos de F_0/F em função da concentração dos complexos RuBDQ está apresentado na Figura 22.

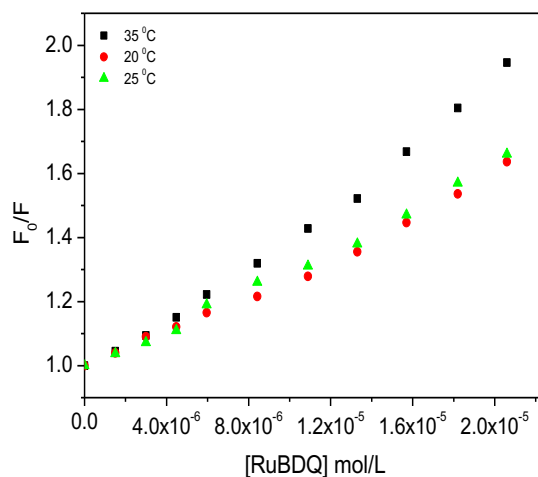


Figura 22. Gráfico de Stern-Volmer acerca das interações entre PCs e RuBDQ. $\lambda_{exc}= 320nm$. Janelas de excitação e emissão 5 e 10nm.

Os PCs na presença do complexo RuBDQ, os resultados apontam um aumento nos valores de K_{SV} com o aumento da temperatura indicando tratar-se de um mecanismo de supressão dinâmico (Tabela 3).

Tabela 3. Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) em diferentes temperaturas para os PCs em presença do complexo RuBDQ.

T (K)	K_{SV}	R^2	K_{SV}^*	f_a	R^2
	(mol ⁻¹ L)		(mol ⁻¹ L)		
293	29.777	0,9952	31,283	1,19	0,9978
298	31.698	0,9972	66,586	2,77	0,9997
308	45.638	0,9960	85,230	2,77	0,9995

K_{SV}^* : equação de Stern-Volmer modificada

O aumento de temperatura (Figura 23) indicou uma tendência não linear para a relação F_0/F vs $[RuBDQ]$ mol/L. Tal resultado é indicativo que mais fluoróforos (pontos de carbono) são acessíveis ao supressor (RuBDQ). Sendo assim, fez-se necessário analisar os dados utilizando-se a equação modificada de Stern-Volmer (equação 3).

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K_a |Q|} + \frac{1}{f_a} \quad (3)$$

Os valores de $F_0/(F_0-F)$ versus $1/[Q]$ foram plotados e os valores de fração acessível (f_a) e K_{SV} foram obtidos a partir dos valores dos coeficientes linear e angular, respectivamente. O ajuste da equação de Stern -Volmer permitirá levar em conta a fração acessível dos fluoróforos, pois muito comum no processo de supressão de

fluorescência é a existência de duas ou mais classes de fluoróforos, cuja a acessibilidade ao supressor não são iguais. A aplicação da equação modificada de Stern-Volmer resultou em um excelente ajuste linear, com uma fração acessível maior que 1 (Tabela 3).

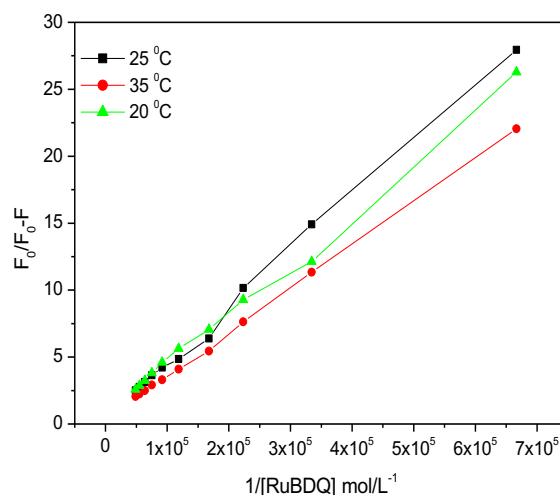


Figura 23. Gráfico para equação modificada de Stern-Volmer acerca das interações entre PCs e complexo RuBDQ. $\lambda_{exc}=320\text{nm}$. Janelas de excitação e emissão 5 e 10nm

Valores de $f_a > 1,0$ são extensamente reportados na literatura e sugerem que a fluorescência dos PCs está sendo suprimida por mais de uma molécula do complexo RuBDQ (LAKOWICZ, 2006). O valor de K_{SV} obtido para a equação modificada de Stern Volmer aumentam com a temperatura indicativo de mecanismo dinâmico de supressão de fluorescência.

É importante ressaltar que a simples observação de um gráfico de Stern-Volmer linear não é conclusivo a respeito do mecanismo de supressão de fluorescência, não permitindo confirmá-lo como estático ou dinâmico. A elucidação desses mecanismos pode se dar através de inúmeros caminhos, tais como: análise da dependência do K_{SV} em relação à temperatura, análises de alterações nos espectros de absorção UV-Visível e principalmente, por medidas de tempo de vida de estado excitado (VALEUR, 2001)

O relaxamento em PCs de elétrons fotoexcitados incluem: relaxamento radiativo, espalhamento não irradiante de Auger e aprisionamento térmico ativado em estados de superfície ou defeitos ou impurezas (TANG, 2012). Geralmente, o processo não radiativo é ativado com o aumento da temperatura e fortalece a interação entre os sensibilizadores guiando a diminuição do estado excitado. O processo de transferência de energia é dominante em menores temperaturas (XU, *et al*, 2014).

Os relatos acima corroboram com o mecanismo dinâmico de supressão de fluorescência entre RuBDQ e PCs em temperaturas menores que 298 K.

As análises de decaimento de tempo de vida de fluorescência para interação de PCs em presença de adições do complexo RuBDQ nas temperaturas de 298 e 308 K (Tabela 4) observa-se que em 298 K não há alteração na presença do agente supressor, enquanto que a 308 K há uma diminuição do tempo de vida na presença do complexo de rutênio.

Tabela 4. Tempo de vida de fluorescência dos PCs em função da concentração do complexo RuBDQ.

Condição	τ_1/ns	τ_2/ns	τ_3/ns	$\tau_{\text{médio}}$	$\alpha_1/\%$	$\alpha_2/\%$	$\alpha_3/\%$	χ^2
Experimental								
PC 298 K	7,95	2,62	0,46	3,68	33,25	58,04	8,71	1,13
PC 5,09 $\mu\text{mol/L}$ RuBDQ	7,98	2,68	0,48	3,71	32,43	58,25	9,33	1,20

Condição	τ_1/ns	τ_2/ns	τ_3/ns	$\tau_{\text{médio}}$	$\alpha_1/\%$	$\alpha_2/\%$	$\alpha_3/\%$	χ^2
Experimental								
PC 308 K	7,77	2,61	0,45	3,61	31,96	59,16	8,88	1,17
PC 5,09 $\mu\text{mol/L}$ RuBDQ	7,39	2,51	0,44	3,45	33,77	57,56	8,67	1,20

Com os valores de $\tau_{\text{médio}}$ e K_{SV} determinou-se os valores de constante bimolecular de supressão (K_q) a qual reflete a eficiência do processo de supressão ou a acessibilidade dos fluoróforos aos supressores (VALEUR, 2001). Os valores calculados de k_q para PC a 298 K e 308 K foram iguais a $8,61 \times 10^{12} \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ e $1,26 \times 10^{13} \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$, respectivamente, sendo o valor da constante difusional a 25 °C $2 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$. Esses resultados indicando que o processo de supressão de fluorescência do PCs em presença do complexo RuBDQ é devido à formação de um complexo não fluorescente entre o PC e os complexos de rutênio, via mecanismo estático de supressão (LAKOWICZ, 2006). na temperatura de 298 K e mecanismo dinâmico com o aumento de temperatura.

Os resultados obtidos para o tempo de vida de fluorescência e para a constante bimolecular de supressão indicam que o sistema em estudo é amplo e complexo, não havendo um único mecanismo responsável pela supressão da fluorescência do PC. Provavelmente, os dois mecanismos de supressão estão presentes na interação entre o PC e RuBDQ e tais mecanismos dependem da temperatura.

Com propósito de analisar-se a tendência de constante de ligação (K_a) entre PC e RuBDQ, a depender da temperatura. Os valores de K_a foram obtidos utilizando-se a Equação 4 (Equação de Stern-Volmer modificada).

$$\log\{(F_0-F)/F\} = \log K_a + n \log [Q] \quad (4)$$

Onde F e F_0 são as intensidades relativas de fluorescência da PC em presença e em ausência do complexo RuBDQ, respectivamente; K_a é a constante de interação do complexo com a PC; n é o número de sítios de ligação; e $[Q]$ é a concentração dos complexos (LAKOWICZ, 2006). Os gráficos de $\log\{(F_0-F)/F\}$ em função do logaritmo da concentração do complexo RuBDQ é apresentado na Figura 24.

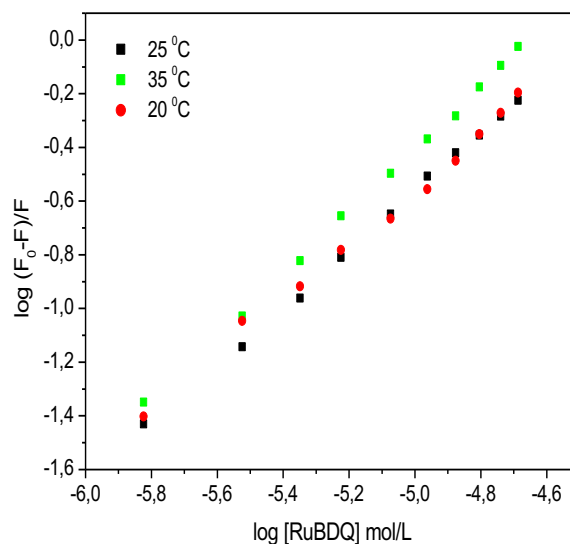


Figura 24. Gráfico de log em função da concentração do complexo RuBDQ. $\lambda_{exc}=320\text{nm}$. Janelas de excitação e emissão 5 e 10nm.

Os valores de K_a calculados indicam um aumento na força de interação do PC com RuBDQ com o aumento de temperatura (Tabela 5). Como observamos para a constante de supressão (K_{sv}), há um aumento dos valores de constante de associação (K_a) com o aumento da temperatura. Essa tendência pode ser justificada pela diminuição do coeficiente de difusão promovida pela elevação da temperatura e, como consequência, há um aumento da estabilidade do complexo formado PCs – RuBDQ.

Tabela 5. Valores obtidos para a constante de associação (K_a) e os parâmetros termodinâmicos do complexo PCs/RuBDQ.

T (K)	K_a ($\text{mol}^{-1} \text{ L}$)	n	R^2	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol)	ΔG (kJ/mol)
293	35.768	1,02	0,9973	95,727	415,015	-25,872
298	97.724	1,11	0,9976			-28,402
308	259.956	1,16	0,9995			-32,098

4.2.2. Determinação dos parâmetros termodinâmicos

A determinação dos parâmetros termodinâmicos faz-se necessária, a fim de investigar-se a espontaneidade das interações PC–RuBDQ e, ainda, a natureza das mesmas, podendo ser estas, interações

forças de interações hidrofóbicas, forças de van der Waals, forças eletrostáticas ou ligações de hidrogênio (LAKOWICZ, 2006).

Os valores de ΔH e ΔS (figura 25) foram obtidos utilizando-se a Equação 5 (Van't Hoff),

$$\ln K_a = -(\Delta H/RT) + (\Delta S/R) \quad (5)$$

onde K_a é a constante de interação do complexo RuBDQ com PC; R é a constante dos gases ideais ($R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$); e T é a temperatura em Kelvin.

Os valores de ΔG foram obtidos utilizando-se a Equação 6, onde T é a temperatura em Kelvin (LAKOWICZ, 2006).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (6)$$

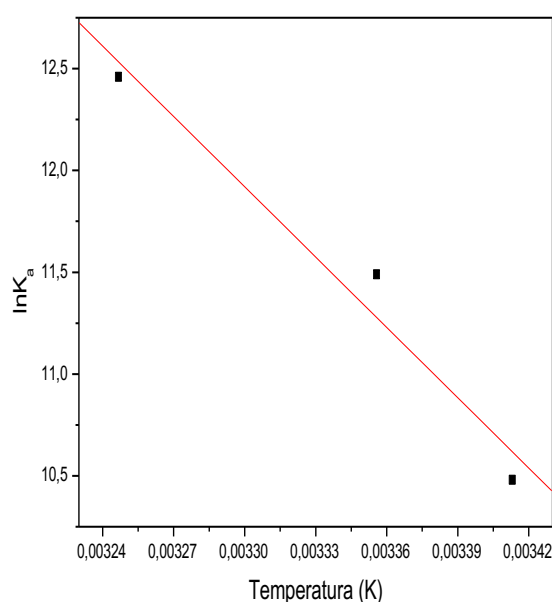


Figura 25. Gráfico de Van't Hoff para o complexo PCs/RuBDQ.

A interação entre RuBDQ e PCs (Tabela 5), aumenta espontaneamente (ΔG negativo) com a temperatura e o sistema torna-se mais estável. Devido aos valores positivos de ΔH e ΔS , a interação é considerada do tipo hidrofóbica (PHILIP & SUBRAMANIAN, 1981)

No entanto é importante ressaltar mais uma vez que, assim como na abordagem de Stern-Volmer, esse método também considera a relação direta entre a diminuição de emissão do fluoróforo e o aumento da concentração do supressor. Ao analisar os valores de n e f_a , os quais n foram reportados próximo de 1 (Tabela 4) e $f_a > 1$ (Tabela 3). Nos faz raciocinar se diferencia radicalmente ao considerar que a supressão não depende exclusivamente do aumento do supressor, devendo ser considerado também a dependência linear entre a supressão e a fração de sítios de superfície do fluoróforo ligados ao supressor (MORRIS-COHEN, *et al*, 2012)

Neste contexto, consideradas as discussões sobre o tema optou-se por considerar a supressão de fluorescência dos pontos de carbono como passiva de modelos mono e multi interação. Sendo assim, foi

utilizado outro modelo matemático o qual foi escolhido por utilizar o modelo de adsorção de isothermas de Langmuir Blogett. (MEEKER & ELLIS, 1999).

Para os cálculos das constantes de ligação (K), utilizou-se método de acordo com Meeker e Ellis. O ângulo θ descreve a fração de supressor (complexo de rutênio) que interage com a superfície do fluoróforo (pontos de carbono). Os valores de θ para cada espectro registrado foram calculados a partir da equação (7).

$$\theta = \frac{\ln Pl_{ref} / Pl_x}{\ln Pl_{ref} / Pl_{sat}} \quad (7)$$

onde Pl_{ref} é o valor da intensidade de fluorescência do ponto quântico na ausência do supressor; Pl_x são os valores de intensidade de fluorescência do ponto quântico à medida que se aumenta a concentração do supressor; Pl_{sat} é o valor da intensidade de fluorescência do ponto de carbono quando cessou o processo de supressão de fluorescência.

A constante de ligação K foi calculada a partir da equação (8) e (9) que considera isothermas de mono e multi sítios de interação.

$$\left(\frac{1}{\theta}\right) \left(\frac{1}{K[S]}\right) + 1 \quad (8)$$

$$\frac{(1-\theta)^2}{\theta} = \frac{1}{2 K [S]} \quad (9)$$

onde, K é a constante de ligação do RuBDQ na superfície do PC; [S] é a concentração de supressor; θ é a fração de supressor que interage com a superfície do fluoróforo.

No tratamento usando o modelo multi sítios, (Figura 26) não se observou linearidade das curvas nas diferentes temperaturas.

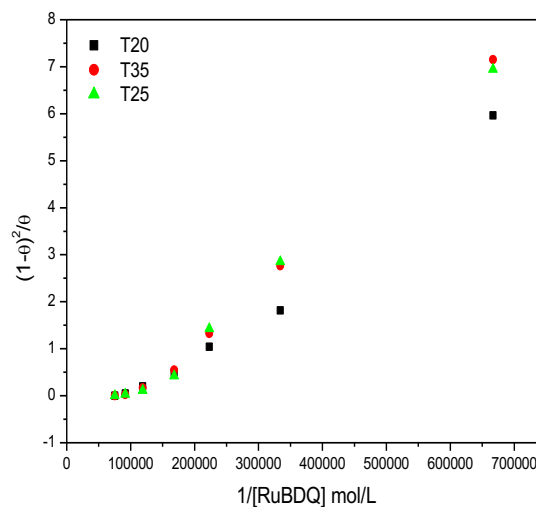


Figura 26. Gráfico para o modelo multi sítios acerca a interação do complexo PCs/RuBDQ.

A utilização do modelo de Langmuir para modo de interação mono sítio, a linearidade foi adquirida
Figura 27.

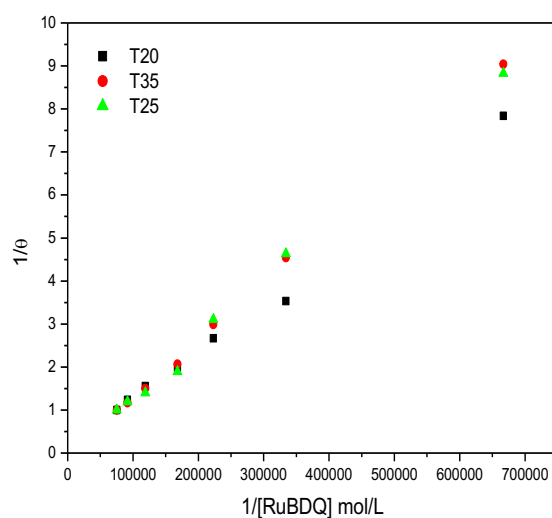


Figura 27. Gráfico para o modelo de mono sítios acerca a interação do complexo PCs/RuBDQ.

Ao tratar os parâmetros termodinâmicos utilizando-se das constantes de ligação (K) obtidas através do tratamento matemático de Langmuir (MEEKER & ELLIS, 1999). Verificamos (Tabela 6) que os valores de $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ indicam interação eletrostática entre PC e RuBDQ.

Tabela 6. Parâmetros termodinâmicos obtidos através do tratamento matemático de Langmuir para o complexo PCs/RuBDQ.

K^*					
T (K)	R^2	($\text{mol}^{-1} \text{L}$)	ΔH (J/mol)	ΔS (J/mol)	ΔG (kJ/mol)
293	0,9973	87.719	-7,914	67,18	-27,60
298	0,9985	74.074			-27,93
308	0,9997	72.992			-28,60

*Modelo de Langmuir mono sítio

Ao discutir a relação entre os parâmetros termodinâmicos para formação da interação entre PCs e complexos do tipo RuBDQ, propõe-se que o complexo de rutênio interage de maneira eletrostática entre grupos carboxilatos na superfície dos PCs com grupo carregados positivamente, como ligante nitrosil (NO^+) do complexo de rutênio (Figura 28).

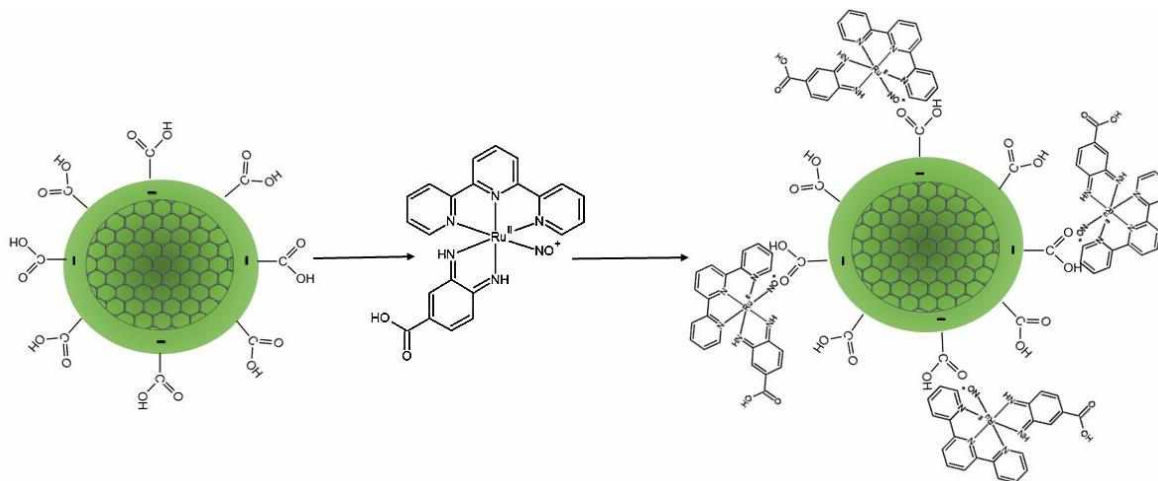


Figura 28. Representação ilustrativa da proposta de interação entre os grupos carboxilatos dos pontos de carbono e o ligante nitrosil (NO^+), do complexo RuBDQ.

Para o complexo de RuBDQ, o valor de estiramento para o ligante nitrosil ($\nu(\text{NO}^+)$) é 1895 cm^{-1} . Este valor pode ser observado na figura 29.

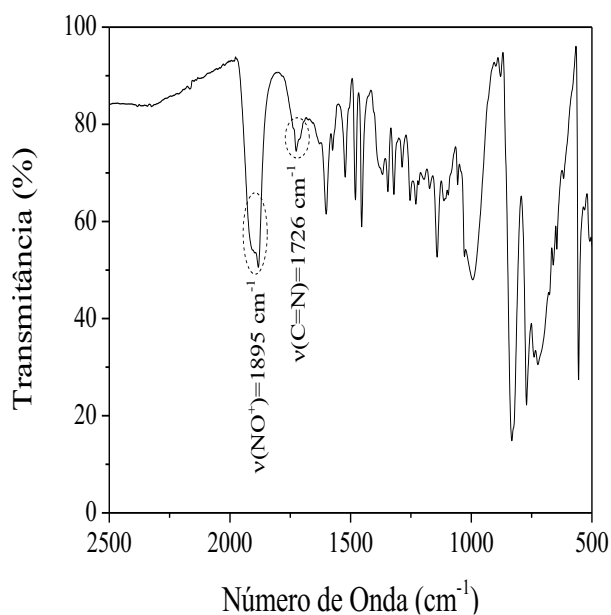


Figura 29. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo RuBDQ.

O espectro de infravermelho (figura 30), mostra que o valor de estiramento para o ligante nitrosil ($\nu(\text{NO}^+)$) após interação com PC, tem um valor de 1877 cm^{-1} . A diminuição da energia de estiramento cerca

de 18 cm^{-1} é um indicativo da participação do ligante nitrosil na interação eletrostática com os pontos de carbono.

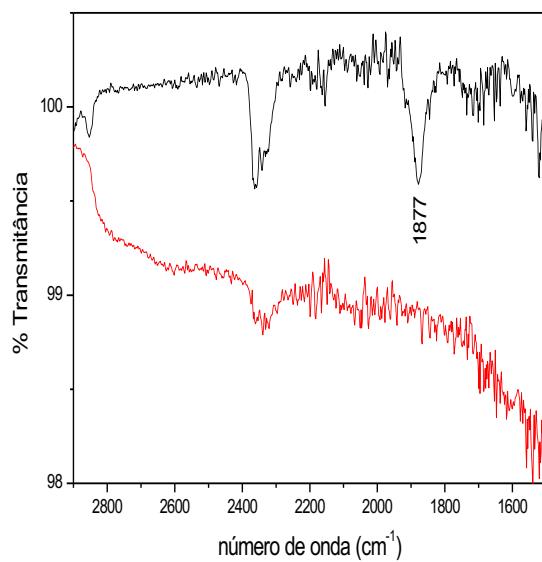


Figura 30. Espectros vibracionais na região do infravermelho acerca da interação entre os PCs (-) e complexo RuBDQ (-).

5. CONCLUSÕES

Os pontos de carbono sintetizados neste trabalho, via irradiação micro-ondas utilizando gelatina, se demonstrou efetiva em sua obtenção, bem como exibiu a obtenção de PCs com excelentes propriedades e em um curto período tempo. A excitação dos pontos de carbono, seguindo as técnicas de espectroscopia de fluorescência, evidenciou que a emissão de fluorescência pelos PCs está diretamente relacionada ao comprimento de onda de excitação, exibindo maior intensidade quando excitados em 320nm.

As análises quanto a influência das variáveis tempo e pH, verificaram que o tempo de vida em geladeira altera o perfil de emissão devido ao princípio de aglomeração dos PCs do meio. O pH altera o perfil através das reações dos íons H^+ e OH^- com a superfície dos PCs alterando sua funcionalidade, demonstrando o pH ideal em torno de 7.

A microscopia de força atômica, demonstrou que através da metodologia empregada na obtenção dos PCs, produziu partículas com cerca de 10nm de diâmetro de superfície.

As condições investigadas para influência da temperatura demonstraram, correlação com a determinação do rendimento quântico dos PCs. O aumento da temperatura provoca transferências de energia resultando na diminuição linear do rendimento quântico de fluorescência. O tempo de vida de fluorescência também influenciado pela temperatura, o aumento da mesma resultou no aumento do tempo de vida para os PCs.

O potencial zeta, apresentaram um valor de -21mV, que corrobora com a carga dos grupos funcionais encontrados na superfície dos pontos de carbono. O valor negativo encontrado em sua superfície também demonstrou o potencial de interação dos pontos de carbono com espécies de carga de positiva.

As tendências evidenciadas, nos valores obtidos a partir dos mecanismos de supressão de fluorescência, demonstrou que ao depender da temperatura os PCs e o complexo RuBDQ, podem interagir de forma estática ou dinâmica. Os valores positivos encontrados para os parâmetros termodinâmicos, indicaram a existência de uma interação do tipo eletrostática.

As análises realizadas pela técnica de IR para interação entre os PCs e Complexo nitrosilo de Rutênio do tipo RuBDQ, demonstrou interações eletrostáticas entre as duas espécies, ocorrendo através do ligante nitrosil carregando positivamente, com os grupos carboxílicos na superfície dos PCs.

6. REFERÊNCIAS

- Burks, PT., Ford, PC. **Quantum dot photosensitizers**. Interactions with transition metal centers. Dalton Trans. 2012, 41 (42), 13030–13042.
- Bonturim., E. Luminescência. 2017. Disponível em: <http://nanoluminescent.blogspot.com/p/luminescencia.html>. Acesso em: 7 de junho de 2020.
- D'Amora., M., Giordani, S. Carbon Nanomaterials for Nanomedicine. Gianni., C. (ed). **Smart Nanoparticles for Biomedicine**. Elsevier. 2018, 103-113.
- Das R., Bandyopadhyay R., Pramanick P. **Carbon quantum dots from natural resource: A review**. Materials Today Chemistry. 2018, 8, 96-109.
- Demchenko, AP., *et al.* **Novel fluorescent carbonic nanomaterials for sensing and imaging**. Methods and applications in fluorescence. 2013, 1 (4), 1-17.
- Ferreira, HS., Rangel, MC. **Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise**. Química Nova. 2009, 32 (7), 1860-1870.
- Gao., C. Liu., Z. Chen, J. Yan, Z. **A novel fluorescent assay for oxytetracycline hydrochloride based on fluorescence quenching of water-soluble CdTe nanocrystals**. The journal of Biological and Chemical Luminescence. 2013, 28 (3), 378-383.
- Habiba, K., *et al.* **Fabrication of Nanomaterials by Pulsed**. Ahmed., W. Ali., Nasar (Ed.). **Manufacturing Nanostructures**. One central press (OCN). 2014, 2014. 263-392.
- Helland, A., Kastenholz, H. **Development of nanotechnology in light of sustainability**. Journal of Cleaner Production. 2008, 16 (8), 885-888.
- Lakowicz, JR. **Princípios de espectroscopia de fluorescência**. 3ª edição. Springer Science, 2006.
- Li, H. *et al.*, **Carbon nanodots: synthesis, properties and applications**. Journal of Dynamic Materials Chemistr. 2012, 22 (46), 24175–24478.
- Li, WM. Chen, SY. **Amphiphilically-modified gelatin nanoparticles: Self-assembly behavior, controlled biodegradability, and rapid cellular uptake for intracellular drug delivery**. Journal of Materials Chemistry. 2011, 21, 12381-12388.
- Li, X. *et al.* **Engineering surface states of carbon dots to achieve controllable luminescence for solid-luminescent composites and sensitive Be21 detection**. Scientific Reports. 2014, 4, 4976.
- Liang, Q. *et al.* **Easy synthesis of highly fluorescent carbon quantum dots from gelatin and their luminescent properties and applications**. ScienceDirect. CARBON. 2013, 60, 421 – 428.

- Lima, R C. **Toward an Understanding of Intermediate- and Short-Range Defects in ZnO Single Crystals. A Combined Experimental and Theoretical Study.** Journal. Physical. Chemistry A. 2018, 112 (38), 8970–8978.
- Lima, RG. *et al.* **Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photorelease by the $[\text{Ru}(\text{L})(\text{tpy})\text{NO}]^{3+}$ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation.** Inorganica Chimica Acta. 2006, 359 (8), 2543-2549.
- Machado, CE., *et al.* **Pontos Quânticos de Carbono: Síntese Química, Propriedades e Aplicações.** Revista Virtual de Química. 2015, 7 (4), 1306-1346.
- Mandal, P. *et al.* **Fluorescence turn-on and turn-off sensing of pesticides by carbon dot-based sensor†.** New Journal Of Chemistry. 2019, 43 (30), 12137-12151.
- Mazzeo, A., Santos, EGC. **Nanotecnologia e as células progenitoras adultas multipotentes na Medicina Reparativa: perspectivas terapêuticas.** Einstein (São Paulo). Vol.16, n4, p.1-626, 2018.
- Meeker., K. Ellis., AB. **Adsorption of Alkanolamines onto Semiconductor Surfaces: Cadmium Selenide Photoluminescence as a Probe of Binding and Film Reactivity toward Carbon Dioxid.** Journal Physical Chemistry B. 1999, 103 (6), 995-1001.
- Miranda, JDEB. **Nanopartículas de carbono fluorescentes para marcação e visualização de células.** Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2014. Dissertação de mestrado.
- Moraes, LS. **Carbon Dots: Síntese via carbonização hidrotérmica a partir de fontes proteicas e sua interação com sistemas biológicos.** Universidade Estadual de Campinas, 2016. Dissertação de Mestrado
- Moraes, MC. **Produção de Hidrolisados de Colágeno Visando Diferentes Aplicações Tecnológicas.** Universidade Estadual de Campinas, 2012. Dissertação de mestrado.
- Moreira, VA. **Síntese e caracterização de carbono dots com cuprizona e sua aplicação da determinação de CU(II) em águas pela atenuação da intensidade fluorescente.** Universidade Federal de Viçosa, 2017. Dissertação de Mestrado.
- Morris-Cohen, AJ. *et al.* **Model for Adsorption of Ligands to Colloidal Quantum Dots with Concentration-Dependent Surface Structure.** ACS NANO. 2012, 6 (1), 557-565.
- Nasrollahzadeh., M. *et al.* **An Introduction to Green Nanotechnology.** Kyzas., GZ. Mitropoulos., AC (ed). Interface Science and Technology. Elsevier, 2018, 145-198,
- Ng, SM. **Carbon Dots as Optical Nanoprobes for Biosensors.** Gopinath., S.C.B (ed). Nanobiosensors for Biomolecular Targeting. Elsevier, 2018, 269-295.
- Pinto, EP., *et al.* **O Microscópio de Força Atômica (AFM): importante ferramenta no estudo da morfologia de superfícies na escala nanométrica.** Estação Científica. 2013, 3 (2), 41-50.

- Philip., D.R. S., Subramanian. **Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability.** Biochemistry. 1981, 20(11), 3096-3101.
- Ray., SC. Jana., NR. **Application of Carbon-Based Nanomaterials as Drug and Gene Delivery Carrier.** Ray., SC. Jana., NR. (ed). Carbon Nanomaterials for Biological and Medical Applications. Elsevier, 2017, 163-203.
- Sagbas., S. Sahiner., N. **Carbon dots: preparation, properties, and application.** Khan., A. Jawaaid., M. Asiri., AM. (ed). Nanocarbon and its Composites. Woodhead Publishing. 2018, 551-576.
- Santos., J. M., *et al.* **Perspectivas de utilização de nanomateriais em nanodiagnostico.** Acta Farmacêutica Portuguesa. 2014, 3 (1), 3-14.
- Silva., JCGE., *et al.* **Analytical and bioanalytical applications of carbon dots.** Trends in Analytical Chemistry, 2011, 30 (8), 1327-1336.
- Souza., DRS. **Preparação e Caracterização de Pontos de Carbono e Material Carbonoso Nanoestruturado a Partir da Celulose e Nanocristais de Celulose.** Universidade Federal de Minas Gerais, 2017. Tese de doutorado.
- Souza., RC. **Síntese hidrotérmica de micro-ondas das nanoestruturas de α - Bi_2O_3 e $\text{Bi}_2\text{O}_2\text{CO}_3$ e estudo das propriedades e estruturais e eletroquímicas.** Universidade Federal de Uberlândia, 2016. Dissertação de mestrado.
- Sun., YP., *et al.* **Quantum-Sized Carbon Dots for Bright and Colorful Photoluminescence.** Journal of the American Chemical Society. 2006, 128 (24), 7756–7757.
- Valeur., B. **Molecular Fluorescence.** 2ª edição. Wiley-VHC. 2001.
- Vaz., R., *et al.* **Preparation of carbon dots and their optical characterization: An experiment of nanoscience for undergraduate course.** Química Nova. 2015, 38 (10), 1366-1373.
- Tang., J., *et al.* **Temperature-Dependent Fluorescence in Carbon Dots.** The Journal of Physical Chemistry. 2012, 116 (48), 25552–25557.
- Xiang., HJ. *et al.* **A multifunctional nanoplatform for lysosome targeted delivery of nitric oxide and photothermal therapy under 808 nm near-infrared light.** Journal of Materials Chemistry B. 2016, 4, 4667-4674.
- Xu., L. *et al.* **Temperature dependence of sensitized Er^{3+} luminescence in silicon-rich oxynitride films.** Nanoscale Research Letters. 2014, 9 (1), 489.