



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Química Fundamental
Programa de Pós-graduação em Química

Taciana Holanda Kunst

Síntese, Caracterização e Aplicação de *Carbon Quantum Dots* de papel

Recife

2018

Taciana Holanda Kunst

Síntese, Caracterização e Aplicação de *Carbon Quantum Dots* de papel

Trabalho de dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPE para obtenção do grau de Mestre.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Ana Paula Silveira Paim

Recife

2018

Catálogo na fonte
Bibliotecária Elaine Freitas CRB4-1790

K96d Kunst, Taciana Holanda
Síntese, caracterização e aplicação de carbon quantum dots de papel / Taciana Holanda Kunst. – 2018.
75 f.: fig., tab.

Orientadora: Ana Paula Silveira Paim
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química Fundamental. Recife, 2018. Inclui referências.

1. Química Analítica. 2. Carbon quantum dots. 3. Papel. 4. Micro-ondas. I. Paim, Ana Paula Silveira (orientadora). II. Título.

543

CDD (22. ed.)

UFPE-FQ 2019-19

TACIANA HOLANDA KUNST

Síntese, caracterização e aplicação de carbon quantum dots de papel.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovado em: 31/07/2018

BANCA EXAMINADORA

Profa. Ana Paula Silveira Paim (Orientadora)

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Raquel Milani

Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - Cetene

Prof. André Fernando Lavorante

Departamento de Química
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Agradecimentos

A Deus, por me dar saúde, forças e iluminação.

A Ana Paula Paim e Sergio Passos, pela orientação, apoio e amizade.

À família e aos amigos, pelo apoio e ajuda. Em especial, à minha mãe que me ensinou o significado da frase que costumava me dizer: *Nem tudo que a gente quer, a gente pode ter*; e me ensinou a lidar com ele.

À UFPE e ao PPG-Química pela oportunidade de realizar este mestrado.

Aos órgãos de fomento CNPq e FACEPE.

Aos professores, colegas, técnicos e funcionários do dQF, porque formam a base e os tijolos da construção do conhecimento que tenho.

Ao LAQIS/UFRPE, o BSTR/UFPE e o laboratório de biofísica química do CCS/UFPE, pela utilização dos fluorímetros. E ao LES pela utilização do espectrofotômetro de absorção UV-vis e pelo acolhimento.

Ao CETENE, o C-LABMU/PROPESP e Euzébio Skovroinski, pelas análises realizadas.

Resumo

Pontos quânticos de carbono (CQDs) são nanopartículas fluorescentes compostas principalmente de carbono, menos tóxicas e mais solúveis em água que os tradicionais pontos quânticos de semicondutores. Estes CQDs possuem diversas aplicações, incluindo imageamento celular e sensoriamento, com capacidade de detectar e quantificar espécies inorgânicas e orgânicas em concentrações tão pequenas quanto 2 nmol L^{-1} . No presente trabalho, foi realizada a síntese de CQDs a partir de papel e água utilizando irradiação de micro-ondas, posteriormente, o material obtido foi caracterizado e aplicado na quantificação de quercetina para análise em amostras de suco e chá. A síntese foi otimizada por um planejamento fatorial 2^3 variando-se a potência de irradiação do micro-ondas, o tempo de aquecimento e a massa de papel empregada na síntese. Obteve-se a melhor condição com 200 W de potência, 30 minutos de aquecimento e 1 g de papel. Em seguida, as propriedades óticas e estruturais desses CQDs foram avaliadas, apresentando emissão dependente do comprimento de onda de excitação, deslocamento de Stokes de 96 nm (excitação em 400 nm), rendimento quântico de 9%, presença de espécies interferentes nos espectros de emissão (fluoróforo do papel e água), estabilidade térmica até $115 \text{ }^\circ\text{C}$, potencial zeta de $-5,92 \text{ mV}$, tamanho em torno de 11,2 nm e estrutura parcialmente organizada, mas não grafítica. As condições de análise otimizadas para posterior aplicação dos CQDs foram: 5% (v/v) da solução coloidal de CQDs, solução tampão TRIS em pH 8 e tempo de reação de 3 minutos. Com o método otimizado, estimaram-se as figuras de mérito: limites de detecção e quantificação de 1,0 e $3,4 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, faixa linear de 10 a 100 mg L^{-1} de quercetina, R^2 de 0,993 e RSD de 3,7% (n=9). A quercetina foi analisada em amostras de chá e suco obtendo-se recuperações entre 112 e 155%.

Palavras-chave: *Carbon quantum dots*. Papel. Micro-ondas. Quercetina. Sondas fluorescentes.

Abstract

Carbon quantum dots (CQDs) are fluorescent nanoparticles constituted mainly of carbon and exhibits lower toxicity and higher water solubility than traditional semiconductor quantum dots. These CQDs have several applications including cell imaging and sensing and can also detect and quantify inorganic and organic species at concentrations as small as 2 nmol L^{-1} . In this work, the CQDs were synthesized from paper and water through microwave irradiation. The material was characterized and applied to the quantification of quercetin for further analysis in juice and tea samples. The synthesis was optimized by a 2^3 factorial design for microwave irradiation power, heating time and mass of paper used in the synthesis. The best condition was obtained with 200 W of power, 30 minutes of heating and 1 g of paper. Afterwards, the optical and structural properties of these CQDs were evaluated exhibiting dependent emission on its excitation, Stokes shift of 96 nm (excitation at 400 nm), quantum yield of 9%, presence of interfering species to the emission spectra (paper fluorophore and water), thermal stability up to $115 \text{ }^\circ\text{C}$, zeta potential of -5.92 mV , particle sizes around 11,2 nm and structure partially organized but not graphitic. The optimized analysis conditions for quercetin determination using CQDs were: 5% (v/v) of the CQDs colloidal solution, TRIS buffer solution at pH 8 and reaction time of 3 minutes. Afterwards, the limits of detection and quantification were found to be 1.0 and 3.4 mg L^{-1} , respectively, the linear range was from 10 to 100 mg L^{-1} of quercetin, R^2 of 0.993 and RSD of 3.7% ($n = 9$). Quercetin was analyzed in samples of tea and juice reaching recoveries between 112 and 155%.

Keywords: Carbon quantum dots. Paper. Microwaves. Quercetin. Fluorescent probes.

Lista de Figuras

Figura 1	– Estrutura da quercetina.....	17
Figura 2	– Ilustração dos mecanismos de fluorescência em GQDs (semelhante ao dos QDs) e em CQDs.....	29
Figura 3	– Espectros de fluorescência de água Milli-Q com excitações em 250 (1), 260 (2), 270 (3), 280 (4) e 290 (5) nm.....	31
Figura 4	– Espectros de (a) absorção e (b) emissão com excitação em 400 nm das sínteses com diferentes condições de potência (P), tempo (t) e massa (m), de acordo com os níveis superior (+) ou inferior (-) do planejamento.....	42
Figura 5	– Produtos de síntese, após o aquecimento por micro-ondas, sem (esquerda) e com (direita) formação de CQDs.....	43
Figura 6	– Espectros de (a) absorção e (b) emissão (excitação em 400 nm) da condição de síntese na expansão do planejamento fatorial: (+)(++)(+).....	44
Figura 7	– Espectros de (a) absorção e (b) emissão (excitação em 400 nm) dos CQDs sintetizados na condição (+)(+)(+) (potência de 200 W, durante 30 min. com 1 g de papel) e aquecidos em banho de óleo por 0, 1, 2 ou 4 horas.....	45
Figura 8	– Espectros de emissão (excitação em 400 nm) das sínteses obtidas por centrifugação ou decantação.....	46
Figura 9	– Emissões (excitação em 400 nm) das sínteses feitas com água destilada ou ultrapura.....	47
Figura 10	– Espectros de (a) absorção e (b) emissão (excitação em 400 nm) das sínteses feitas com papel novo e com papel remanescente da síntese anterior.....	48
Figura 11	– Espectros de (a) absorção e (b) emissão (excitação em 400 nm) de sínteses feitas com papel ofício usado, com papel de filtro e com celulose.....	49

Figura 12 – (a) Espectros de absorção, excitação e emissão dos CQDs produzidos na condição de síntese escolhida. (b) Espectros de emissão dos CQDs excitados em diferentes comprimentos de onda (250 – 600 nm). (c) Espectros de emissão de (b) normalizados, exceto o espectro excitado em 250 nm.....	50
Figura 13 – Espectros de emissão (a) do fluoróforo proveniente do papel com excitações de 250 - 600 nm e (b) da água com excitações de 250 - 550 nm.....	51
Figura 14 – Espectros de emissão (excitação em 400 nm) variando o pH da solução CQDs em concentrações de CQDs de (a) 10, (b) 1, (c) 0,1, (d) 0,01 e (e) 0,001%. (f) Intensidades, em 485 nm, de cada um dos espectros versus a concentração dos CQDs.....	53
Figura 15 – Espectros de emissão (exc. 400 nm) da síntese repetida em dias diferentes (15, 16 e 24).....	54
Figura 16 – Análises térmicas dos CQDs em atmosfera de N ₂	55
Figura 17 – ¹ H NMR dos CQDs (solvente: D ₂ O).....	56
Figura 18 – Difrátogramas de raios-X de (a) CQDs; (b) a - grafite, b - grafite moído, e c - grafite moído e recozido; (c) a - nanopartículas de TiO ₂ , b - TiO ₂ anatase, c - TiO ₂ broquite e d - TiO ₂ rutilo; (d) a - bagaço de cana-de-açúcar, b - celulose, e c - celulose nanocristalina.....	57
Figura 19 – Imagens de microscopia eletrônica da solução obtida da síntese de CQDs e histograma de distribuição de tamanhos dos CQDs.....	58
Figura 20 – (a) Coluna cromatográfica com CQDs durante a separação. (b) Espectros de emissão (excitação em 400 nm) de 6 frações de águas de lavagem (1 a 6) que saíram da coluna durante a lavagem da mesma. (c) Espectros de emissão (exc. 400 nm) de 6 frações coletadas (1 a 6) na separação dos CQDs.....	59
Figura 21 – Espectros de emissão (excitação em 400 nm) dos CQDs (a) solubilizados em diferentes solventes e (b) dos respectivos precipitados ressolubilizados em água.....	60

Figura 22 – Gráfico dos valores de D em relação ao tempo de medida, para cada condição de análise variada entre [CQDs] de 1, 3 e 5% e pHs de 5, 6, 7 e 8.....	62
Figura 23 – Gráfico de D versus concentração de quercetina das curvas feitas nas possíveis melhores condições de análise.....	63
Figura 24 – (a) Espectros de emissão (excitação em 400 nm) das análises dos padrões de quercetina em concentrações de 10 a 1000 mg L ⁻¹ . (b) Valores de D das intensidades dos espectros de (a) em 485 nm versus a concentração de quercetina. (c) Curva analítica traçada para a faixa linear.....	64

Lista de Tabelas

- Tabela 1** – Parâmetros avaliados e os níveis superiores e inferiores no planejamento fatorial 2^3 para otimização da síntese de CQDs..... 37
- Tabela 2** – Parâmetros avaliados na determinação de quercetina usando CQDs. 40
- Tabela 3** – Valores de recuperação encontrados para as amostras analisadas..... 65

Lista de abreviaturas e siglas

AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> (Microscopia de força atômica)
CQD	<i>Carbon Quantum Dots</i> (Pontos quânticos de carbono)
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Espalhamento dinâmico de luz)
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> (Calorimetria diferencial de varredura)
GCQD	<i>Graphene Carbon Quantum Dots</i> (Pontos quânticos de carbono grafíticos)
GQD	<i>Graphene Quantum Dots</i> (Pontos quânticos de grafeno)
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i> (Microscopia eletrônica de transmissão)
LD	<i>Limit of Detection</i> (Limite de detecção)
LED	<i>Light-emitting Diode</i> (Diodo emissor de luz)
LQ	<i>Limit of Quantification</i> (Limite de quantificação)
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Ressonância magnética nuclear)
PEG ₆₀₀₀	Polietilenoglicol 6000
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i> (Desvio padrão relativo)
SAED	<i>Selected Area Electron Diffraction</i> (Difração eletrônica de área selecionada)
SERS	<i>Surface-enhanced Raman Spectroscopy</i> (Espectroscopia Raman amplificada por superfície)
TBHQ	Terc-butil-hidroquinona
TGA	<i>Thermogravimetric Analysis</i> (Análise termogravimétrica)

- XPS *X-ray Photoelectron Spectroscopy* (Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X)
- XRD *X-ray Diffraction* (Difração de raios X)

Sumário

1	Introdução	15
2	Objetivos.....	18
2.1	Gerais.....	18
2.2	Específicos.....	18
3	Revisão bibliográfica	19
3.1	Sínteses de nanopartículas luminescentes	19
3.2	Estrutura e mecanismo de luminescência.....	28
3.3	Autofluorescência da água.....	30
3.4	Metodologias de análise de quercetina.....	32
4	Materiais e procedimentos.....	36
4.1	Reagentes e soluções	36
4.2	Equipamentos	36
4.3	Avaliação das condições de síntese dos CQDs	37
4.4	Síntese de CQDs otimizada	38
4.5	Avaliação do emprego de água destilada e ultrapura no preparo dos CQDs	38
4.6	Síntese com papel residual	39
4.7	Preparação dos CQDs para as caracterizações	39
4.8	Medição dos tamanhos através da microscopia.....	39
4.9	Solubilidade dos CQDs em outros solventes.....	40
4.10	Otimização das condições de análise de quercetina	40
4.11	Aplicação dos CQDs na determinação de quercetina.....	41
5	Resultados e discussão.....	42

5.1	Avaliação das condições de síntese dos CQDs	42
5.2	Avaliação do emprego de água destilada e ultrapura no preparo dos CQDs	47
5.3	Síntese com papel residual	47
5.4	Avaliação da influência da fonte de celulose na fluorescência dos CQDs	48
5.5	Caracterizações óticas dos CQDs	49
5.6	Outras caracterizações dos CQDs.....	55
5.7	Separação cromatográfica.....	58
5.8	Solubilidade dos CQDs em outros solventes.....	60
5.9	Otimização das condições de análise de quercetina	61
5.10	Figuras de mérito para a análise de quercetina.....	64
5.11	Análise de amostras reais e determinações dos valores de recuperação	65
6	Conclusões	66
7	Perspectivas	67
	Referências	69

1 Introdução

Pontos quânticos (em inglês, *quantum dots*, QDs) são estruturas cristalinas de semicondutores em escala nanométrica (1 - 100 nm) que apresentam propriedades únicas, intermediárias entre a escala macroscópica e a molecular, as quais são dependentes do tamanho da partícula (BERA et al., 2010; MANSUR, 2010). Se esses pontos quânticos fossem compostos principalmente por carbono, poderiam ser chamados de pontos quânticos de carbono (em inglês, *carbon quantum dots*, CQDs). Estes, foram observados pela primeira vez em 2004 por XU et al. (2004) quando, durante a purificação por eletroforese de nanotubos de carbono provenientes da fuligem produzida por arco-descarga, foi observada uma banda que, sob luz ultravioleta, apresentava fluorescência de diferentes cores. Desde então, uma grande quantidade de trabalhos surgiu na literatura sobre as várias sínteses, os diferentes tipos de CQDs e nanomateriais afins, e as diversas aplicações dessas nanopartículas.

São diversos os tipos de nanomateriais de carbono já caracterizados: grafeno, nanotubos de carbono com uma parede (SWCNT, do inglês *single-walled carbon nanotubes*) ou várias paredes (MWCNT, do inglês *multiwalled carbon nanotubes*), nanochifres de carbono de uma parede (SWNH, do inglês *single-walled carbon nanohorns*), esferas de carbono tipo cebola (OLC, do inglês *onion-like carbon*), nanotubos tipo bambu, nanofibras de carbono, fulerenos, nanodiamantes, pontos quânticos de grafeno (GQD, do inglês *graphene quantum dots*), pontos quânticos de carbono grafíticos (GCQD, do inglês *graphitic carbon quantum dots*) e pontos quânticos de carbono (DA SILVA; GONÇALVES, 2011; GEORGAKILAS et al., 2015).

São diversas as aplicações dadas a tais pontos quânticos: imageamento ou marcação celular, carreamento de drogas, nanocompósito com polímeros, fabricação de LED (diodo emissor de luz), foto-redução de prata, tinta para impressão e sensoriamento de íons ou moléculas, como a quercetina (ALGARRA et al., 2014; DE; KARAK, 2013; DU et al., 2013; GONÇALVES et al., 2010; GUO et al., 2013; LI et al., 2011; LIU et al., 2014; MENON et al., 2016; PHILIPPIDIS et al., 2013; QIN et al., 2013; SONG et al., 2014; SUN et al., 2013; WANG; WANG; CHEN, 2012; WANG et al., 2012; XIAO

et al., 2013; YAZID et al., 2013; YUE et al., 2016; ZHANG et al., 2013; ZHU et al., 2013).

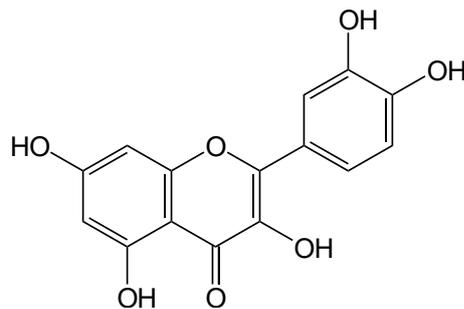
Também são várias as técnicas de síntese: ultrassom, plasma, ablação a laser, eletroquímica, nanoprecipitação seguida de carbonização e hidrotermal em chapa, autoclave ou micro-ondas. De acordo com a técnica empregada, podem ser usados diferentes materiais de partida: compostos moleculares orgânicos ou inorgânicos ou estruturas maiores. O citrato de sódio é um exemplo de molécula que pode formar novas ligações para produzir estruturas nanométricas e a fibra de cabelo é um exemplo de estrutura micrométrica que pode ser quebrada para formar uma estrutura nanométrica; estes dois exemplos representam duas abordagens de síntese que são conhecidas como *bottom-up* e *top-down*, respectivamente (ALGARRA et al., 2014; DE; KARAK, 2013; DONG et al., 2012; DU et al., 2013; GONÇALVES et al., 2010; GUO et al., 2013; HU et al., 2009; LI et al., 2011; LIU et al., 2014; MENON et al., 2016; PHILIPPIDIS et al., 2013; QIN et al., 2013; SONG et al., 2014; SUN et al., 2013; WANG; WANG; CHEN, 2012; WANG et al., 2012; XIAO et al., 2013; YAZID et al., 2013; YUE et al., 2016; ZHANG et al., 2013; ZHU et al., 2013).

Em relação aos QDs tradicionais de semicondutores, os CQDs apresentam as vantagens de serem menos tóxicos e mais biocompatíveis sem necessidade de passivação ou modificação de superfície. Além destas vantagens, os CQDs também são melhores no que diz respeito à solubilidade em água, à reatividade (são quimicamente mais inertes), aos custos com a síntese e à fotoestabilidade (ALGARRA et al., 2014).

Diante de tal vantagem sobre a toxicidade e da ampla gama de precursores e metodologias de síntese, é conveniente a seleção de um método de síntese de CQDs simples, rápido e que utilize precursores atóxicos e sustentáveis. WEI et al. (2013) e WEI et al. (2014) propuseram métodos de síntese de CQDs que utilizaram como precursores água e papel de escritório usado (o qual seria descartado), submetendo-o a carbonização em ar seguida de dispersão em água, com tempo de síntese maior que 1 hora, ou submetendo o papel a aquecimento com água em autoclave, levando a uma síntese com duração de pelo menos 10 horas. A utilização destes precursores torna o método verde, pois são atóxicos e renováveis e é também uma forma de reciclagem.

Flavonoide é um grupo de compostos fenólicos derivados da 2-fenilbenzopirona e cada flavonoide que compõe este grupo é diferenciado pelos grupos substituintes neste composto-base. A quercetina é o flavonoide que apresenta 5 substituições por grupos hidroxila (**Figura 1**) e tem diferentes atividades biológicas que a fazem um importante nutriente para a alimentação. Entre tais atividades biológicas listam-se atividades antioxidante, antiúlcera, anticâncer, antialérgica, antiviral, anti-inflamatória e até preventiva da catarata e de doença coronariana. A quercetina está presente em produtos naturais, como frutas e vegetais, e apresenta maiores teores em cebola, brócolis, maçã e chás (FORMICA; REGELSON, 1995; XIAO et al., 2013).

Figura 1 – Estrutura da quercetina.



Fonte: autora (2018)

Neste trabalho, foi acolhida a ideia proposta por WEI et al., (2013) e WEI et al. (2014) de sintetizar CQDs a partir de dois precursores de baixo custo, atóxicos e renováveis: papel usado de escritório e água. Entretanto, nesses trabalhos foram utilizadas técnicas de queima em ar e autoclave, levando a sínteses mais demoradas; já no presente trabalho foi proposta a utilização de um forno de micro-ondas afim de diminuir a duração da síntese, originando um método simples e rápido. E os CQDs obtidos foram empregados como sondas fluorescentes para determinação de quercetina, através de um método de supressão de fluorescência.

2 Objetivos

2.1 Gerais

Sintetizar CQDs a partir de papel utilizando irradiação de micro-ondas e empregá-los na determinação de quercetina, em bebidas.

2.2 Específicos

Otimizar as condições de síntese dos CQDs utilizando um planejamento fatorial 2^3 , variando a potência da irradiação de micro-ondas, o tempo de aquecimento e a massa de papel empregada na síntese.

Realizar caracterizações óticas e estruturais destes CQDs.

Otimizar as condições de análise na determinação de quercetina e determinar as figuras de mérito do método a ser desenvolvido.

Empregar o método em amostras reais.

3 Revisão bibliográfica

3.1 Sínteses de nanopartículas luminescentes

Corantes e fluoróforos orgânicos utilizados para marcação celular são moléculas capazes de colorir e realçar determinadas regiões ou biomoléculas dentro da célula. Existe uma ampla gama destes materiais e diante disto surgiram os pontos quânticos (QDs), que são nanocristais de semicondutores (1 - 10 nm, em geral <100 nm) com propriedades entre o nível macroscópico e o molecular, relacionadas ao tamanho do cristal (BERA et al., 2010; MANSUR, 2010; RESCH-GENGER et al., 2008; WAGGONER, 2006).

Em comparação ao tamanho macroscópico, os QDs são considerados como zero-dimensionais, pois possuem tamanhos tão pequenos e uma quantidade de átomos tão reduzida que as energias das densidades de estados são quantizadas e tendem a seguir o modelo da partícula na caixa (BERA et al., 2010; MANSUR, 2010). Além deste efeito quântico sofrido no interior do nanocristal, já que estas estruturas são muito pequenas, a proporção entre átomos de superfície e do interior se torna maior, o que influencia diretamente sua energia livre. São estes dois motivos os principais responsáveis pelas propriedades dos QDs serem dependentes de seu tamanho; e também por causa deles, qualquer material pode ter um tamanho abaixo do qual suas propriedades óticas são significativamente dependentes do tamanho, incluindo materiais carbonáceos (ALIVISATOS, 1996). Assim, esta nova classe de marcadores (de pontos quânticos) se destacaram por apresentarem vantagens sobre os marcadores já conhecidos, pois possuem espectro de emissão estreito e majoritariamente simétrico, faixa de emissão ajustável através do tamanho das nanopartículas, grande deslocamento de Stokes¹, tempos de vida de emissão maiores, satisfatória solubilidade em meio aquoso de acordo com o estabilizante ou revestimento utilizado e maior fotoestabilidade (GONÇALVES et al., 2010; RESCH-GENGER et al., 2008; WAGGONER, 2006).

¹ **Deslocamento de Stokes** Separação entre comprimento de onda de excitação e de emissão.

Já foram preparados diferentes QDs, tais como: tipo II-VI (ZnS, CdSe, HgTe), tipo III-V (InAs) ou tipo IV-VI (PbSe). Além da variação do tipo de semicondutor, pode haver variação de tipos de acordo com o tipo de revestimento: orgânico (moléculas que agem como estabilizantes) ou com uma camada inorgânica (chamados sistemas *core-shell*, que servem para aumentar fotoestabilidade e luminescência), podendo apresentar fluorescência desde o ultravioleta até o infravermelho, dependendo do material (MANSUR, 2010).

Em 2004, XU et al. (2004) observaram durante a eletroforese de nanotubos de carbono, uma banda que apresentava fluorescência de diferentes cores, esta banda foi separada em três frações que luminesciam verde-azul, amarelo e laranja e através de AFM mostraram que tais partículas tinham uma distribuição de tamanhos centrada em, aproximadamente, 1 nm. Desde então, mesmo com a grande variedade de QDs já sintetizados houve um grande investimento no estudo dos CQDs, pois foi visto que esta nova classe de nanopartículas se destacavam porque apresentam propriedades semelhantes às dos QDs, mas com solubilidade superior em meio aquoso, são quimicamente inertes, apresentam baixo custo de síntese, são mais estáveis em relação à fotodegradação e, especialmente, por sua menor toxicidade pois não contêm metais pesados em sua estrutura, apesar de apresentar espectro de emissão mais largo e luminescência menor, mas ainda assim, razoável (ALGARRA et al., 2014; DE; KARAK, 2013; YAZID et al., 2013).

Surgiram diferentes métodos de síntese de CQDs, desde de métodos que utilizaram uma técnica de aquecimento muito simples até o emprego de equipamentos mais sofisticados, e o uso de alguns precursores inesperados: ovos, farinha ou mesmo cabelo. Dentre os trabalhos produzidos, a abordagem utilizada na formação das nanopartículas pode ser dividida em dois tipos: a *bottom-up* e a *top-down*. A primeira, é caracterizada pela formação de ligações durante o processo de formação das nanopartículas, onde moléculas se ligam para formar estruturas maiores; a segunda, é caracterizada pela quebra de ligações, pois durante o processo de formação das nanopartículas, grandes estruturas são fragmentadas a pequenas partículas.

GUO et al. (2013), por exemplo, sintetizaram nanopartículas de carbono fluorescentes a partir de um processo *bottom-up* com citrato de sódio e carbonato de amônio submetidos à autoclave por 4 h a 180 °C e depois à diálise, obtendo partículas de 1,59 nm com carbonos hibridizados principalmente em sp^2 (observado por XPS). O rendimento quântico de fluorescência foi de 68,22%, espectros coletados apresentaram bandas de absorção em 235 e 340 nm, bandas de excitação e emissão em 340 nm e 435 nm, respectivamente, largura à meia-altura de 68 nm e com espectro de emissão independente do comprimento de onda de excitação, o que é uma característica incomum às sínteses de CQDs. As nanopartículas foram aplicadas na quantificação de mercúrio II em água.

Em contrapartida, DE e KARAK (2013) produziram CQDs a partir de suco de banana por uma abordagem *top-down* levando o suco a um forno por 4 horas à 150 °C seguido de filtração, centrifugação com etanol e evaporação à vácuo. As partículas obtidas foram determinadas como pobres em cristalinidade (segundo XRD e SAED), com tamanhos em torno de 3 nm e rendimento quântico de 8,95%; foi observada absorção em 283 nm com uma cauda varrendo o visível, excitação e emissão em 360 nm e 460 nm, respectivamente, com emissão dependente de sua excitação e as partículas puderam ser, então, aplicadas em detecção biológica.

Foram utilizados métodos de síntese hidrotermais, seja com abordagem *bottom-up* ou *top-down*. DONG et al. (2012) sintetizaram pontos quânticos de grafeno (GQDs) a partir de ácido cítrico em uma manta aquecedora. A mistura reacional foi mantida por 30 minutos em uma temperatura de 200 °C, em seguida, houve um ajuste do pH da solução resultante. Na caracterização ótica, foi observada uma banda em 362 nm referente tanto à absorção quanto à excitação, e uma banda de emissão em 460 nm não dependente da excitação e com rendimento quântico de 9%. Já em relação à caracterização estrutural, foi observado por XRD estrutura de grafite, e por AFM foram observadas folhas de tamanhos de cerca de 15 nm com alturas de 1,4 nm.

SONG et al. (2014) e ZHU et al. (2013) sintetizaram partículas de ácido cítrico e etilenodiamina em autoclave à 200 °C por 5 h com diálise em seguida. As partículas obtidas tinham estrutura amorfa com carbonos hibridizados em sp^2 e sp^3 , segundo

avaliações por TEM, espectroscopia Raman, XRD e ^1H e ^{13}C NMR. Os espectros de absorção, excitação e emissão mostraram bandas em 344 nm, 360 nm e 443 nm, respectivamente; a emissão se mostrou dependente do comprimento de onda de excitação e com rendimento quântico de 60%. O tamanho das partículas foi medido por AFM e ficou em torno de 2,81 nm e foram aplicadas em nanocompósitos com polímeros, tintas fluorescentes para impressão e na detecção de ferro III.

ALGARRA et al. (2014) produziram CQDs de formaldeído em um reator de autoclave submetido a uma temperatura de 180 °C por 24 h, a solução resultante foi centrifugada e evaporada à vácuo. Sob a excitação de 360 nm, a emissão foi observada em 440 nm. O tamanho médio das partículas sintetizadas foi de 12,5 nm segundo análise por DLS, e foram utilizadas no imageamento celular *in vitro*.

SUN et al. (2013) fizeram CQDs com estrutura amorfa, segundo o XRD e a espectroscopia Raman realizados, usando como precursores fibra de cabelo e ácido sulfúrico aquecidos em chapa por 24 h. Após o aquecimento, houve sonicação, ajuste de pH, filtração e diálise. As temperaturas de síntese testadas foram 40, 100 e 140 °C, apresentando bandas de absorção em 323, 300 e 295 nm, bandas de excitação em 330, 353 e 369 nm e bandas de emissão em 383, 450 e 470 nm, respectivamente. Os espectros de emissão se mostraram dependentes da excitação. Os CQDs aquecidos à 40 °C apresentaram maior rendimento quântico (11,1%), menor largura de emissão (51 nm) e maior tamanho de partícula (visualizadas por TEM): 7,5 nm, enquanto os aquecidos a 100 °C e 140 °C apresentaram tamanhos de 4,2 nm e 3,1 nm, respectivamente. Para aplicação, foi feito o bioimageamento em células HeLa e os CQDs apresentaram baixa citotoxicidade.

Ainda com métodos hidrotermais, mais especificamente com irradiação de micro-ondas e abordagem *bottom-up*, YUE et al. (2016) utilizaram como precursores o ácido cítrico e a etilenodiamina, assim como SONG et al. (2014) e ZHU et al. (2013), mas propuseram uma metodologia com tempo de síntese muito menor devido à utilização de irradiação de micro-ondas. Na síntese por autoclave o tempo de aquecimento foi de 5 h, por micro-ondas o tempo total foi de 4 min., sendo 2 min. em potência média e mais 2 min. em potência alta. Após a etapa no micro-ondas, foi feita

uma sonicação com etanol, centrifugação, secagem e congelamento. O espectro de absorção destas nanopartículas apresentou uma banda em 230 e outra em 360 nm, e o espectro de excitação apresentou uma banda na mesma região das nanopartículas produzidas por autoclave, em 360 nm. Já a emissão apresentou um comportamento diferente das sintetizadas por autoclave, pois por este método com micro-ondas a emissão não varia com o comprimento de onda de excitação e apresenta uma banda em 455 nm. Os tamanhos encontrados ficaram entre 2,0 e 5,0 nm, valores em torno da média encontrada por SONG et al. (2014) e ZHU et al. (2013). Como aplicação, foi feita a determinação do conservante alimentício terc-butil-hidroquinona (TBHQ) em óleo comestível através da complexação das nanopartículas com ferro III, como já visto por SONG et al. (2014) que mostraram que este tipo de nanopartículas complexam com ferro III.

LIU et al. (2014) realizaram a síntese de GCQDs a partir de dietilenoglicol, sacarose e ácido sulfúrico em forno de micro-ondas doméstico a 750 W por 50 segundos, com posterior centrifugação e diálise. Foi observada grafitização parcial nas nanopartículas, por XRD e SAED, e o tamanho observado foi de 5 nm. Para uma emissão em 517 nm o rendimento obtido foi de 2,4% e a largura à meia altura desta banda foi de 80 nm; para tal, a excitação se deu em 360 nm. Além disso, a emissão se mostrou independente da excitação. As bandas de absorção se apresentaram em 282 e 320 nm. E a aplicação destes GCQDs foi feita em imageamento celular *in vitro*.

PHILIPPIDIS et al. (2013) produziram CQDs sem características gráficas ou carbonos sp^2 , segundo o SERS realizado. O precursor foi L-arginina, a qual foi aquecida com irradiação de micro-ondas de 800 W de potência por 1 min., em seguida a mistura foi filtrada, separada por cromatografia de permeação em gel e submetida a diálise. Estes CQDs também foram preparados com modificação de superfície, através da reação entre os CQDs e ácido fólico (ativado por 16 h e filtrado) por 24 h, e em seguida as nanopartículas modificadas foram submetidas ao mesmo processo pós-síntese. O espectro de absorção, para os CQDs não modificados, mostrou-se intenso no UV com um ombro, um pico e uma cauda que se estende até o visível, e para os CQDs modificados, mostrou uma banda em 260 e outra em 365 nm. A excitação para o CQD

não modificado foi em 338 nm e a emissão em 404 nm. Para os CQDs modificados, a excitação foi em 360 nm e a emissão em 458 nm, evidenciando um deslocamento para a região do vermelho no espectro, devido à modificação. O tamanho das nanopartículas foi de 27 nm e 21 nm para os CQDs não modificados e modificado, respectivamente, sugerindo que a falta de modificação da superfície pode causar aglomeração. Os CQDs não modificados indicaram que podem ser aplicados na detecção de cobalto, níquel e cálcio, na biomarcação e bioimageamento e na fotoredução de prata, já os CQDs modificados apresentaram potencial para bioimageamento.

DU et al. (2013) também utilizaram ácido cítrico e etilenodiamina como precursores e irradiaram com micro-ondas para propor uma metodologia ainda mais rápida que as de YUE et al. (2016), SONG et al. (2014) e ZHU et al. (2013). As nanopartículas foram preparadas com apenas 2 minutos de síntese e uma potência de 720 W. Após a síntese foi feita diálise, precipitação e lavagem com etanol, secagem à vácuo e redispersão em solução tampão pH 7,4. Foram obtidas partículas com rendimento quântico de 43,8%, espectro de absorção com bandas em 240 e 360 nm (esta última, é próxima ou igual as bandas das outras duas metodologias), excitação em 360 nm (igual as outras metodologias) e emissão em 457 nm (cada metodologia teve um valor diferente) o qual não varia com a excitação até o comprimento de onda de 400 nm. O tamanho das partículas ficou em torno de 3 nm, condizente às outras metodologias. As aplicações foram para sonda seletiva de mercúrio II e, a partir das partículas complexadas com o mercúrio, detecção altamente seletiva de iodeto em urina utilizando a restauração da fluorescência.

XIAO et al. (2013) sintetizaram nanopartículas a partir de líquido iônico e água em um forno de micro-ondas doméstico durante 75 min. a 700 W seguido de centrifugação. Tamanhos de 4,25 nm de diâmetro foram observados. Como resultado, obtiveram absorção larga até cerca de 350 nm, excitação em 354 nm, emissão em 435 nm dependente da excitação e rendimento quântico de 5,18%. As nanopartículas foram utilizadas como sonda de quercetina que poderia ser aplicada na determinação direta em fluidos biológicos e amostras ambientais.

Já para a abordagem *top-down* usando irradiação de micro-ondas, WANG et al. (2012), realizaram a síntese de CQDs a partir das cinzas da membrana de um ovo de galinha (carbonizada por 2 h em mufla a 400 °C) e hidróxido de sódio, com 5 minutos de irradiação, sem especificar a potência utilizada, em seguida, houve centrifugação e diálise. As partículas obtidas mediam cerca de 5 nm, com fluorescência em 450 nm e rendimento quântico de 14%, quando excitadas em 275 nm. Os CQDs foram empregados na detecção de glutathione, através de recuperação de fluorescência depois da complexação dos CQDs com cobre II.

MENON et al. (2016), prepararam CQDs com mel, PEG₆₀₀₀ e irradiação de micro-ondas com 800 W durante 10 a 20 minutos, seguido de repetidas lavagens com água e ressuspensão em solução etanólica. Tais CQDs tinham tamanhos de 5,57 nm, absorveram em 290 nm e emitiram em 520 nm quando excitados em 400 nm. A aplicação destes CQDs foi dada na determinação de nitrito em água, leite e solo, através de aumento de fluorescência (*enhancement*), o que é bastante incomum, pois geralmente os trabalhos obtêm diminuição de fluorescência (*quenching*).

QIN et al. (2013) sintetizaram GCQDs de farinha usando aquecimento em forno de micro-ondas por 20 minutos a 180 °C; depois centrifugaram e secaram à vácuo. Os GCQDs de apenas 1,0 a 4,0 nm apresentaram, por XPS, carbonos grafíticos e a faceta (1 0 0) do grafite foi visualizada em HRTEM. Seus espectros de absorção, excitação e emissão apresentaram bandas em 288 nm, 365 nm e 442 nm, respectivamente, com rendimento de 5,4% e emissão dependente da excitação. Estes GCQDs foram, então, usados na determinação de mercúrio II em águas de lagos.

WEI et al. (2013) produziram pontos quânticos de carbono a partir das cinzas de papel impresso que seria descartado, o qual foi queimado ao ar. As cinzas foram sonicadas durante 1 hora em água, a mistura foi filtrada, centrifugada e submetida a diálise por 2 dias. Os CQDs apresentaram tamanhos de, em média, 3 nm de diâmetro e exibiram certa cristalinidade para o XRD realizado. O espectro de absorção apresentou um pico em 263 nm e os espectros de emissão se mostraram dependentes da excitação com um deslocamento do pico de emissão de 405 para 560 nm, quando o comprimento de onda de excitação foi variado de 300 para 500 nm. A emissão em 350 nm apresentou

rendimento quântico de 9,3%. Tais pontos quânticos foram, então, aplicados no imageamento de células tumorais.

No ano seguinte, WEI et al. (2014) propuseram uma síntese para os mesmos CQDs produzidos a partir de papel, de forma mais reprodutível através da utilização de autoclave como forma de aquecimento. Assim, a síntese foi realizada a partir de papel impresso que seria descartado e água, submetendo-os à sonicação durante 30 minutos e em seguida à autoclave por 10 horas em uma temperatura de 180 °C. Após a síntese, a mistura foi submetida a filtração, centrifugação em 16 000 rpm e diálise por 2 dias. Diferentemente do trabalho anterior, a estrutura dos CQDs foi considerada amorfa, apesar de exibir alguns sinais alargados no XRD, e o tamanho médio dos pontos quânticos se apresentou ligeiramente maior: 4,5 nm. O espectro de absorção apresentou um pico em 278 nm, o espectro de excitação em 357 nm e o de emissão em 449 nm, quando excitado em 365 nm, mas dependente da excitação. O rendimento quântico, para a emissão com excitação em 360 nm, foi de 10,8%. E a aplicação neste trabalho também foi dada em imageamento celular.

Além destes métodos hidrotermais, existem também métodos de síntese que utilizam ultrassom, plasma, ablação a laser, eletroquímica e nanoprecipitação e carbonização. LI et al. (2011) realizaram duas sínteses de CQDs de glicose em ultrassom por 4 h, uma com glicose e ácido clorídrico e outra com glicose e hidróxido de sódio. O pós-síntese dos CQDs feitos com HCl foi apenas a secagem a 80 °C por 6 h e o dos CQDs feitos com NaOH precisou de ajuste de pH para 7, adição de 100 mL de etanol gota-a-gota, adição de sulfato de magnésio com agitação por 20 min. e armazenamento durante 24 h para remoção de sais e água. Ao final, chegaram a partículas menores que 5 nm que podem ser aplicadas em bio-sensoreamento, bioimageamento, carreamento de drogas e em LEDs. As bandas de absorção apareceram de 250 a 300 nm; e as de excitação em 450 e 800 nm (CQD-HCl) ou 400 e 800 nm (CQD-NaOH). Estas excitações deram origem a emissões em aproximadamente 525 e 825 - 860 nm (CQD-HCl) ou 470 e 870 nm (CQD-NaOH). E estas fluorescências se mostraram dependentes da excitação, com rendimento quântico de 7%. Observou-se também que tais

nanopartículas são capazes de fluorescência ascendente (*upconversion*), o que é de grande vantagem em aplicações biológicas.

WANG, WANG e CHEN (2012) utilizaram clara e gema de ovo de galinha separadamente, para produzir nanopartículas através da exposição a plasma de 50 V e 2,4 A por 3 minutos, obtendo nanopartículas diferentes com cerca de 2,15 nm de tamanho. As nanopartículas da clara se mostraram amorfas, por SAED e HRTEM, e as da gema apresentaram um padrão cristalino como o do grafite e carbono sp^2 em abundância. No espectro de absorção destas nanopartículas aparece uma banda em 275 nm, no de excitação, em 360 nm e no de emissão, em 420 nm, com rendimentos quânticos de 6% para as nanopartículas da clara e 8% para as da gema, e além disso, emissão dependente da excitação para as nanopartículas preparadas com a gema. O material foi aplicado como tinta para impressão.

GONÇALVES et al. (2010) se utilizaram de um alvo de grafite imerso em água para ablação a laser por 1 min. com um laser pulsado de 248 nm (10 Hz; 400 mJ) seguido por 12 h de refluxo em ácido nítrico, mais 20 h de refluxo em PEG₂₀₀, mais 31 h de refluxo com N-acetil-L-cisteína e 6 extrações com acetato de etila. Depois desta longa síntese, os tamanhos tiveram duas dispersões centradas em 63 e 373 nm, onde as partículas menores provavelmente foram derivadas da ablação das partículas maiores. A emissão ficou centrada em 450 nm, quando excitada em 340 nm, e com esta emissão pôde-se aplicar estas nanopartículas na detecção de mercúrio II, além de que há o indicativo de se possa fazer essa medida *in vivo*.

HU et al. (2009) também fizeram ablação a laser de pó de grafite, por 2 h, em hidrato de diamina ou dietanolamina ou PEG_{200N} ou água. Foi utilizado um laser pulsado de 1 064 nm (6,0 MW/cm²). Para as nanopartículas produzidas em solventes orgânicos o pós-síntese foi apenas a centrifugação, para as produzidas em água, o pós-síntese foi um tratamento com ácido perclórico, mistura com PEG_{200N}, aquecimento a 120 °C por 72 h e centrifugação de 40 min. A estrutura observada por SAED foi do tipo diamante; o tamanho, no caso das nanopartículas feitas em água, foi de 3,3 nm, já as feitas em PEG_{200N} foram de 3,2 nm. A excitação foi de 420 nm e a emissão de 490 nm, os

rendimentos foram de 3,7% para as partículas feitas em hidrato de diamina, 7,8% para as feitas em dietanolamina e 5% em PEG_{200N}.

ZHANG et al. (2013) fizeram a eletrólise de barras de grafite por 4 dias em 50 V com corrente contínua sob agitação, depois houve filtração e centrifugação. Através de HRTEM, XRD de amplo ângulo e Raman foi observada uma característica grafítica na estrutura e carbonos hibridizados em sp^2 . As partículas absorveram em uma ampla faixa do espectro UV-vis, foram excitados em 340 nm e emitiram em 445 nm. Além disso, têm um tamanho de 5 nm e foram aplicadas na detecção de ferro III.

YAZID et al. (2013) fizeram nanoprecipitação de amido de sagu utilizando etanol e carbonizaram as nanopartículas fazendo uma desidratação com ácido sulfúrico por 40 minutos sem aquecimento. Após este processo a solução foi levada para centrifugação lavando com água, depois para refluxo com ácido nítrico por 30 minutos, neutralização e diálise. Estas partículas, quando excitadas em 327 nm, emitem em 428 nm; seus tamanhos variaram de 20 a 100 nm e foram empregadas como sonda para determinação de estanho II em água.

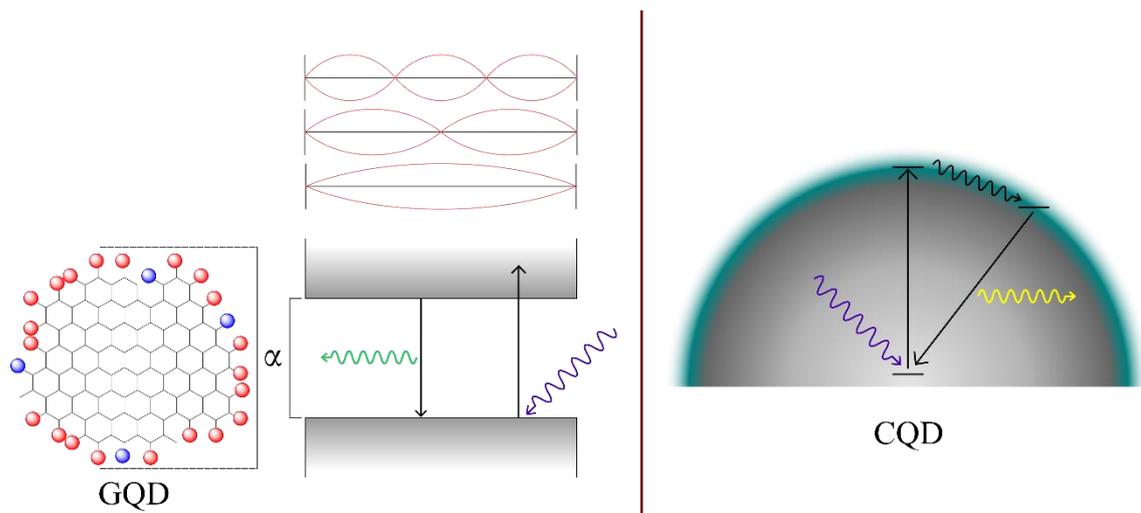
3.2 Estrutura e mecanismo de luminescência

Entre as classes de nanomateriais de carbono, exibem luminescência os GQDs, os nanotubos cortados para pequenos comprimentos, os GCQDs e os CQDs; estas três classes de pontos quânticos têm sua superfície coberta por grupos polares que os tornam altamente dispersáveis em água, já os interiores diferenciam-se através de suas estruturas e composição elementar. Os GQDs e os nanotubos têm estruturas de grafeno com a maioria dos carbonos hibridizados em sp^2 ; os GQDs são algumas folhas de grafeno de pequena extensão empacotadas uma sobre a outra e os nanotubos são uma ou mais folhas de grafeno enroladas em volta de si próprias de forma coaxial. Os GCQDs são nanopartículas com regiões grafíticas em meio a uma matriz amorfa, havendo carbonos hibridizados em sp^2 e sp^3 em diferentes proporções. Já os CQDs têm estrutura majoritariamente amorfa podendo conter regiões cristalinas, mas não grafítica; seus carbonos variam entre sp^2 e sp^3 e têm maior porcentagem de oxigênios ou nitrogênios

que os nanotubos, os GQDs e os GCQDs (BAKER; BAKER, 2010; GONÇALVES, 2013; RIGGS et al., 2000).

O mecanismo de luminescência dos GQDs (**Figura 2**) é semelhante ao dos QDs. O grafeno é um material semicondutor, por isso, quando um fóton excita o elétron para a banda de condução (formada pelos orbitais antiligantes dos carbonos), eles são submetidos aos efeitos quânticos e se comportam como uma ‘partícula na caixa’; desta forma, o comprimento de onda de emissão se torna diretamente relacionado ao tamanho da partícula (LI et al., 2010; LIU; LIU; ZHANG, 2011; YE et al., 2013). Porém LIU, LIU e ZHANG (2011) observaram que além da dependência do tamanho, a emissão também seria influenciada pelo número de camadas de grafeno e pelos grupos funcionais na borda das folhas, possivelmente devido as interações de Van der Waals, dipolo-dipolo ou ligações de hidrogênio que podem influenciar os níveis de energia dos orbitais ligantes ou antiligantes do grafeno. A propriedade de fluorescência ajustável e a largura da banda de emissão dos GQDs é explicada pela polidispersividade de tamanhos de partículas na amostra.

Figura 2 – Ilustração dos mecanismos de fluorescência em GQDs (semelhante ao dos QDs) e em CQDs.

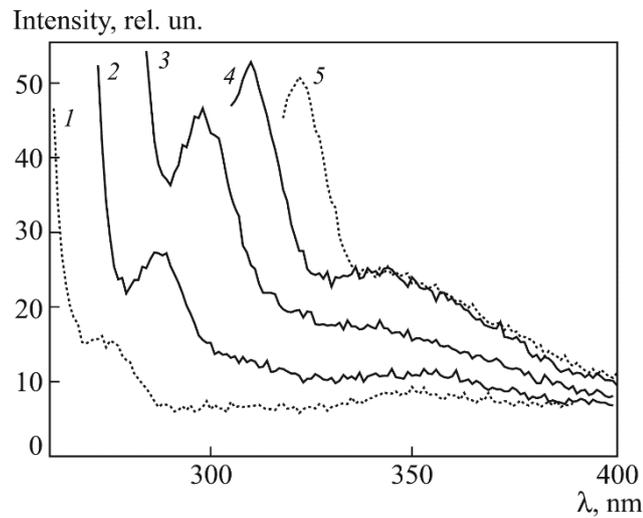


O mecanismo nos CQDs (**Figura 2**) é diferente, pois não possui bandas e sua luminescência está muito mais relacionada à superfície da nanopartícula, onde aparece a necessidade do tamanho nanométrico, porque neste tamanho a razão superfície-volume é grande e os efeitos de superfície serão mais pronunciados. Neste caso, um elétron do interior da partícula é excitado, por um fóton, para um orbital na superfície, onde ocorra um processo não-radiativo com perda de energia, por exemplo um rearranjo do buraco deixado no interior, e quando retorna ao estado fundamental emite um fóton de menor energia (SCIORTINO et al., 2016; SUN et al., 2006). Devido à localização do estado excitado na superfície, a fluorescência se torna bastante suscetível ao ambiente em que está (solvente, pH, íons ou moléculas presentes), pois quando a superfície da nanopartícula interage com o que está ao redor, os níveis de energia dos orbitais da superfície podem ser alterados, modificando o comprimento de onda de emissão ou até suprimindo a fluorescência dos CQDs, e esta propriedade pode tornar estes pontos quânticos, sondas muito sensíveis e seletivas (SCIORTINO et al., 2016). A propriedade de emissão ajustável, por sua vez, é explicada tanto pelos diferentes tamanhos quanto pelos grupos funcionais presentes na partícula, pois influenciam em como a partícula interage com o ambiente e definem os níveis de energia dos orbitais superficiais (SCIORTINO et al., 2016; SUN et al., 2006).

3.3 Autofluorescência da água

Águas de ambientes naturais apresentam fluorescência, a qual é geralmente atribuída a impurezas presentes, mas mesmo após purificação (filtração, destilação ou deionização), apesar de diminuir de intensidade, esta fluorescência não é totalmente suprimida. Água Milli-Q apresenta fluorescência, como mostra a **Figura 3**, quando excitada com diferentes comprimentos de onda (250 a 290 nm) (BELOVOLOVA et al., 2009).

Figura 3 – Espectros de fluorescência de água Milli-Q com excitações em 250 (1), 260 (2), 270 (3), 280 (4) e 290 (5) nm.



Fonte: adaptado de BELOVOLOVA et al., 2009.

Em espectros de fluorescência de diferentes águas (não mostrados na figura) podem aparecer bandas em duas regiões características: uma com máximo na faixa de 300 - 350 nm e outra de 400 - 450 nm. A primeira faixa é atribuída a luminescência de compostos como proteínas e a segunda, a substâncias orgânicas ou compostos húmicos. Entretanto, a fluorescência da água também está relacionada a outros fatores, pois apenas a presença de impurezas não é capaz de explicar todas as características de tal fluorescência. Estudos foram realizados a este respeito e também foi associado que a fluorescência seria causada pela presença de espécies reativas de oxigênio, que podem se envolver em reações quimioluminescentes, por processos de auto-organização estrutural das ligações de hidrogênio e da formação de estado metaestável, pela presença de impurezas reduzidas, e pela presença de compostos carbonílicos excitados, que provavelmente são formados em decorrência da decomposição de peróxidos da superfície de bolhas de ar presentes na água (BELOVOLOVA et al., 2009).

3.4 Metodologias de análise de quercetina

A quercetina tem sido alvo em muitos estudos para sua determinação devido a suas importantes atividades biológicas (antioxidante, antiúlcera, anticâncer, etc.) e devido a estar naturalmente presente em diferentes frutas e vegetais (FORMICA; REGELSON, 1995; XIAO et al., 2013). Uma vez que a presença, em maior quantidade, deste flavonoide nos alimentos os tornaria mais saudáveis, surge a demanda de quantificar a quercetina nos diferentes tipos de amostras. Os métodos mais comumente utilizados para a determinação são os métodos cromatográficos, eletroquímicos ou até uma associação dos dois. WANG et al. (2005), ZHANG e CUI (2005), RANJBARI, BIPARVA e HADJMOHAMMADI (2012) e WIANOWSKA et al. (2017) utilizaram cromatografia para determinar quercetina em diferentes amostras; HE, LIN e PAN (2005), XU e KIM (2006) e XIAO, ZHAO e ZENG (2007) utilizaram métodos voltamétricos; já CHEN, ZHANG e YE (2000) utilizaram uma combinação destas metodologias quando aplicaram a eletroforese capilar com detecção eletroquímica.

WANG et al. (2005) com a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), uma coluna de fase reversa e detecção UV, determinaram quercetina em células humanas de câncer de mama. Este tipo da amostra não pode ser analisado diretamente, então foi feita uma preparação adicionando ácido clorídrico para a precipitação de proteínas, passando por extração em uma mistura de éter e acetona, 2 minutos de agitação em vórtex, 15 min. de centrifugação, secagem em nitrogênio e redissolução na fase móvel (solução tampão de fosfato, THF, metanol e isopropanol). Com a metodologia estabelecida, foi determinado o limite de detecção do método de $0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$, a faixa linear de $0,1$ a $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, com desvio padrão relativo (RSD) menor que 10% e sem interferentes eluindo junto ao sinal da quercetina, especialmente kaempferol e isorhamnetina que também foram analisados no método desenvolvido.

ZHANG e CUI (2005), também escolheram HPLC com coluna de fase reversa, mas utilizando um detector de quimioluminescência, obtendo um limite de detecção mais alto, de $0,0529 \mu\text{mol L}^{-1}$, faixa linear mais ampla, de $0,2$ a $231,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, e RSD de 3,6%; kaempferol e isorhamnetina também foram analisados e, por isto, não interferem na determinação de quercetina. As amostras analisadas foram de fitofármacos

de *Hippophae rhamnoides L.* e foram preparadas a partir da adição de metanol, agitação, sonicação por 1 hora e filtração, adição de metanol ao resíduo da filtração, mais 30 min. de sonicação, e depois diluição e filtração com membrana; após toda essa preparação, a solução obtida pôde ser submetida à análise, na qual leva 25 min. para separação na coluna.

RANJBARI, BIPARVA e HADJMOHAMMADI (2012) também utilizaram HPLC com detecção UV, mas para quantificar quercetina em mel, urina e plasma. Para estas amostras houve adição de ácido clorídrico, agitação e aquecimento por 30 min. a 80 °C, diluição, extração, ajuste de pH e filtração; para a extração, foi selecionado o método de microextração líquido-líquido dispersiva invertida (IDLLME). As figuras de mérito do método desenvolvido são: limite de detecção de 0,86 nmol L⁻¹, faixa linear de 1,65 a 3309 nmol L⁻¹ e RSD menor que 5%.

WIANOWSKA et al. (2017) analisaram quercetina em folhas, flores, ervas e botões de flores depois de moer e extrair por SSDM (do inglês, *sea sand disruption method*) utilizando a técnica de cromatografia líquida com detector de espectrômetro de massas (LC-MS). As figuras de mérito do método desenvolvido não foram determinadas, mas foi estimado que derivados da quercetina não interferem nas medidas e que o tempo da análise foi de 90 min.

HE, LIN e PAN (2005) utilizaram a voltametria de pulso com eletrodo pasta de nanotubos (MWCNT) em óleo de parafina (nujol), para determinar quercetina em amostras de soro sanguíneo e urina, sem que houvesse necessidade de preparos de amostra custosos ou trabalhosos, as amostras passaram apenas por diluição. O limite de detecção estimado foi de 0,03 µmol L⁻¹ e a faixa linear de 0,1 a 1,0 µmol L⁻¹. Glicose, serotonina e ácido ascórbico não interferiram na medida, mas algumas substâncias da urina interferiram, porém não foram identificadas.

XU e KIM (2006), quantificaram quercetina em cebola através de um procedimento eletroquímico que utiliza voltametria de onda quadrada e um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos e nafion. A preparação da amostra, entretanto, não foi tão simples como a de HE, LIN e PAN (2005) já que se trata de uma amostra sólida. As amostras foram submetidas a secagem por 24 h, extração em etanol

por 24 h e sem a presença de luz, filtração à vácuo, secagem do filtrado, redissolução em etanol e mais uma filtração. O método desenvolvido poderia detectar concentrações até menores que $0,02 \mu\text{mol L}^{-1}$, mas apenas pôde quantificar entre $0,02$ e $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de quercetina. A presença de morina e catecol interferem na resposta obtida, mas ácido ascórbico, ácido úrico, glicose e hesperetina não interferem.

XIAO, ZHAO e ZENG (2007), assim como HE, LIN e PAN (2005), empregaram como eletrodo uma pasta feita de nanotubos e óleo de parafina, porém se diferenciaram pelo uso de voltametria linear. Para analisar amostras de hidrolisado de rutina, tal hidrolisado foi misturado com ácido clorídrico e metanol, fervido por 1 h, filtrado e diluído. Diferentemente de todos os outros métodos, este estudo levou a duas faixas lineares de análise: $0,0020$ a $0,10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de quercetina e $0,10$ a $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de quercetina. O RSD encontrado foi $1,70\%$ e foi visto que ácido ascórbico, ácido úrico, morina e rutina são interferentes nesta metodologia, e que os íons zinco, potássio, cobre II, ferro III, alumínio, sódio, chumbo II, prata, magnésio e cálcio, glicose, vitamina B2 e hipoxantina não interferem.

CHEN, ZHANG e YE (2000) desenvolveram uma metodologia que utiliza eletroforese capilar com detecção eletroquímica (CE-ED) para analisar quercetina em botões de *Flos Sophorae*, folhas de *Ligustrum lucidum Ait.* e folhas de *Cinnamomum camphora (L.) Presl.* Como preparação, secagem a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 4 h, pulverização, refluxo em metanol por 3 h a $80 \text{ }^\circ\text{C}$, filtração e mais duas lavagens com metanol, ajuste de volume e diluição na solução tampão a ser utilizada. O tempo necessário para uma boa separação na coluna foi de 10 min., $0,225 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi o limite de detecção, a faixa linear de $0,5$ a $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ e o RSD foi menor que 5% . Glicose, daidzeína e rutina foram espécies não-interferentes para o método.

Os métodos cromatográficos e eletroquímicos são os mais encontrados na literatura para a análise de quercetina, entretanto não há apenas estes métodos. QIU et al. (2012) desenvolveram um método de análise em fluxo com sensor quimioluminescente para análise de quercetina em remédios. Eles obtiveram um limite de detecção de $0,93 \mu\text{mol L}^{-1}$, valor mais alto que os métodos mais comuns, faixa linear tão ampla quanto outros métodos, de $1,4$ a $160 \mu\text{mol L}^{-1}$, e RSD comparável, de $2,72$ a

3,31%. Apesar de não terem sido encontrados interferentes para o método, foi verificado que os íons de prata, cobre II, ferro II, cério III, paládio II, bário, potássio, sódio, magnésio, cádmio e cálcio, rutina, β -ciclodextrinas e amido não interferem. Já XIAO et al. (2013) desenvolveram um método de fluorescência, através da diminuição da fluorescência (*quenching*) de CQDs preparados por irradiação de micro-ondas a partir de líquido iônico. O limite de detecção e RSD foram comparáveis aos dos métodos cromatográficos ou eletroquímicos: $0,0988 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 2,50%, respectivamente; mas a faixa linear ficou em concentrações mais altas e pouco ampla: 2,87 a $31,57 \mu\text{mol L}^{-1}$. E com relação aos interferentes, apenas foram encontrados não-interferentes: NaCl, NaBr, KI, KNO_3 , KBr, CaCl_2 , ZnSO_4 , NaMoO_4 , CONO_3 , BSA (albumina de soro bovino), leucina, tirosina e penicilina V K.

4 Materiais e procedimentos

4.1 Reagentes e soluções

As soluções foram preparadas com água ultrapura com resistividade de 18,0 M Ω cm, de um sistema Milli-Q (Millipore Inc., Bedford, MA) e todos os reagentes foram de grau analítico.

O metanol (grau HPLC) foi adquirido na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Todas as soluções tampão foram preparadas segundo (GOMORI, 2010), adequando apenas os volumes finais preparados.

Uma solução estoque de quercetina 1000 mg L⁻¹ foi preparada a partir de quercetina grau HPLC ($\geq 95\%$) da Sigma-aldrich (St. Louis, MO, USA) usando como solvente o metanol.

O papel utilizado nas sínteses foram folhas A4, velhas ou recentes, usadas em impressões e que já não estavam sendo utilizadas. Estas folhas foram cortadas em tiras por um triturador de papel de escritório e depois cortadas com tesoura, resultando em pequenos retângulos de cerca de 8 por 1 mm.

O sulfato de quinino em solução aquosa de ácido sulfúrico foi utilizado como padrão de referência para o cálculo do rendimento quântico (BROUWER, 2011).

4.2 Equipamentos

O forno de micro-ondas utilizado nas sínteses foi modelo Start D (Milestone, Sorisole, Italy) equipado com sensor de temperatura e com cavidade para oito frascos de Teflon®, entretanto, não foi utilizado o sensor de temperatura. A centrífuga utilizada foi uma centrífuga EBA 200 da Hettich com velocidade de 6 000 rpm. Para a obtenção dos espectros de emissão ou excitação foram utilizados espectrofluorímetro Horiba-Jobin Yvon Fluorolog-3 com lâmpada de xenônio, espectrofluorímetro Perkin Elmer modelo LS 55 e espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301PC de acordo com suas

disponibilidades. Os espectros de absorção foram adquiridos em um espectrofotômetro de absorção modelo 8453 da Agilent.

Para a caracterização dos CQDs foram empregados um TGA (modelo 50WS, Shimadzu) e um DSC (modelo DSC-60, Shimadzu) ambos operando em fluxo de nitrogênio (50 mL/min.; taxa de aquecimento: 10 °C/min.), um rotaevaporador da Büchi R-210 com banho B-491 e bomba de vácuo Vario PC 3001, um aparelho de ressonância magnética nuclear (NMR) de 400 MHz VNMRS da Varian (solvente: D₂O), um equipamento de DLS NanoBrook Omni, um medidor de potencial zeta da Zetasizer (C-LABMU/PROPEP), um difratômetro de raios-X da Bruker modelo D8 Advance com radiação K α do Cu ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), e para as imagens de microscopia um microscópio LVEM5 da DeLong Instruments com aceleração de 5 kV utilizando uma grade coberta com filme ultrafino de carbono como substrato.

4.3 Avaliação das condições de síntese dos CQDs

Foram avaliadas as condições de síntese dos CQDs através de um planejamento fatorial 2³, onde foram variados a potência, o tempo de aquecimento e a massa de papel, de acordo com os níveis mostrados na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Parâmetros avaliados e os níveis superiores e inferiores no planejamento fatorial 2³ para otimização da síntese de CQDs.

Parâmetros	Nível inferior (-)	Nível superior (+)
Potência (W)	100	200
Tempo (min.)	15	30
Massa de papel (g)	0,5	1,0

Foram utilizados dois reatores de micro-ondas. Para cada reator, foi pesada a massa de papel em um béquer, foram adicionados 10 mL de água ultrapura, o béquer foi agitado (afim de molhar todos os pedaços do papel) e a mistura foi transferida para o reator sem adição de água para auxiliar a transferência. Os reatores foram submetidos à

irradiação de micro-ondas em determinada potência e durante o tempo determinado de acordo com o ensaio do planejamento fatorial a ser realizado. Terminado o aquecimento, os reatores foram esfriados em temperatura ambiente e, então, abertos. Os produtos dos reatores foram transferidos para um mesmo tubo *Falcon* com capacidade de 50 mL, desta vez com o auxílio de água, e o tubo foi completado com água até a marcação de 45 mL. O tubo foi deixado decantando por 24 h, a solução sobrenadante foi retirada com uma pipeta e armazenada em um frasco de vidro.

4.4 Síntese de CQDs otimizada

Foram utilizados dois reatores de micro-ondas. Para cada reator, foi pesado 1 g de papel em um béquer, foram adicionados 10 mL de água ultrapura, o béquer foi agitado (afim de molhar todos os pedaços do papel) e a mistura foi transferida para o reator sem adicionar mais água para auxiliar a transferência. Os reatores foram submetidos à 200 W de potência durante o tempo de 30 minutos. Terminado o aquecimento, os reatores foram esfriados em temperatura ambiente e, então, abertos. Os produtos dos reatores foram transferidos para um mesmo tubo *Falcon* com capacidade de 50 mL, desta vez com o auxílio de água, e o tubo foi completado com água até o volume de 45 mL. O líquido e o sólido remanescente no tubo *Falcon* de 50 mL foram igualmente divididos para 4 tubos *Falcon* de 15 mL e estes tubos foram submetidos a centrifugação por 10 min. com rotação de 6 000 rpm. O sobrenadante foi dividido entre outros 2 tubos *Falcon* de 15 mL e centrifugados por mais 5 min., em seguida o líquido sobrenadante foi transferido para um frasco de vidro e armazenado em temperatura ambiente.

4.5 Avaliação do emprego de água destilada e ultrapura no preparo dos CQDs

Foi realizada uma síntese com água destilada e outra com água ultrapura. Para a síntese com água ultrapura, foi realizado o procedimento otimizado descrito acima (tópico 4.4). E para a síntese com água destilada, foram pesadas massas de 1 g de papel

em 2 béqueres, adicionados 10 mL de água destilada e seguiu-se com o procedimento otimizado descrito acima (tópico 4.4).

4.6 Síntese com papel residual

Ao terminar uma síntese, o resíduo remanescente (papel e um pouco de solução) foi dividido igualmente para 2 tubos *Falcon*, completados para 15 mL com água e levados para uma nova corrida de aquecimento no forno de micro-ondas nas mesmas condições (200 W e 30 min.). Em seguida, o novo produto foi centrifugado normalmente (10 + 5 min.) para obter a nova solução de CQDs desta síntese com o papel remanescente da síntese anterior.

4.7 Preparação dos CQDs para as caracterizações

Para a realização das análises de TGA, DSC, NMR e XRD foi utilizado um pó dos CQDs. Para a obtenção do pó, a solução de CQDs, obtida após o procedimento de síntese, foi seca em rotaevaporador a 15 mbar e 40 °C; em seguida, foi adicionado acetona até cobrir todo o sólido aderido nas paredes do balão, depois houve sonicação por 30 min. e filtração.

Para as análises de rendimento quântico, DLS, potencial zeta e microscopia, a solução obtida da síntese foi apenas diluída em água ou em isopropanol (para microscopia).

4.8 Medição dos tamanhos através da microscopia

Os tamanhos das nanopartículas foram medidos a partir das imagens de microscopia através da utilização do software ImageJ. Foram coletados os diâmetros de 150 partículas para a preparação do histograma de tamanhos.

4.9 Solubilidade dos CQDs em outros solventes

Para avaliar a dispersibilidade dos CQDs, 5 alíquotas de 0,5 mL da solução de CQDs foram rotaevaporadas a 15 mbar e 40 °C. Após a secagem foi adicionado separadamente 1 mL de água, acetona, clorofórmio, dimetilformamida (DMF) ou etanol e os frascos foram sonicados. Os sobrenadantes foram separados, os precipitados foram filtrados e ressolubilizados em água.

4.10 Otimização das condições de análise de quercetina

Foram avaliadas as condições de pH, tempo (t) de reação e concentração de CQDs ([CQD]) na análise de quercetina. As condições variadas estão listadas na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Parâmetros avaliados na determinação de quercetina usando CQDs.

pH	t (min.)	[CQD] (% v/v)
5 (tampão citrato-fosfato)	0,5 – 5 (a cada 0,5)	1
6 (tampão citrato-fosfato)	6 – 20 (a cada 1)	3
7 (tampão citrato-fosfato)		5
8 (tampão TRIS- HCl)		

A solução de CQDs adicionada à cubeta teve a concentração calculada para que, ao diluir para os 3 mL finais na cubeta, a mistura resultasse na concentração de CQDs a ser avaliada. Assim, foram preparadas soluções estoque de CQDs nas concentrações de 6, 18 e 30% (v/v) da solução obtida da síntese, que ao serem adicionadas às misturas na cubeta resultaram nas concentrações de CQDs de 1, 3 e 5%, respectivamente.

Em uma cubeta de quartzo com quatro lados polidos, foram adicionados 0,5 mL da solução estoque de CQDs na concentração apropriada, 2 mL de solução tampão e 0,5 mL de um padrão de 50 mg L⁻¹ de quercetina. No momento da adição do padrão, um cronômetro foi disparado e a mistura foi agitada. Os espectros de fluorescência foram medidos em cada tempo a ser avaliado.

4.11 Aplicação dos CQDs na determinação de quercetina

As amostras foram diluídas a 10% v/v, em metanol, antes da análise.

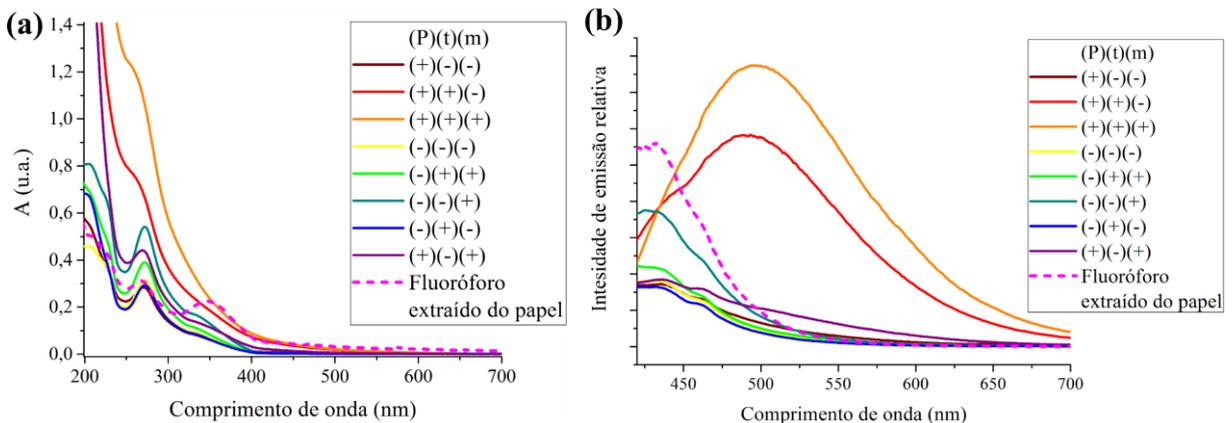
Em uma cubeta de quartzo com quatro lados polidos, foram adicionados 0,5 mL da solução estoque de CQDs de 30% (resultando na concentração de 5%), 2 mL de solução tampão TRIS-HCl em pH 8 e 0,5 mL da amostra ou padrão a ser medido. No momento da adição da amostra ou padrão um cronômetro foi disparado, a mistura foi agitada e os espectros de fluorescência foram obtidos no tempo de 3 minutos.

5 Resultados e discussão

5.1 Avaliação das condições de síntese dos CQDs

As condições de síntese dos pontos quânticos de carbono produzidos neste trabalho foram otimizadas através de um planejamento fatorial 2^3 e como resposta foram analisados os espectros de absorção e emissão das soluções coloidais resultantes de cada condição. Este planejamento teve como variáveis a potência de irradiação do micro-ondas (P), o tempo de aquecimento no micro-ondas (t) e a massa de papel empregada (m). Os espectros de absorção e emissão adquiridos estão apresentados na **Figura 4**.

Figura 4 – Espectros de (a) absorção e (b) emissão com excitação em 400 nm das sínteses com diferentes condições de potência (P), tempo (t) e massa (m), de acordo com os níveis superior (+) ou inferior (-) do planejamento.



Observa-se na **Figura 4** a comparação com os espectros de absorção e emissão dos CQDs com os espectros do fluoróforo presente no papel (TiO_2), o qual é adicionado durante a fabricação do papel como branqueador óptico (SOUSA et al., 2016). Os espectros que não apresentam as mesmas bandas do fluoróforo e apresentam bandas diferentes, indicam que naquela condição há maior degradação do papel. Além disso, a presença de novas bandas indica a presença de um novo material formado. No espectro de absorção do fluoróforo extraído do papel por sonicação em água (**Figura 4 (a)**), observam-se uma banda em 268 nm e uma em 347 nm de intensidades semelhantes. Quando há formação dos pontos quânticos, há o aparecimento de uma curva

característica de material nanométrico que forma um contínuo que vai se intensificando rapidamente com a diminuição do comprimento de onda; e estas observações constam nos espectros de absorção das condições (+)(+)(+) e (+)(+)(-).

Já no espectro de emissão do fluoróforo (**Figura 4 (b)**), são vistas bandas entre 400 e 500 nm; com a presença dos CQDs, observa-se uma banda muito larga em 496 nm, como visto nas condições (+)(+)(-) e (+)(+)(+). A condição (+)(+)(-) apresenta a banda em 496 nm, mas ainda é bem observado um ombro na região da emissão do fluoróforo. Já a condição (+)(+)(+), apresenta esta banda relativa aos CQDs de forma mais intensa e quase não se observa o ombro na região de emissão do fluoróforo. Então, pode-se concluir que as condições (+)(+)(-) e (+)(+)(+) foram aquelas em que houve formação de CQDs, mas de forma mais eficiente na condição (+)(+)(+).

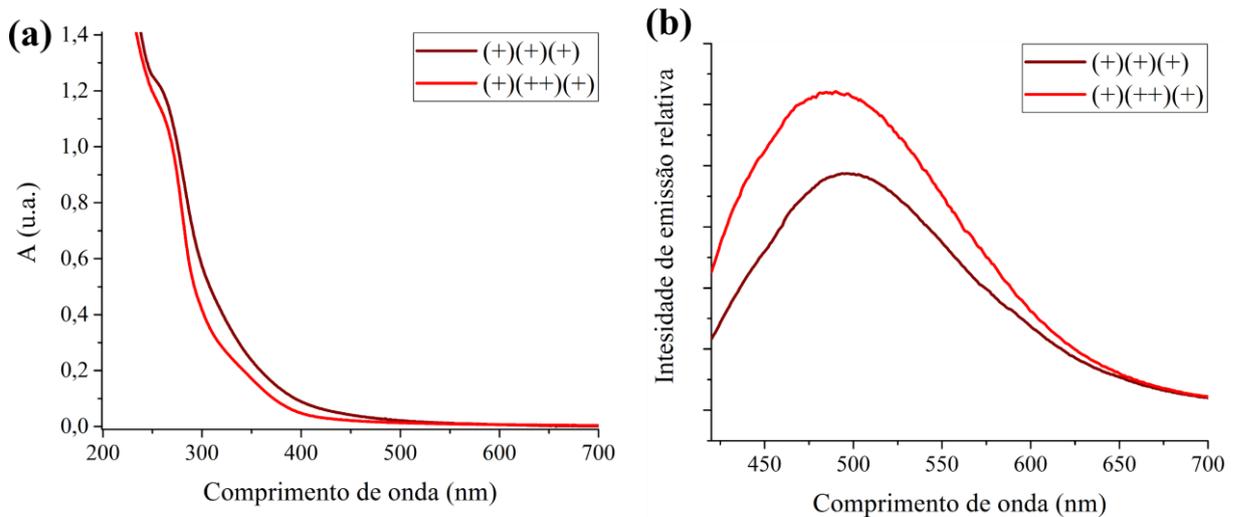
Diante destes resultados observou-se a necessidade de fornecer alta energia para a quebra das ligações da celulose para que haja a formação dos CQDs, pois em qualquer uma das condições em que foi utilizada a potência de 100 W não houve formação de pontos quânticos. Ainda mais, é possível fazer a confirmação visual da formação dos CQDs (**Figura 5**), pois no produto das sínteses com condições em que há formação de CQDs observa-se o papel mais degradado e a solução com coloração marrom mais intensa, e quanto maior a formação de CQDs mais escura a solução. O produto da síntese com condição (+)(+)(+) mostrou maior degradação do papel e uma solução marrom mais escura, em relação aos produtos das outras sínteses, colaborando com a escolha da mesma.

Figura 5 – Produtos de síntese, após o aquecimento por micro-ondas, sem (esquerda) e com (direita) formação de CQDs.



Visto que a condição (+)(+)(+), que consiste em 200 W, 30 min. e 1 g de papel, foi a que suscitou maior formação de CQDs, cogitou-se fazer uma expansão do planejamento inicialmente proposto, porém não seria possível aumentar a variável da massa, devido a capacidade do frasco de reação do forno de micro-ondas utilizado. Também cogitou-se o aumento da variável da potência, entretanto não seria possível devido a questões de segurança e de capacidade do equipamento; já o tempo seria sim uma variável possível de aumentar, então foi realizada mais uma síntese, dessa vez com a condição de 200 W, 60 min. e 1 g de papel: (+)(++)(+). Os espectros de absorção e de emissão desta síntese estão na **Figura 6** juntos aos espectros da síntese com condições (+)(+)(+).

Figura 6 – Espectros de (a) absorção e (b) emissão (excitação em 400 nm) da condição de síntese na expansão do planejamento fatorial: (+)(++)(+).

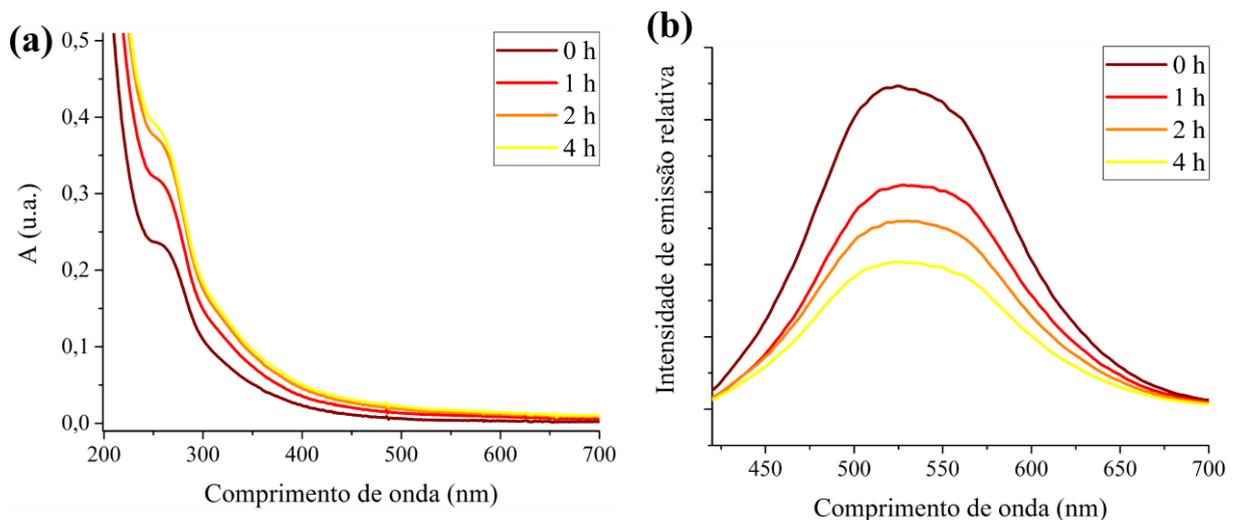


Na **Figura 6 (a)**, vê-se uma intensidade de sinal menor na região de 347 nm para o espectro da condição (+)(++)(+), indicando maior degradação do fluoróforo com o aumento do tempo de aquecimento. No espectro de emissão da condição (+)(++)(+), na **Figura 6 (b)**, observa-se maior intensidade, indicando a maior formação de CQDs. Porém, o aumento da formação de CQDs devido a duplicação do tempo de aquecimento não foi considerada vantajosa, assim a melhor condição de síntese ainda se manteve a

condição que utiliza 200 W de potência, 30 min. de aquecimento e 1 g de papel: (+)(+)(+).

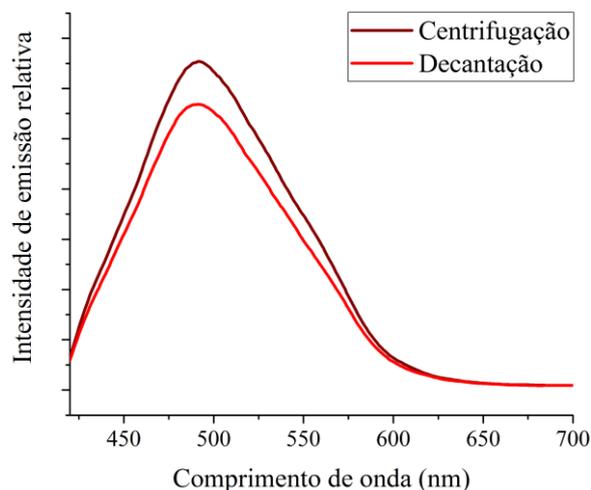
Além das condições de síntese, também foram investigadas as condições pós-síntese para a otimização da síntese: o aquecimento pós-síntese para maturação dos pontos quânticos e o método de separação do sobrenadante. Para avaliar o processo de maturação dos CQDs através de aquecimento, a solução de CQDs obtida da síntese foi submetida a aquecimento por até 4 h em banho de óleo em uma temperatura de cerca de 90 °C e foram coletadas alíquotas em diferentes tempos de aquecimento. Os espectros de absorção e emissão destas alíquotas foram adquiridos (**Figura 7**). Analisando visualmente a solução de CQDs durante o aquecimento, não se observou mudança significativa na solução, apenas certa turbidez. No entanto, ao analisar os espectros de absorção e emissão observou-se um aumento da intensidade de absorção, porém a intensidade de emissão diminuiu mais de 50% após 4 horas de aquecimento. Isto indica que, diferente dos pontos quânticos de semicondutores (QDs), estes pontos quânticos de carbono não sofrem aprimoramento de sua estrutura através da diminuição de defeitos e também não aumentam de tamanho para fluorescer em comprimentos de onda maiores, apenas sofrem aglomeração e precipitam.

Figura 7 – Espectros de (a) absorção e (b) emissão (excitação em 400 nm) dos CQDs sintetizados na condição (+)(+)(+) (potência de 200 W, durante 30 min. com 1 g de papel) e aquecidos em banho de óleo por 0, 1, 2 ou 4 horas.



Após o aquecimento no forno de micro-ondas, o produto obtido é composto por uma solução (com os CQDs desejados) e material sólido (proveniente do papel). Inicialmente, o método utilizado para obter a solução separadamente foi a decantação por 24 h, mas isto torna a síntese mais demorada, então foi avaliada a possibilidade de utilizar a centrifugação para obter a solução. Desta maneira, foi realizada uma síntese, posteriormente o produto foi centrifugado de acordo com o procedimento já descrito na sessão de **Materiais e procedimentos** e os espectros de emissão desta síntese e da síntese com decantação são mostrados na **Figura 8**.

Figura 8 – Espectros de emissão (excitação em 400 nm) das sínteses obtidas por centrifugação ou decantação.

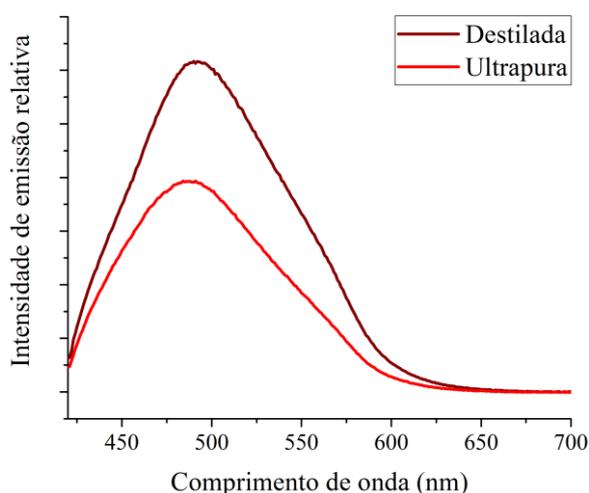


Na **Figura 8**, é visto que a emissão da síntese que passou por centrifugação é mais intensa. É possível que durante as 24 h de decantação alguns CQDs formados, em contato com o papel remanescente, voltem a se ligar ao papel sólido macroscópico e deixem a solução. Com a evidência de uma maior intensidade de fluorescência utilizando a centrifugação, concluiu-se que esta seria a melhor forma de obtenção da solução de CQDs, tanto por uma questão de eficiência da síntese, já que foram obtidos mais CQDs luminescentes, quanto por uma questão de tempo de síntese, pois reduz de 24 h para 15 minutos.

5.2 Avaliação do emprego de água destilada e ultrapura no preparo dos CQDs

Afim de testar o tipo de água empregada na síntese, foi proposto realizar uma síntese feita com água destilada, ao invés da água ultrapura. A **Figura 9** mostra os espectros de emissão da síntese feita com água ultrapura e com água destilada, nela observa-se uma maior concentração de CQDs na síntese em que se utilizou a água destilada, e isto é explicado pela maior concentração de íons na água destilada. Com uma maior concentração de íons na solução que é exposta à radiação de micro-ondas, ocorre maior aquecimento, possibilitando a quebra das ligações no papel com mais facilidade, por isto obtém-se mais CQDs com a utilização da água destilada. Entretanto, para a aplicação dada a este material não seria interessante a presença de íons, então foi mantida a água ultrapura na síntese, para os fins deste trabalho.

Figura 9 – Emissões (excitação em 400 nm) das sínteses feitas com água destilada ou ultrapura.

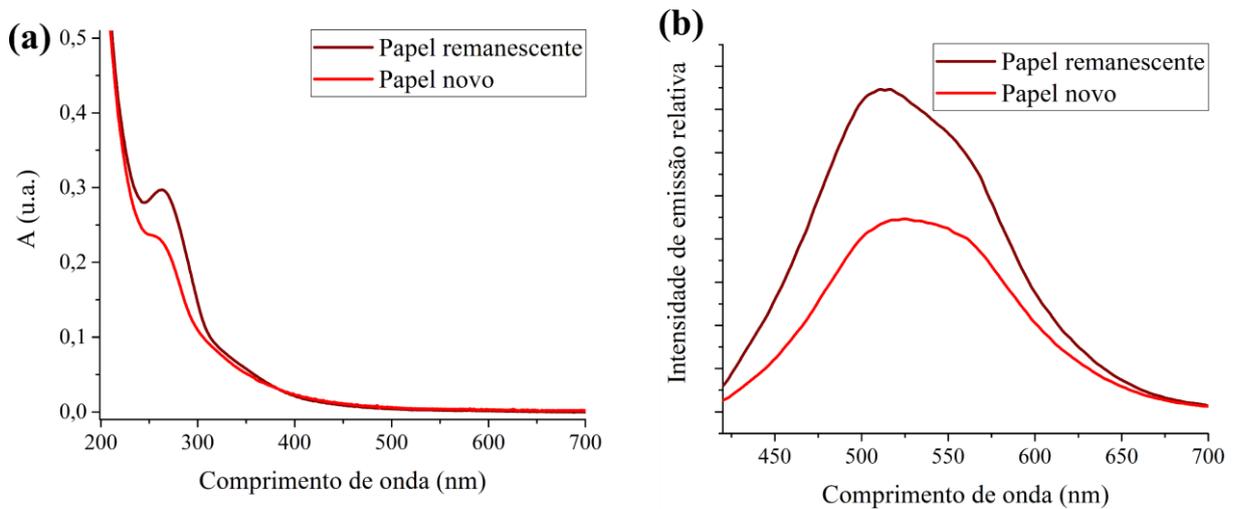


5.3 Síntese com papel residual

Levando em consideração o critério da química verde que fala sobre o consumo total dos reagentes (LENARDÃO et al., 2003), a síntese de CQDs descrita neste trabalho não é verde, pois muito pouco do papel posto no reator é consumido, então foi avaliada a possibilidade de utilizar o resíduo de uma síntese em uma nova síntese. Desta forma,

foi realizada uma síntese com o papel remanescente de uma síntese nas mesmas condições. Para comparação, na **Figura 10**, encontram-se os espectros de absorção e emissão da síntese feita primeiro (com papel novo, que ainda não foi utilizado em uma síntese) e da síntese feita com o papel remanescente desta primeira síntese.

Figura 10 – Espectros de (a) absorção e (b) emissão (excitação em 400 nm) das sínteses feitas com papel novo e com papel remanescente da síntese anterior.



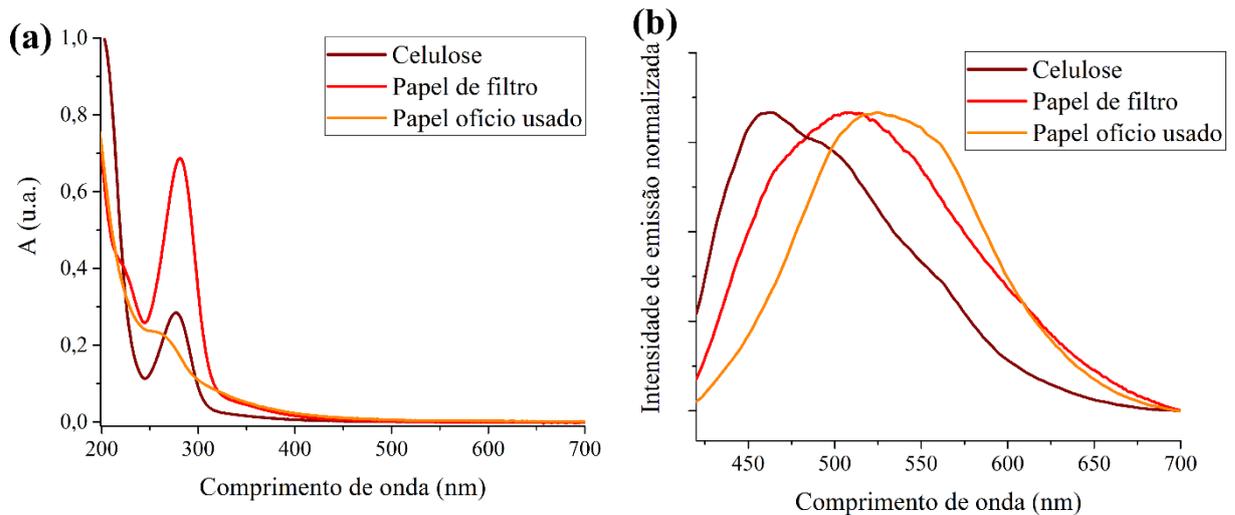
Observa-se na **Figura 10**, que ambos os espectros têm maior intensidade para a síntese feita com o papel remanescente, mostrando que seria vantajoso continuar utilizando o papel remanescente tanto do ponto de vista da química verde quanto do ponto de vista da eficiência de produção dos CQDs. Entretanto, o perfil dos espectros da síntese com o papel remanescente é um pouco diferente da síntese feita com papel novo, mostrando que há formação de outras estruturas ou das mesmas em proporção diferente. Este ponto deve ser melhor investigado, tanto em relação às espécies formadas quanto em relação a quantidade de vezes que o papel remanescente poderia ser utilizado.

5.4 Avaliação da influência da fonte de celulose na fluorescência dos CQDs

Com o intuito de elucidar a origem dos CQDs formados a partir do papel, foram feitas: uma síntese com um papel “sem fluoróforo”, usando papel de filtro qualitativo, e

uma síntese com celulose em pó. Os espectros de absorção e emissão dessas sínteses estão na **Figura 11**, junto aos espectros obtidos da síntese feita normalmente, com papel ofício impresso que já não estava mais sendo usado.

Figura 11 – Espectros de (a) absorção e (b) emissão (excitação em 400 nm) de sínteses feitas com papel ofício usado, com papel de filtro e com celulose.



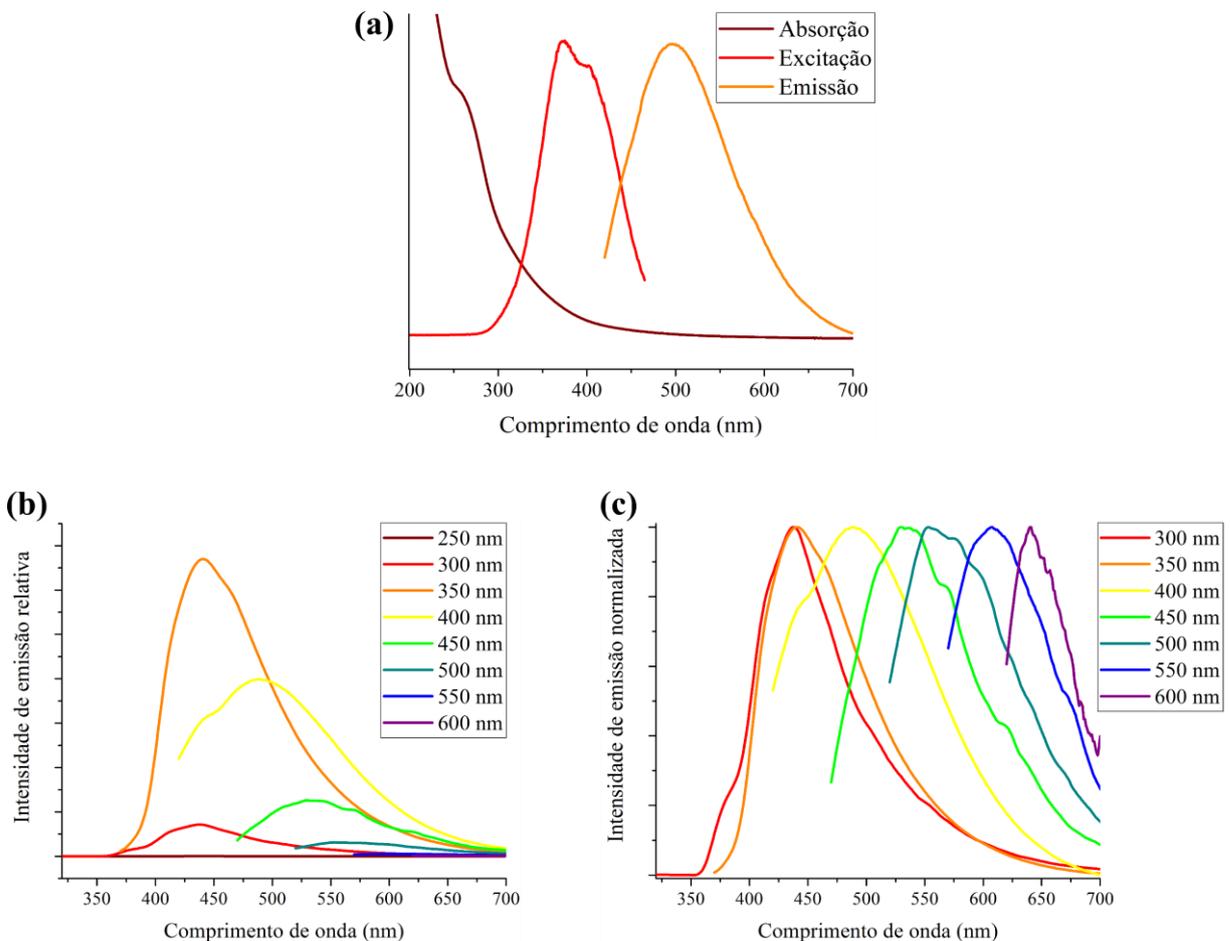
Nos espectros de absorção da **Figura 11 (a)**, observa-se que as sínteses com celulose e com papel de filtro apresentaram bandas semelhantes, já a síntese com o papel usado apresentou bandas diferentes, mas também na mesma região das outras sínteses. Os espectros (**Figura 11 (b)**) de emissão são, aparentemente, bastante diferentes, mas com um padrão: deslocam-se para comprimentos de onda maiores, em comparação com o espectro da celulose. Estas observações indicam que os CQDs formados são provenientes da celulose, mas a medida em que são adicionados outros constituintes, os espectros de emissão são influenciados deslocando-os proporcionalmente. Por fim, o papel permaneceu sendo utilizado como fonte de celulose para a síntese de CQDs.

5.5 Caracterizações óticas dos CQDs

Uma vez escolhidas as condições da síntese: 200 W de potência, 30 min. de aquecimento e 1 g de papel; na **Figura 12 (a)** estão resumidos os espectros de absorção,

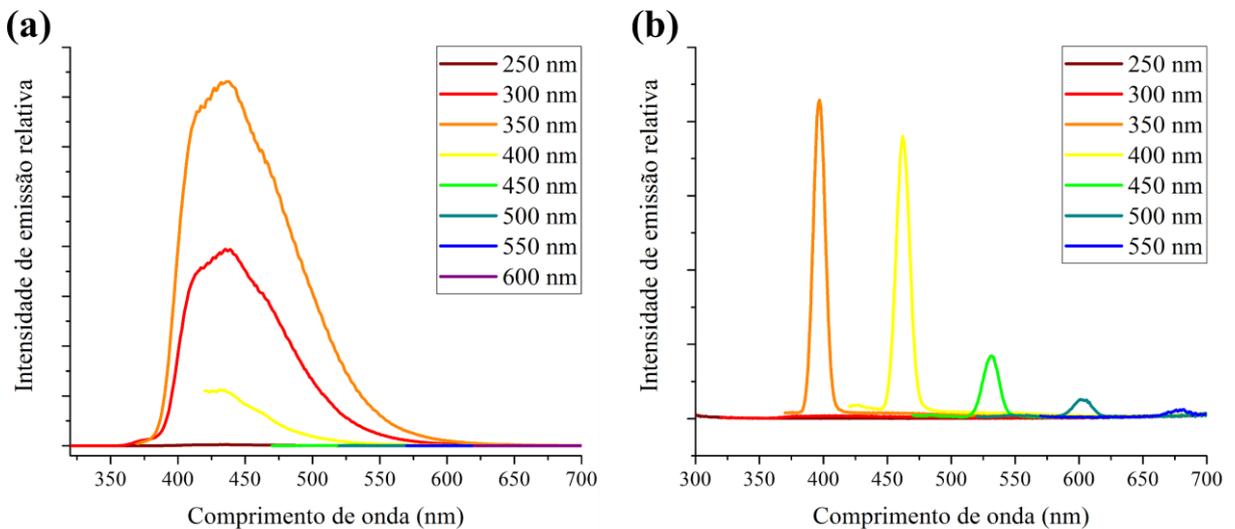
excitação e emissão. Nesta figura, encontra-se um espectro de absorção característico de material nanométrico com um máximo de absorção bem definido no comprimento de onda de 266 nm e uma segunda absorção na faixa de 300 a 400 nm; espectro de excitação (detecção em 485 nm) com máximo no comprimento de onda de 373 nm; espectro emissão (excitação em 400 nm) com máximo no comprimento de onda de 496 nm, largura à meia-altura de 137 nm e deslocamento de Stokes de 96 nm. Como visto na **Figura 12 (b)** onde estão os espectros de emissão nos diferentes comprimentos de onda de excitação, e mais evidentemente na **Figura 12 (c)** onde estão os espectros da **Figura 12 (b)** normalizados, o espectro de emissão dos CQDs produzidos é dependente da excitação, como também é observado em diferentes trabalhos da literatura.

Figura 12 – (a) Espectros de absorção, excitação e emissão dos CQDs produzidos na condição de síntese escolhida. (b) Espectros de emissão dos CQDs excitados em diferentes comprimentos de onda (250 – 600 nm). (c) Espectros de emissão de (b) normalizados, exceto o espectro excitado em 250 nm.



Observa-se que o comprimento de onda de excitação que resulta em emissão de maior intensidade é o de 350 nm, entretanto o comprimento de onda escolhido para todas as avaliações feitas neste trabalho, inclusive para a aplicação dada mais adiante, foi o de 400 nm. O comprimento de onda de excitação de 400 nm foi selecionado porque além da emissão dos CQDs também estão presentes nos espectros de emissão, sinais do fluoróforo proveniente do papel e da autofluorescência da água (**Figura 13**).

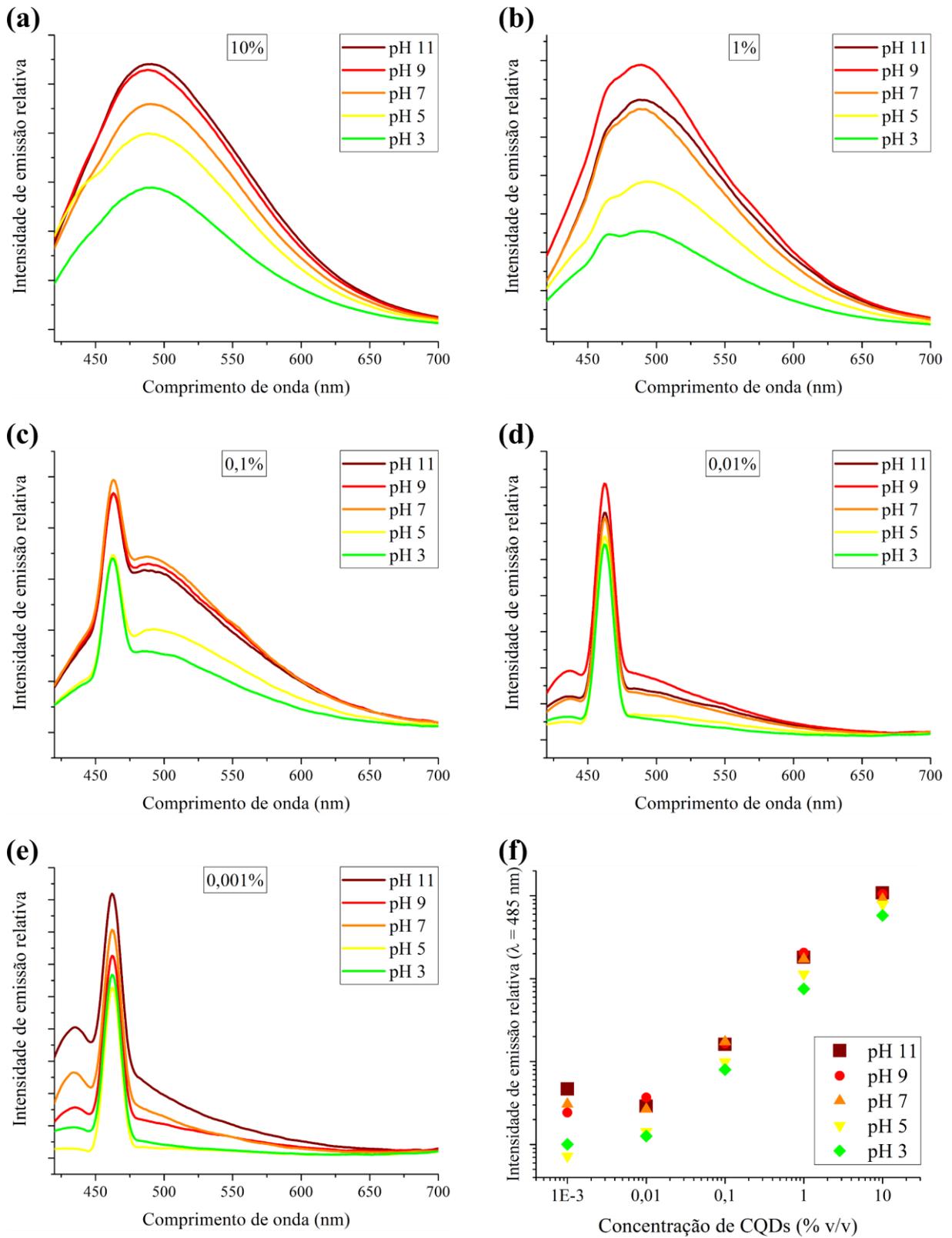
Figura 13 – Espectros de emissão **(a)** do fluoróforo proveniente do papel com excitações de 250 - 600 nm e **(b)** da água com excitações de 250 - 550 nm.



Enquanto a emissão do fluoróforo (**Figura 13 (a)**) se fixa em 438 nm e pode ser evitada utilizando excitações onde os CQDs emitam em comprimentos de onda maiores, a emissão da água se mostra dependente da excitação, assim como a dos CQDs, mas não têm o mesmo deslocamento. Desta forma, em alguns espectros dos CQDs a emissão da água aparece no centro do espectro e em outros aparece na lateral. Logo, o espectro de emissão a ser escolhido seria o espectro excitado em maior comprimento de onda (para evitar a emissão do fluoróforo), mas a intensidade de emissão dos CQDs diminui muito, sendo razoável apenas até 450 nm. Como a emissão da água aparece no centro do espectro excitado em 450 nm, foi escolhido, então, o comprimento de onda de excitação de 400 nm; pois é o espectro com intensidade razoável, mais afastado da emissão do fluoróforo e sem a emissão da água no centro do espectro.

Para avaliar como a emissão dos CQDs se comporta em diferentes condições, foram coletados espectros de emissão dos CQDs, excitados em 400 nm, sob diferentes pH e concentrações de CQDs (**Figura 14 (a) - (e)**). As concentrações foram estabelecidas considerando os valores das diluições em relação à solução obtida da síntese (considerada como 100%) e os pH foram ajustados apenas com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. Observa-se que a medida em que a concentração de CQDs diminui, o sinal da água fica mais evidente. Além disso, a intensidade de emissão diminui em pH ácido, e é proporcional ao aumento da acidez. Mas, em pH neutro ou básico a intensidade de emissão é maior que em pH ácido. Na concentração de CQDs em 10% (**Figura 14 (a)**), a intensidade de emissão é proporcional ao aumento da basicidade, entretanto nas outras concentrações ocorrem inversões. É provável que estas alterações na emissão dos CQDs, de acordo com o pH, sejam devido à protonação ou desprotonação dos grupos da superfície dos pontos quânticos.

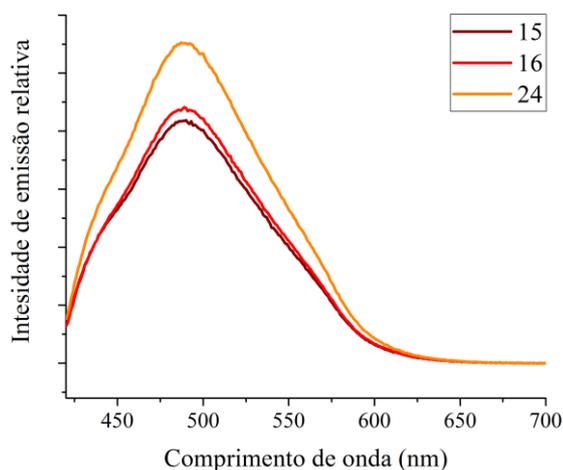
Figura 14 – Espectros de emissão (excitação em 400 nm) variando o pH da solução CQDs em concentrações de CQDs de (a) 10, (b) 1, (c) 0,1, (d) 0,01 e (e) 0,001%. (f) Intensidades, em 485 nm, de cada um dos espectros versus a concentração dos CQDs.



A **Figura 14 (f)** foi construída com as intensidades de emissão em 485 nm em cada condição para que fossem observadas as taxas de aumento de emissão devido ao aumento da concentração em cada pH, mas como as intensidades variaram em várias ordens de grandeza, foi utilizada a escala logarítmica nos dois eixos para que todos os pontos pudessem ser visualizados. As concentrações escolhidas para serem avaliadas aumentaram numa taxa de 10 (0,001 - 0,01 - 0,1 - 1 - 10% de CQDs), então seria de se esperar que as intensidades de emissão também aumentassem numa taxa de 10 com o aumento da concentração, porém o que foi observado foi uma taxa de no máximo 2 com o aumento da concentração de 0,001% para 0,01% e taxas em torno de 6, 11 e 6 nos aumentos seguintes.

Quando repetida a síntese de CQDs, proposta neste trabalho, em dias diferentes: 15°, 16° e 24° dias do mesmo mês, observam-se espectros de emissão (**Figura 15**) muito semelhantes, apenas com diferenças na intensidade, indicando que ao repetir a síntese o mesmo material é formado, mas em quantidades diferentes.

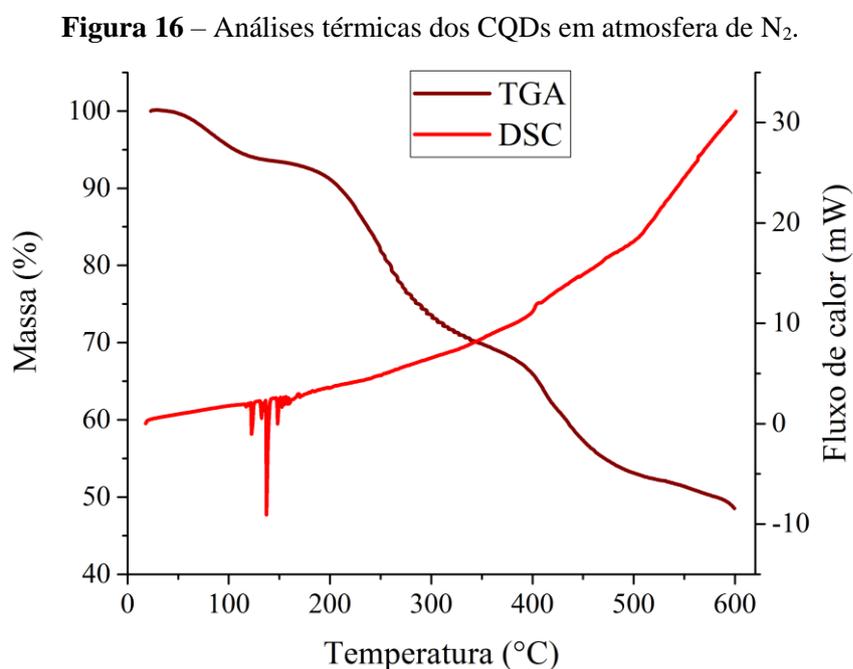
Figura 15 – Espectros de emissão (exc. 400 nm) da síntese repetida em dias diferentes (15, 16 e 24).



O rendimento quântico medido, a partir da absorção e da área de fluorescência relativos a um padrão de quinino excitado em 366 nm, foi de 9%.

5.6 Outras caracterizações dos CQDs

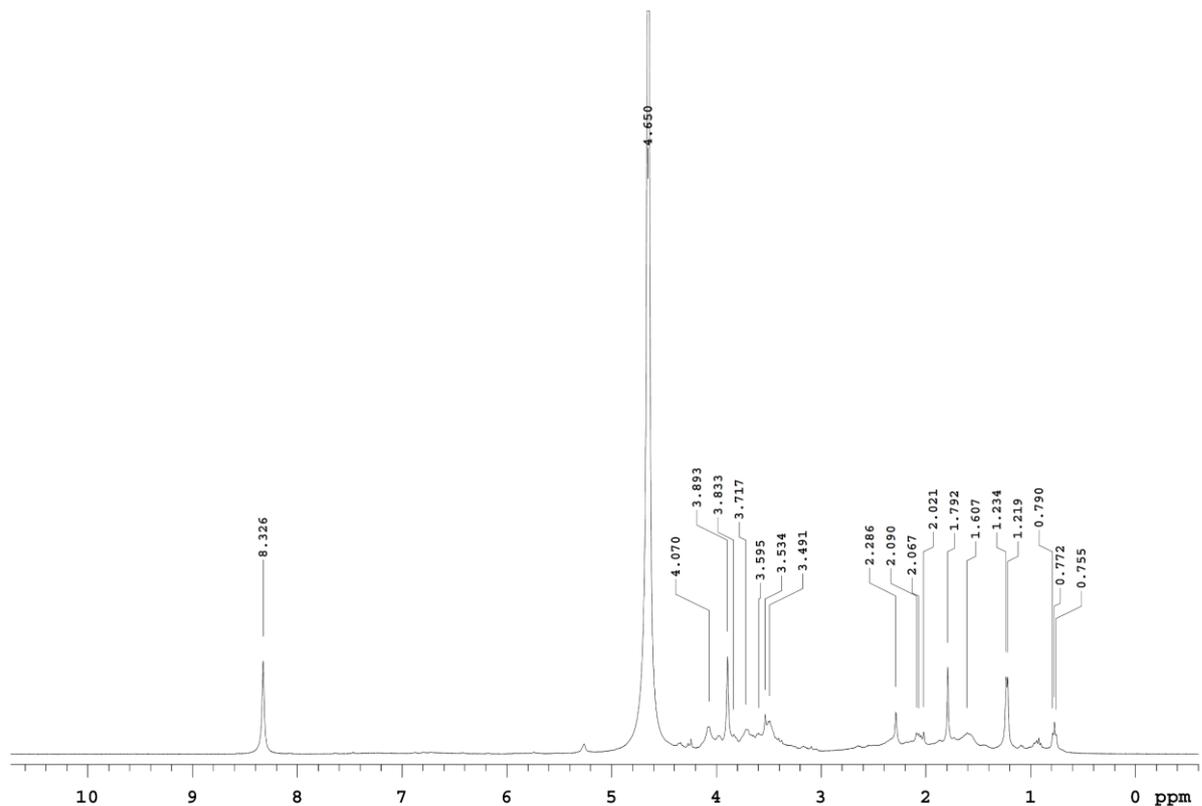
As análises térmicas de TGA e DSC dos CQDs estão representadas na **Figura 16**. Observa-se na linha do TGA uma perda de massa inicial de aproximadamente 6% até 150 °C: esta região é característica da perda de água. Após esta perda de massa, há uma perda de 23% até 345 °C e depois mais perdas menores até 600 °C chegando até 48,5% da massa inicial. A uma temperatura de 600 °C, toda a parte orgânica (os CQDs) já foi eliminada, restando apenas resíduos inorgânicos, como por exemplo, o Al_2O_3 , o SiO_2 e o TiO_2 que é o fluoróforo adicionado como branqueador, em quantidade considerável, ao papel durante a fabricação (SOUSA et al., 2016). Na linha do DSC, encontram-se uma série de picos endotérmicos (de 117 a 160 °C) em uma região onde não há perda de massa considerável, indicando que na região não há apenas a perda de água, mas também podem estar acontecendo outros processos como transições de fase. Assim, os CQDs produzidos neste trabalho não seriam indicados para aplicações em que as temperaturas ultrapassem 115 °C.



No espectro de NMR dos CQDs sintetizados neste trabalho (**Figura 17**), encontram-se sinais até 3 ppm que seriam referentes a hidrogênios ligados a carbonos sp^3 , sinais de 3 a 6 ppm que seriam referentes a hidrogênios ligados a grupos hidroxila,

éter ou carbonílicos, e um sinal em 8,326 ppm que seria referente a hidrogênios de aldeído, regiões também observadas por DE e KARAK (2013). Já na região de 6 a 8 ppm, região de hidrogênios de anéis aromáticos ou carbonos sp^2 , não aparecem sinais, indicando que os CQDs formados provavelmente não apresentam grupos aromáticos. Indicando, assim, que não há regiões gráficas e, conseqüentemente, os CQDs aqui sintetizados não seriam GQDs ou mesmo GCQDs. Também foi realizado o NMR de ^{13}C , mas não foram observados quaisquer picos.

Figura 17 – 1H NMR dos CQDs (solvente: D_2O).

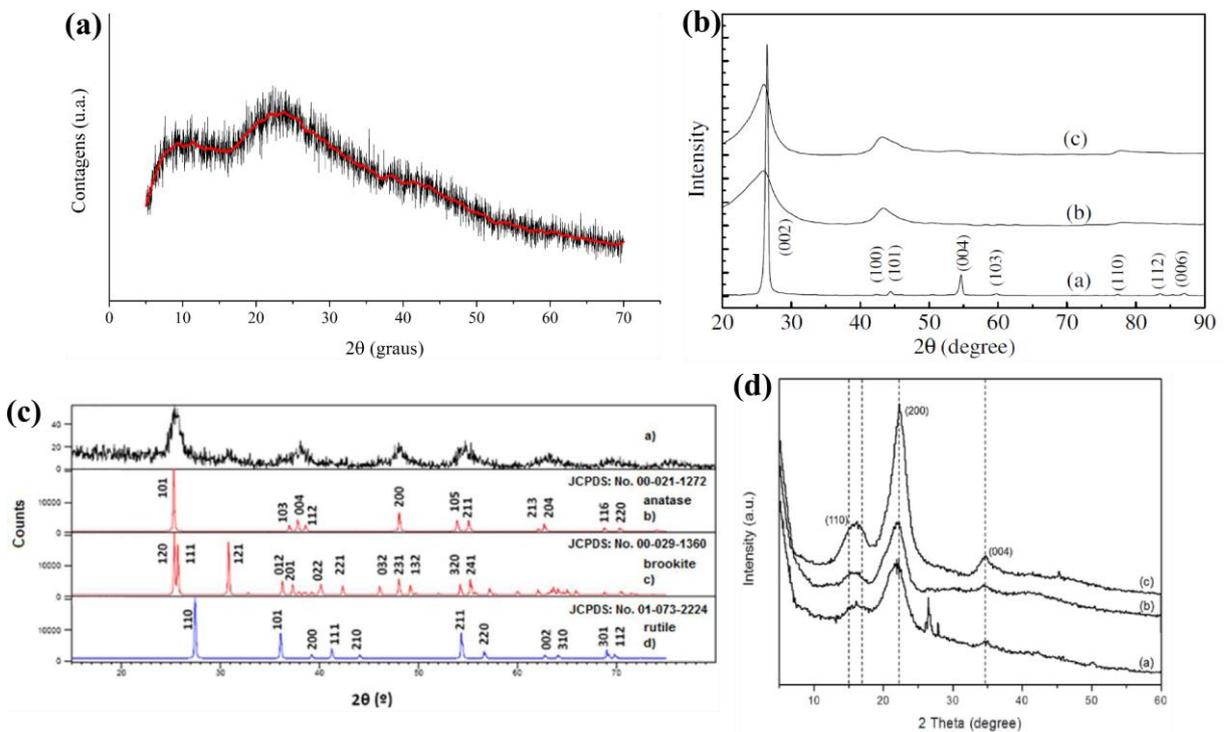


O potencial zeta medido foi de -5,92 mV (pH aproximadamente 5), evidenciando uma superfície negativamente carregada.

Afim de avaliar a estrutura dos CQDs foi realizado o XRD, obtendo-se o difratograma da **Figura 18 (a)**. Nesta figura, observam-se sinais alargados indicativos de poucas regiões organizadas. Diferentes estruturas podem estar presentes na amostra

de CQDs: regiões com estrutura gráfrica (difratograma do grafite moído [Figura 18 (b) difratograma (b)]), estruturas do TiO_2 em suas diferentes fases (Figura 18 (c)) ou até regiões organizadas de celulose (Figura 18 (d) difratograma (c)). Ao comparar o difratograma dos CQDs com os difratogramas das diferentes estruturas possíveis de compor o difratograma dos CQDs, não foi possível relacionar os sinais do XRD dos CQDs a quaisquer estruturas.

Figura 18 – Difratogramas de raios-X de (a) CQDs; (b) a - grafite, b - grafite moído, e c - grafite moído e recozido; (c) a - nanopartículas de TiO_2 , b - TiO_2 anatase, c - TiO_2 brookite e d - TiO_2 rutilo; (d) a - bagaço de cana-de-açúcar, b - celulose, e c - celulose nanocrystalina.

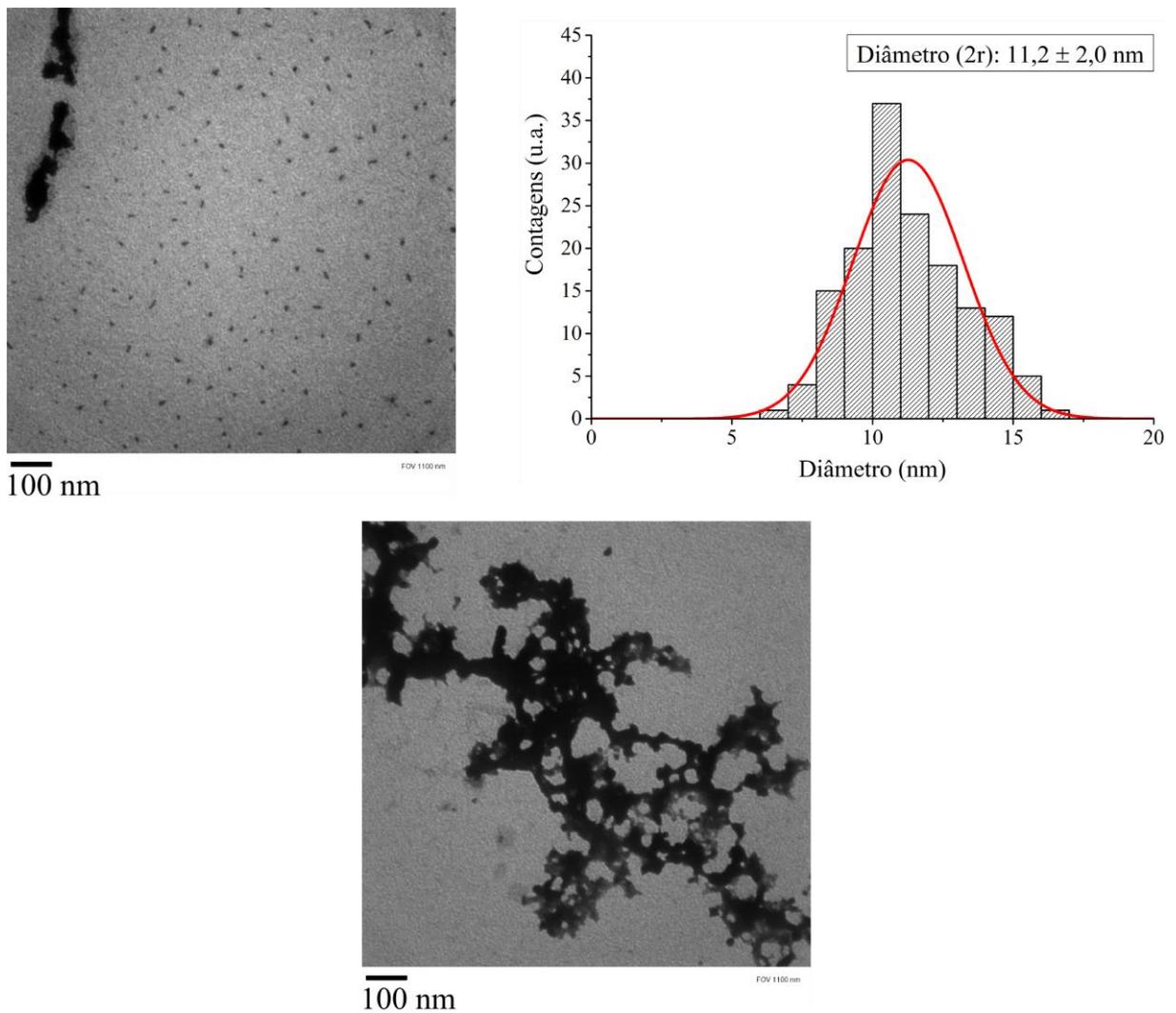


Fonte: (b) LI et al. (2007). (c) FERNÁNDEZ-ACOSTA et al., (2016). (d) KUMAR et al. (2014).

Na determinação do tamanho dos CQDs foram realizadas análises de DLS e de microscopia eletrônica de baixa voltagem (LVEM). Nas medidas de DLS foram adquiridas medidas de, em média, $9,6 \mu\text{m}$ para a solução de CQDs diluída. Imagens obtidas através da microscopia estão apresentadas na Figura 19, onde se observam diferentes estruturas provenientes da solução obtida ao final da síntese dos CQDs. São observadas desde estruturas micrométricas até estruturas nanométricas, chegando a

menos de 10 nm e permanecendo em torno de 11,2 nm, como visto no histograma. A presença destas estruturas muito grandes devem ser a causa do valor obtido no DLS. Em contrapartida, está explícita a presença de estruturas nanométricas, as quais são os CQDs sintetizados. As estruturas micrométricas observadas podem ser resíduos da síntese, papel que não foi quebrado a tamanhos nanométricos.

Figura 19 – Imagens de microscopia eletrônica da solução obtida da síntese de CQDs e histograma de distribuição de tamanhos dos CQDs.

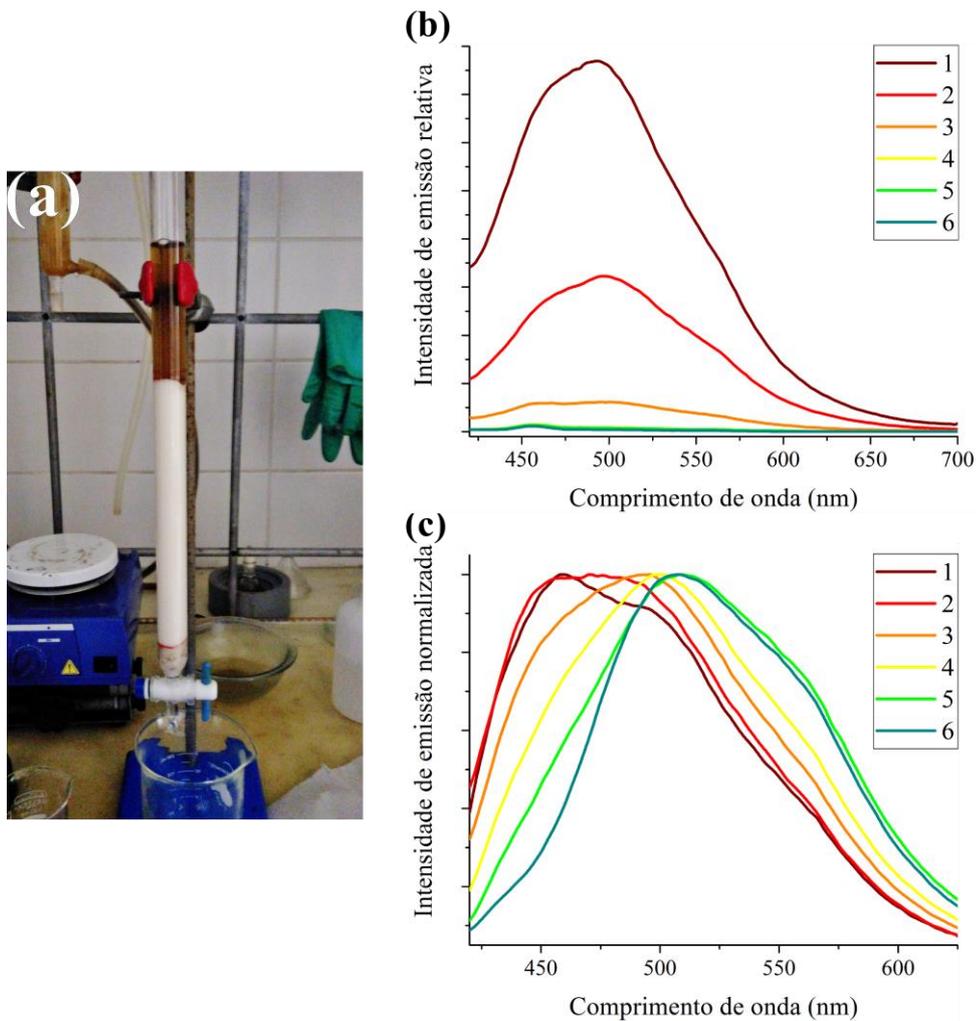


5.7 Separação cromatográfica

Com o objetivo de avaliar a possibilidade de separar as populações de CQDs obtidas juntamente na síntese, foi preparada uma coluna cromatográfica clássica com

fase estacionária de celulose e fase móvel água, como na **Figura 20 (a)**. No empacotamento da celulose foi observado que havia luminescência na água que saía antes mesmo da adição dos CQDs, então a coluna foi lavada até a minimização da fluorescência (**Figura 20 (b)**). A solução de CQDs foi passada pela coluna e frações da solução de saída foram coletadas de acordo com as mudanças de cor ou fluorescência visualizadas; destas frações foram obtidos os espectros de fluorescência apresentados na **Figura 20 (c)**, numerados de 1 a 6.

Figura 20 – (a) Coluna cromatográfica com CQDs durante a separação. (b) Espectros de emissão (excitação em 400 nm) de 6 frações de águas de lavagem (1 a 6) que saíram da coluna durante a lavagem da mesma. (c) Espectros de emissão (exc. 400 nm) de 6 frações coletadas (1 a 6) na separação dos CQDs.



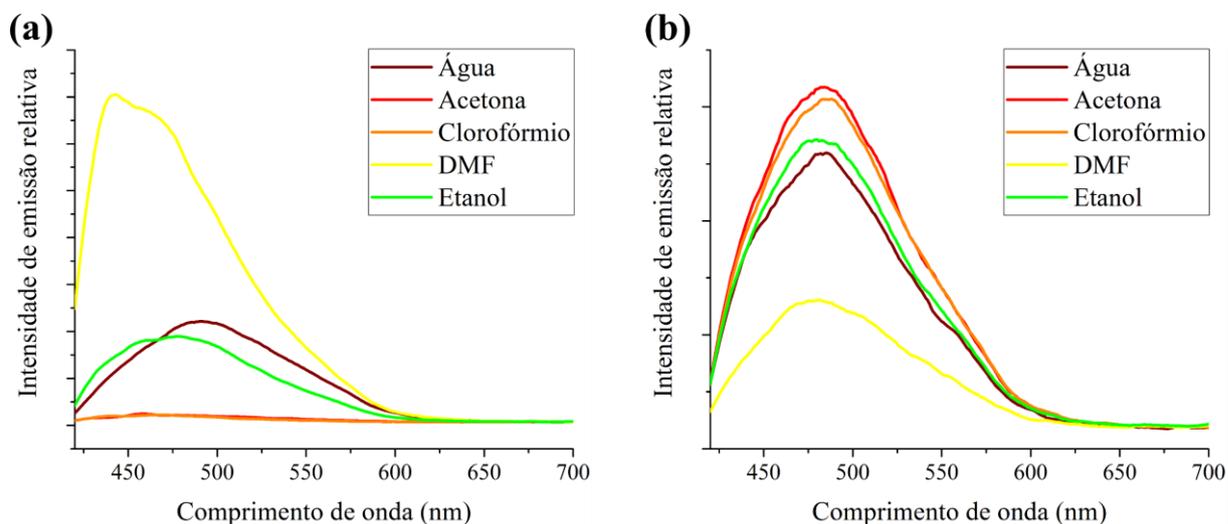
Na separação dos CQDs observa-se variação em 3 regiões do espectro: em 455, 500 e 560 nm, indicando que há pelo menos 3 populações majoritárias de CQDs e que

estas populações são separáveis. Se fosse utilizada uma coluna com a qual se obtivesse melhor separação, poderia ser possível obter cada população separadamente. É possível que seja vantajoso adicionar este procedimento pós-síntese afim de se obter diferentes soluções de CQDs que emitam em diferentes regiões do espectro, com perfil de emissão estreito e uma fina distribuição de tamanhos. A nível de comparação, foram feitas observações semelhantes nos trabalhos de LI et al. (2010) e PHILIPPIDIS et al. (2013).

5.8 Solubilidade dos CQDs em outros solventes

Para que se possa atribuir outras aplicações aos CQDs em que seja necessário utilizar solventes orgânicos, foi verificada a dispersibilidade e conseqüentemente a alteração da emissão dos CQDs em alguns solventes comuns. A **Figura 21 (a)** mostra os espectros de emissão dos CQDs dispersos em solventes orgânicos e a **Figura 21 (b)**, dos precipitados ressolubilizados em água.

Figura 21 – Espectros de emissão (excitação em 400 nm) dos CQDs **(a)** solubilizados em diferentes solventes e **(b)** dos respectivos precipitados ressolubilizados em água.



Através dos espectros dos sobrenadantes (**Figura 21 (a)**), pode-se dizer que os CQDs não são dispersáveis em acetona e clorofórmio (linhas vermelha e laranja de baixas intensidades), em etanol são dispersáveis similarmente à água, e em DMF além da dispersibilidade houve um efeito que gerou um grande aumento da intensidade de fluorescência dos CQDs. Já nos espectros dos precipitados ressolubilizados (**Figura 21**

(b)), observa-se a baixa intensidade do espectro do precipitado do DMF, confirmando a dispersão dos CQDs neste solvente. Para os outros precipitados observou-se certo aumento da intensidade de fluorescência, em especial no caso do etanol, porque parte dos CQDs já haviam sido dispersados no sobrenadante. É possível que este aumento tenha ocorrido devido a algum efeito provocado pelo solvente orgânico, que pode ter deslocado moléculas de água da superfície do CQD. Assim, é ressaltado que os CQDs são dispersáveis apenas nos solventes que tenham maior capacidade de formar ligações de hidrogênio, porém apenas foram totalmente dispersáveis em água.

Na aplicação dada aos CQDs, o solvente escolhido foi a água, como solvente para os CQDs e para as soluções de tampão, mas também foi utilizado metanol, apenas como solvente para o analito (quercetina) que é pouco solúvel em água.

5.9 Otimização das condições de análise de quercetina

Os CQDs sintetizados neste trabalho foram aplicados como sensor de quercetina para amostras de bebidas, como chás e sucos.

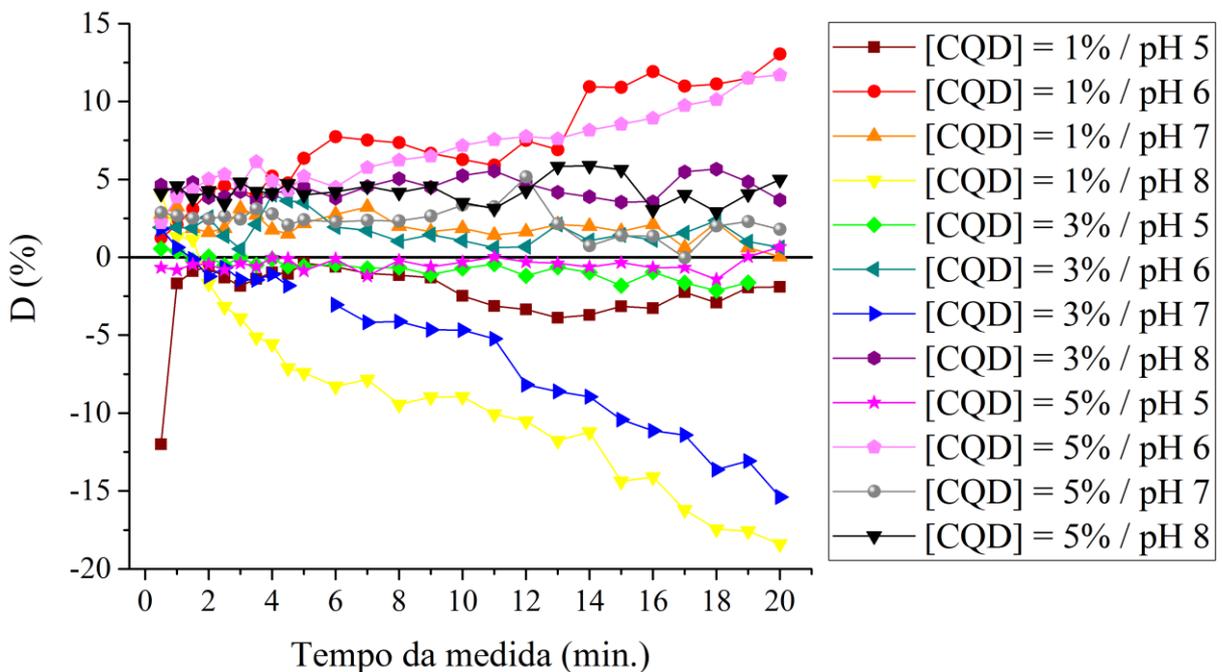
Inicialmente, as condições de pH, tempo (t) de resposta e concentração de CQDs ([CQD]) foram otimizadas com o objetivo de obter maior separação entre a intensidade de emissão dos CQDs na presença do analito e a intensidade do branco. Para avaliar cada condição, foram coletadas as intensidades de emissão em 485 nm (quando excitado em 400 nm) para um branco (metanol) e um padrão de quercetina de 50 mg L⁻¹.

Os valores das intensidades foram substituídos na equação (1) para que seja obtida uma porcentagem da diferença D entre a intensidade com o padrão ou amostra e a intensidade com o branco. Os dados de D foram compilados em um gráfico de D *versus* o tempo da medida. Geralmente estes valores são representados na forma de $(F_0 - F)/F_0$ ou F_0/F , entretanto foram aqui representados na forma de D para que a interpretação dos dados fosse facilitada (SEEDHER; KANOJIA, 2009), pois através de D é dada uma noção mais clara da supressão da fluorescência devido à quercetina (quanto maior a porcentagem (D), maior a supressão da fluorescência).

$$D = \frac{I_{BR} - I_{PQ}}{I_{BR}} \cdot 100 \quad (1)$$

Como o fenômeno de interação com a quercetina foi de supressão de fluorescência, a intensidade do branco (I_{BR}) deve ser maior que a do padrão de quercetina (I_{PQ}) e o valor de D deve ser positivo. É desejável que a diferença entre as duas intensidades seja grande, ou seja, a melhor condição será a que apresenta maior valor de D. Além disso, os valores de D devem, preferencialmente, se tornar constantes ao longo do tempo e atingir tal estabilização o mais breve possível, possibilitando maior frequência analítica. Estas características de D para cada condição de análise podem ser melhor observadas no gráfico de D *versus* tempo da medida, na **Figura 22**, onde a melhor condição de análise seria aquela que apresentasse seus pontos em uma linha horizontal (D constante) e acima e mais distante do zero (D positivo e grande).

Figura 22 – Gráfico dos valores de D em relação ao tempo de medida, para cada condição de análise variada entre [CQDs] de 1, 3 e 5% e pHs de 5, 6, 7 e 8.

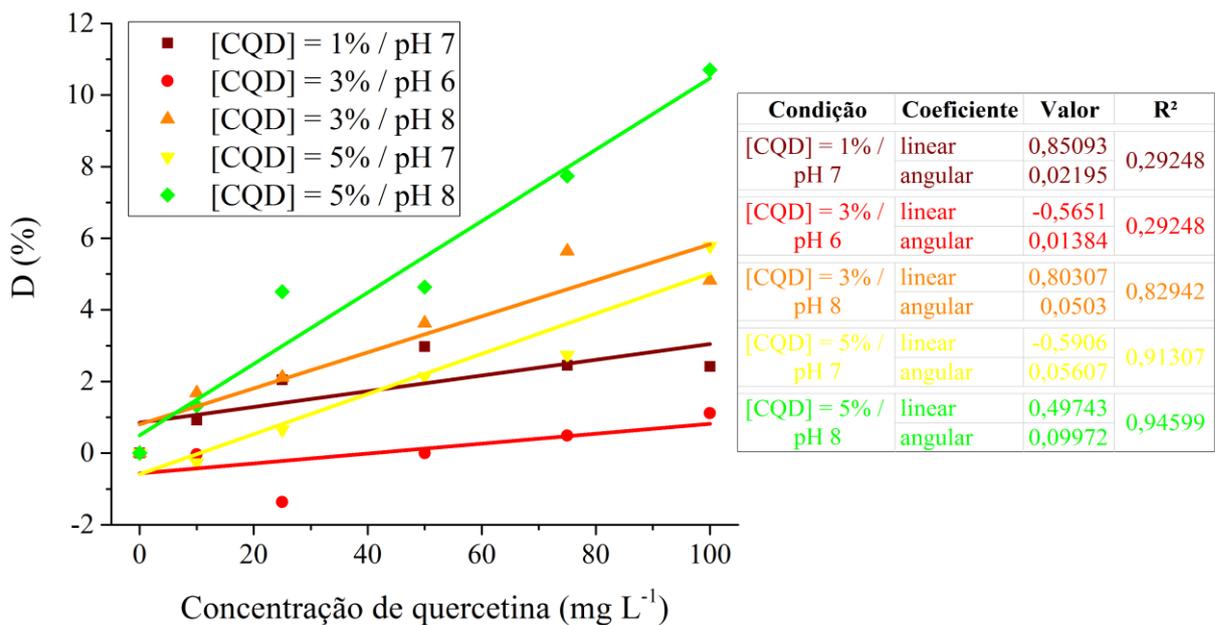


Dos valores de D na **Figura 22**, observam-se que as condições [CQD] = 1% / pH 7, [CQD] = 3% / pH 6, [CQD] = 3% / pH 8, [CQD] = 5% / pH 7 e [CQD] = 5% / pH 8 apresentam valores de D positivos, com baixa variação ao longo do tempo e varia em

torno de uma linha horizontal; por isto, tais condições se mostraram de acordo com os requisitos pré-estabelecidos para a escolha da condição de análise. Estas seriam as melhores condições, porém é difícil verificar qual seria a melhor entre elas, então foram feitas curvas de calibração com soluções padrão de quercetina em cada uma dessas condições e a curva que resultasse em maior coeficiente angular e maior R^2 seria a melhor condição.

As curvas de D versus concentração de quercetina analisadas nas condições em questão estão apresentadas na **Figura 23**, e a condição que apresentou os requisitos para a escolha foi a curva da condição $[CQD] = 5\% / \text{pH } 8$.

Figura 23 – Gráfico de D versus concentração de quercetina das curvas feitas nas possíveis melhores condições de análise.

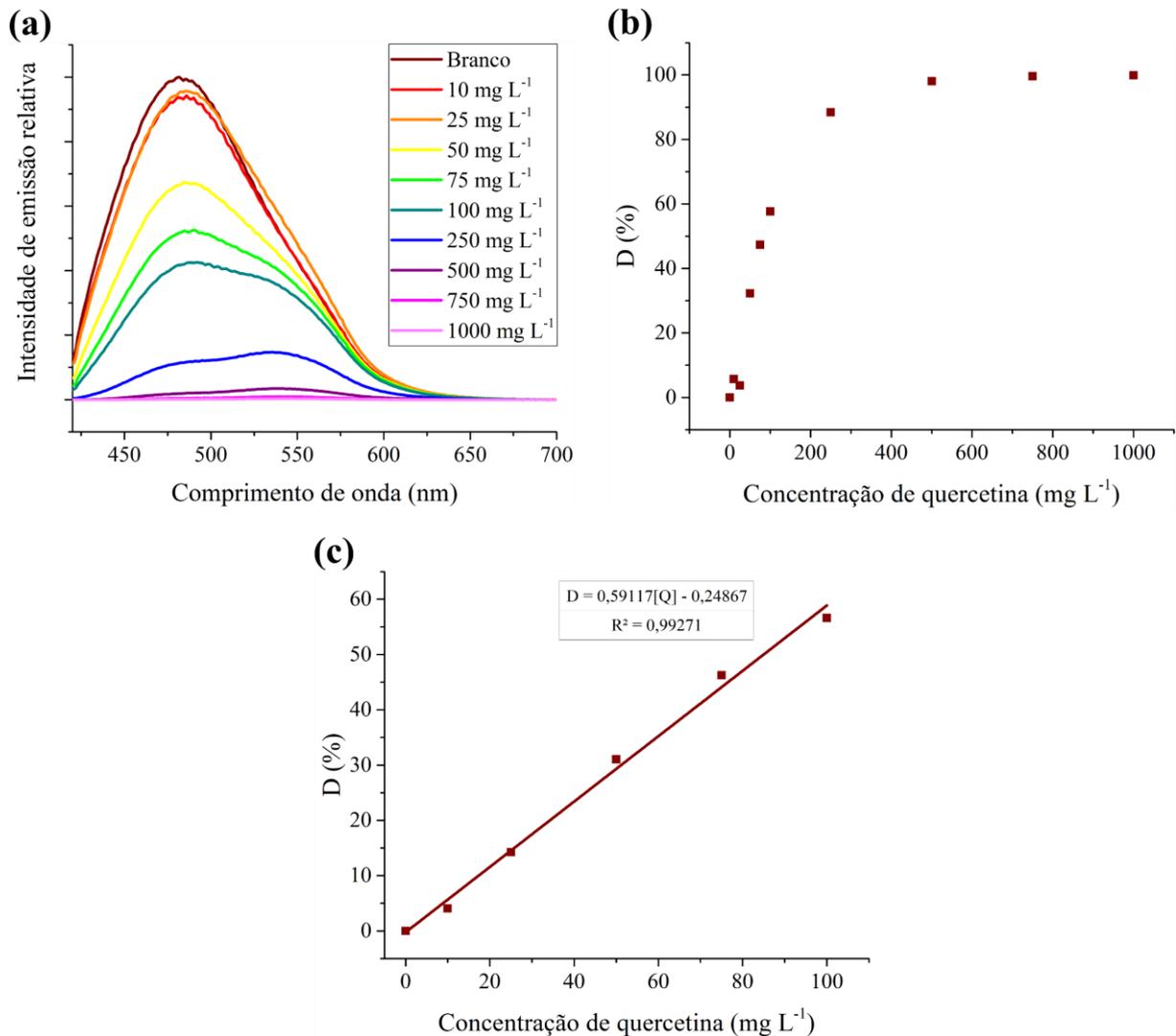


Com relação ao tempo da medida, observou-se, na **Figura 22**, menor variação a partir de 1 min. até cerca de 9 min., então para que haja margem de segurança para variações no tempo de reação, foi escolhido o tempo de medida em 3 min.

5.10 Figuras de mérito para a análise de quercetina

Para determinar a faixa linear de determinação da quercetina, foram analisadas soluções padrão de concentrações 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750 e 1000 mg L⁻¹ de quercetina (**Figura 24 (a) e (b)**), foi alcançada a supressão total do sinal (100%) e chegou-se à conclusão de que a faixa linear seria de 10 a 100 mg L⁻¹.

Figura 24 – (a) Espectros de emissão (excitação em 400 nm) das análises dos padrões de quercetina em concentrações de 10 a 1000 mg L⁻¹. (b) Valores de D das intensidades dos espectros de (a) em 485 nm *versus* a concentração de quercetina. (c) Curva analítica traçada para a faixa linear.



Para a faixa linear encontrada, foi ajustada a curva analítica da **Figura 24 (c)** em que se obteve um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9927. Com o desvio padrão de

medidas repetidas do branco e o coeficiente angular da curva analítica, pelo método da IUPAC (CURRIE, 1995), foram calculados os valores de LD e LQ de 1,0 e 3,4 mg L⁻¹, respectivamente. E para o RSD foi encontrado um valor de 3,7% (n = 9, solução padrão de 50 mg L⁻¹ de quercetina).

5.11 Análise de amostras reais e determinações dos valores de recuperação

Foram analisadas uma amostra de chá de erva-doce e uma amostra de suco de maçã, diluídos para 10% (v/v) em metanol. Houve a necessidade de um branco da amostra, pois havia luminescência proveniente da mesma, então foi feita uma medida da amostra sem a presença dos CQDs. Afim de ser calculada a concentração de quercetina nas amostras, foram calculados os valores de D, mas além de subtrair o sinal da amostra do sinal do branco (I_{BR}, branco da curva analítica), o sinal da amostra também foi subtraído do branco da amostra, mas no denominador permaneceu apenas o I_{BR}. Em seguida, os valores de D para as amostras foram lançados na curva analítica medida no mesmo dia da análise das amostras e foram encontradas as concentrações de 1,0 mg L⁻¹ de quercetina para o suco diluído e 15,3 mg L⁻¹ de quercetina para o chá diluído. A concentração de quercetina no chá seria, então, 153 mg L⁻¹. O suco, porém, deve ser analisado novamente com menor diluição, pois ficou abaixo do LQ.

Para os cálculos de recuperação nessas amostras, foram adicionadas as concentrações de 30 e 70 mg L⁻¹ de quercetina às amostras e obtiveram-se os valores de recuperação como mostra a **Tabela 3**.

Tabela 3 – Valores de recuperação encontrados para as amostras analisadas.

Amostra (Concentração)	Concentração adicionada (mg L ⁻¹)	Concentração encontrada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
Chá (15,3 mg L ⁻¹)	30	61,9	155
	70	112,4	139
Suco (1,0 mg L ⁻¹)	30	39,3	128
	70	79,4	112

6 Conclusões

Através de um método verde, foram sintetizados CQDs a partir de papel e água utilizando irradiação de micro-ondas. As condições de síntese foram estabelecidas através de um planejamento fatorial 2^3 , sendo escolhida a condição que utilizou 200 W de potência, 30 min. de aquecimento e 1 g de papel. Foi escolhida a centrifugação e o uso de água ultrapura. Os CQDs obtidos apresentaram emissão dependente da excitação, deslocamento de Stokes de 96 nm, largura à meia-altura de 137 nm e rendimento quântico de 9%.

A estabilidade térmica dos CQDs sintetizados se mostrou até cerca de 115 °C. O NMR indicou a ausência das regiões grafíticas. As sínteses realizadas com celulose e papel de filtro, certificaram a origem dos CQDs provenientes principalmente da celulose. Através da microscopia foram observados os CQDs com tamanhos, em média, de 11,2 nm. Na coluna cromatográfica, foi observada certa separação das populações dos CQDs. Os CQDs se mostraram totalmente dispersáveis apenas em água e parcialmente dispersáveis em etanol e DMF.

Na análise de quercetina, a melhor condição de análise foi a que utilizou pH 8, 5% (v/v) de CQDs e tempo de análise de 3 min. A faixa linear foi de 10 a 100 mg L⁻¹ de quercetina; para curva analítica obteve-se um R² de 0,9927, LD de 1,0 mg L⁻¹, LQ de 3,4 mg L⁻¹ e RSD de 3,7% (n = 9).

Foram analisadas, pelo método desenvolvido, uma amostra de chá e uma de suco. A concentração de quercetina encontrada no chá foi de 153 mg L⁻¹. Os valores de recuperação calculados variaram entre 112% e 155% para tais amostras.

7 Perspectivas

- Otimizar a síntese com outras variáveis, como por exemplo com o controle da pressão no reator.
- Avaliar a formação dos CQDs individualmente nos dois frascos de reação utilizados.
- Calcular os rendimentos quânticos dos diferentes CQDs: sintetizados com água destilada; separados por cromatografia; e sintetizados com o papel remanescente.
- Avaliar as modificações de propriedades dos CQDs inserindo um eletrólito na solução para realização da síntese.
- Refazer várias vezes seguidas a síntese com o papel remanescente de uma amostra para averiguar as mudanças obtidas.
- Verificar o consumo do papel durante as sínteses com as repetições do papel remanescente e analisar se esse resíduo pode ser totalmente consumido.
- Melhorar a separação cromatográfica com o uso de uma coluna maior ou outro material.
- Analisar outras amostras de bebidas para determinação de quercetina.
- Realizar estudos de possíveis interferentes do método proposto para determinação de quercetina, usando os CQDs.
- Realizar novas aplicações, não só como sensor analítico para outras substâncias e outros métodos, mas também em outras áreas, como dispositivos fotoelétricos ou eletroluminescentes.
- Realizar centrifugação em 15 000 rpm.
- Avaliar a interferência na aplicação dos CQDs devido ao uso da água destilada para síntese.
- Realizar síntese dopando com nitrogênio, por exemplo, adicionando NH_4OH .

- Avaliar fotodegradação através de irradiação contínua de ultravioleta.

Referências

ALGARRA, M. et al. Carbon dots obtained using hydrothermal treatment of formaldehyde. Cell imaging in vitro. **Nanoscale**, v. 6, n. 8, p. 9071, 2014.

ALIVISATOS, A. P. Perspectives on the Physical Chemistry of Semiconductor Nanocrystals. **Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 95, p. 13226–13239, 1996.

BAKER, S. N.; BAKER, G. A. Luminescent Carbon Nanodots: Emergent Nanolights. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, n. 38, p. 6726–6744, 10 set. 2010.

BELOVOLOVA, L. V. et al. Ultraviolet fluorescence of water and highly diluted aqueous media. **Physics of Wave Phenomena**, v. 17, n. 1, p. 21–31, 2009.

BERA, D. et al. Quantum Dots and Their Multimodal Applications: A Review. **Materials**, v. 3, n. 4, p. 2260–2345, 24 mar. 2010.

BROUWER, A. M. Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 83, n. 12, p. 2213–2228, 2011.

CHEN, G.; ZHANG, H.; YE, J. Determination of rutin and quercetin in plants by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 423, n. 1, p. 69–76, 2000.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n. 10, p. 1699–1723, 1995.

DA SILVA, J. C. G. E.; GONÇALVES, H. M. R. Analytical and bioanalytical applications of carbon dots. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 8, p. 1327–1336, 2011.

DE, B.; KARAK, N. A green and facile approach for the synthesis of water soluble fluorescent carbon dots from banana juice. **RSC Advances**, v. 3, n. 22, p. 8286, 2013.

DONG, Y. et al. Blue luminescent graphene quantum dots and graphene oxide prepared by tuning the carbonization degree of citric acid. **Carbon**, v. 50, n. 12, p. 4738–4743, 2012.

DU, F. et al. Carbon dots-based fluorescent probes for sensitive and selective detection of iodide. **Microchimica Acta**, v. 180, n. 5–6, p. 453–460, 2013.

FERNÁNDEZ-ACOSTA, R. et al. Nanostructured TiO₂ Obtained by Electrolysis and its Application in the Remediation of Water Polluted with Paracetamol. **Int. J. Chem. Mater. Environ. Res.**, v. 3, n. 2, p. 20–28, 2016.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 12, p. 1061–1080, 1995.

GEORGAKILAS, V. et al. Broad Family of Carbon Nanoallotropes: Classification, Chemistry, and Applications of Fullerenes, Carbon Dots, Nanotubes, Graphene, Nanodiamonds, and Combined Superstructures. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 11, p. 4744–4822, 2015.

GOMORI, G. Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies. In: LUNDBLAD, R. L.; MACDONALD, F. M. (Eds.). **Handbook of Biochemistry and Molecular Biology**. CRC Press, 2010. v. 131p. 721–724.

GONÇALVES, H. et al. Hg(II) sensing based on functionalized carbon dots obtained by direct laser ablation. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 145, n. 2, p. 702–707, 2010.

GONÇALVES, H. M. R. **Analytical Applications of Fluorescent Carbon Dots**. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2013.

GUO, Y. et al. Hydrothermal synthesis of highly fluorescent carbon nanoparticles from sodium citrate and their use for the detection of mercury ions. **Carbon**, v. 52, p. 583–589, 2013.

HE, J.-B.; LIN, X.-Q.; PAN, J. Multi-wall carbon nanotube paste electrode for adsorptive stripping determination of quercetin: A comparison with graphite paste electrode via voltammetry and chronopotentiometry. **Electroanalysis**, v. 17, n. 18, p. 1681–1686, 2005.

HU, S.-L. et al. One-step synthesis of fluorescent carbon nanoparticles by laser irradiation. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 484, 2009.

KUMAR, A. et al. Characterization of Cellulose Nanocrystals Produced by Acid-Hydrolysis from Sugarcane Bagasse as Agro-Waste. **Journal of Materials Physics and Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2014.

LENARDÃO, E. J. et al. “Green chemistry” - Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123–129, 2003.

LI, H. et al. Water-Soluble Fluorescent Carbon Quantum Dots and Photocatalyst Design. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 26, p. 4430–4434, 14 jun. 2010.

LI, H. et al. One-step ultrasonic synthesis of water-soluble carbon nanoparticles with excellent photoluminescent properties. **Carbon**, v. 49, n. 2, p. 605–609, 2011.

LI, Z. Q. et al. X-ray diffraction patterns of graphite and turbostratic carbon. **Carbon**, v. 45, n. 8, p. 1686–1695, 2007.

LIU, Y. et al. One-step microwave-assisted polyol synthesis of green luminescent carbon dots as optical nanoprobos. **Carbon**, v. 68, p. 258–264, 2014.

LIU, Y.; LIU, C.; ZHANG, Z. Synthesis and surface photochemistry of graphitized carbon quantum dots. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 356, n. 2, p. 416–421, abr. 2011.

MANSUR, H. S. Quantum dots and nanocomposites. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 2, n. 2, p. 113–129, mar. 2010.

MENON, S. et al. "Turn On" Fluorescence Determination of Nitrite Using Green Synthesized Carbon Nanoparticles. **Journal of Fluorescence**, v. 26, n. 1, p. 129–134, 2016.

PHILIPPIDIS, A. et al. Microwave heating of arginine yields highly fluorescent nanoparticles. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 1, p. 1414, 2013.

QIN, X. et al. Microwave-assisted rapid green synthesis of photoluminescent carbon nanodots from flour and their applications for sensitive and selective detection of mercury(II) ions. **Sensors and Actuators, B**, v. 184, p. 156–162, 2013.

QIU, H. et al. A novel chemiluminescence sensor for determination of quercetin based on molecularly imprinted polymeric microspheres. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 469–473, 2012.

RANJBARI, E.; BIPARVA, P.; HADJMOHAMMADI, M. R. Utilization of inverted dispersive liquid–liquid microextraction followed by HPLC-UV as a sensitive and efficient method for the extraction and determination of quercetin in honey and biological samples. **Talanta**, v. 89, p. 117–123, jan. 2012.

RESCH-GENGER, U. et al. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. **Nature Methods**, v. 5, n. 9, p. 763–775, 28 set. 2008.

RIGGS, J. E. et al. Strong Luminescence of Solubilized Carbon Nanotubes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 24, p. 5879–5880, jun. 2000.

SCIORTINO, A. et al. Solvatochromism Unravels the Emission Mechanism of Carbon Nanodots. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 7, n. 17, p. 3419–3423, 19 set. 2016.

SEEDHER, N.; KANOJIA, M. Mechanism of interaction of hypoglycemic agents glimepiride and glipizide with human serum albumin. **Central European Journal of Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 96–104, 2009.

SONG, Y. et al. Investigation into the fluorescence quenching behaviors and

applications of carbon dots. **Nanoscale**, v. 6, n. 9, p. 4676–4682, 2014.

SOUSA, F. L. N. et al. Printable UV personal dosimeter: Sensitivity as a function of DoD parameters and number of layers of a functional photonic ink. **Materials Research Express**, v. 3, n. 4, p. 10, 2016.

SUN, D. et al. Hair fiber as a precursor for synthesizing of sulfur- and nitrogen-co-doped carbon dots with tunable luminescence properties. **Carbon**, v. 64, p. 424–434, 2013.

SUN, Y.-P. et al. Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 24, p. 7756–7757, 2006.

WAGGONER, A. Fluorescent labels for proteomics and genomics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 1, p. 62–66, fev. 2006.

WANG, J.; WANG, C.-F.; CHEN, S. Amphiphilic Egg-Derived Carbon Dots: Rapid Plasma Fabrication, Pyrolysis Process, and Multicolor Printing Patterns. **Angewandte Chemie**, v. 124, n. 37, p. 9431–9435, 10 set. 2012.

WANG, Q. et al. Microwave-assisted synthesis of carbon nanodots through an eggshell membrane and their fluorescent application. **The Analyst**, v. 137, n. 22, p. 5392, 2012.

WANG, Y. et al. Simultaneous determination of quercetin, kaempferol and isorhamnetin accumulated human breast cancer cells, by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 1–2, p. 328–333, 2005.

WEI, J. et al. Simple one-step synthesis of water-soluble fluorescent carbon dots derived from paper ash. **RSC Advances**, v. 3, p. 13119–13122, 2013.

WEI, J. et al. Simple one-step synthesis of water-soluble fluorescent carbon dots from waste paper. **New Journal of Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 906–909, 2014.

WIANOWSKA, D. et al. Determining the true content of quercetin and its derivatives in plants employing SSDM and LC–MS analysis. **European Food Research and Technology**, v. 243, n. 1, p. 27–40, 2017.

XIAO, D. et al. Microwave assisted one-step green synthesis of fluorescent carbon nanoparticles from ionic liquids and their application as novel fluorescence probe for quercetin determination. **Journal of Luminescence**, v. 140, p. 120–125, 2013.

XIAO, P.; ZHAO, F.; ZENG, B. Voltammetric determination of quercetin at a multi-walled carbon nanotubes paste electrode. **Microchemical Journal**, v. 85, n. 2, p. 244–249, 2007.

XU, G.-R.; KIM, S. Selective determination of quercetin using carbon nanotube-modified electrodes. **Electroanalysis**, v. 18, n. 18, p. 1786–1792, 2006.

XU, X. et al. Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 40, p. 12736–12737, 2004.

YAZID, S. N. A. M. et al. Detection of Sn(II) ions via quenching of the fluorescence of carbon nanodots. **Microchimica Acta**, v. 180, n. 1–2, p. 137–143, 2013.

YE, R. et al. Coal as an abundant source of graphene quantum dots. **Nature Communications**, v. 4, p. 2–6, 6 dez. 2013.

YUE, X. et al. Highly Sensitive and Selective Determination of Tertiary Butylhydroquinone in Edible Oils by Competitive Reaction Induced “On–Off–On” Fluorescent Switch. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 706–713, 27 jan. 2016.

ZHANG, Q.; CUI, H. Simultaneous determination of quercetin, kaempferol, and isorhamnetin in phytopharmaceuticals of *Hippophae rhamnoides* L. by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 11, p. 1171–1178, 2005.

ZHANG, Y.-L. et al. Graphitic carbon quantum dots as a fluorescent sensing platform for highly efficient detection of Fe³⁺ ions. **RSC Advances**, v. 3, n. 11, p. 3733, jan.

2013.

ZHU, S. et al. Highly photoluminescent carbon dots for multicolor patterning, sensors, and bioimaging. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 52, n. 14, p. 3953–3957, 2013.