



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ISABELLE MORAES AMORIM VIEGAS

**ESTRATÉGIAS MULTIVARIADAS APLICADAS À SÍNTESE E BIOCONJUGAÇÃO
DE QUANTUM DOTS**

Recife

2020

ISABELLE MORAES AMORIM VIEGAS

**ESTRATÉGIAS MULTIVARIADAS APLICADAS À SÍNTESE E BIOCONJUGAÇÃO
DE QUANTUM DOTS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química.

Área de concentração: Química analítica

Orientadora:

Claudete Fernandes Pereira (UFPE, Brasil)

Coorientadores:

Giovannia Araujo de Lima Pereira (UFPE, Brasil) e Rasmus Bro (Universidade de Copenhague, Dinamarca)

Recife

2020

Catálogo na fonte
Bibliotecária Mariana de Souza Alves CRB4-2105

V656e Viegas, Isabelle Moraes Amorim
Estratégias multivariadas aplicadas à síntese e bioconjugação de *quantum dots*/
Isabelle Moraes Amorim Viegas. – 2020.
150f.: il., fig., tab.

Orientadora: Claudete Fernandes Pereira.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Química,
Recife, 2020.
Inclui referências e apêndices.

1. Química analítica. 2. Quantum dots. 3. Fotoluminescência. 4. Bioconjugação.
I. Pereira, Claudete Fernandes. (orientadora) II. Título.

543

CDD (22. ed.)

UFPE-CCEN 2020-187

ISABELLE MORAES AMORIM VIEGAS

**ESTRATÉGIAS MULTIVARIADAS APLICADAS À SÍNTESE E BIOCONJUGAÇÃO
DE QUANTUM DOTS**

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 Doutora em Química.

Aprovada em: 24/04/2020

BANCA EXAMINADORA

Participação via Videoconferência

Profa. Claudete Fernandes Pereira (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Química Fundamental

Participação via Videoconferência

Profa. Iêda Maria Garcia dos Santos

Universidade Federal da Paraíba
Departamento de Química

Participação via Videoconferência

Prof. José Licarion Pinto Segundo Neto

Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Química Fundamental

Participação via Videoconferência

Prof. Júlio Santos Rebouças

Universidade Federal da Paraíba
Departamento de Química

Participação via Videoconferência

Profa. Maria Fernanda Pimentel Avelar

Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Engenharia Química

A Deus, por iluminar o meu caminho durante esta jornada.

Aos meus pais, Gilson e Rosana, por todo o amor, carinho e compreensão.

À minha irmã, Paula Jéssica, pelo apoio e incentivo.

Aos meus filhos de quatro patas, em especial Burrico, Piolha e Nicole, pela companhia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por esta oportunidade reencarnatória com muita saúde e ao lado de uma família que me cerca de amor e proteção. Aos meus pais, Rosana e Gilson Viegas, sou eternamente grata por tanto amor, carinho, conselhos e pelos mais dignos exemplos de caráter que fortalecem a minha construção pessoal e profissional. À minha irmã, Paula Jéssica Viegas, agradeço pela proteção de um pai e cuidados de uma mãe, mas com a parceria e companheirismo de uma irmã sobretudo espiritual. Sem os meus quatro pilares, eu não teria sustentação para as minhas jornadas e conquistas.

Sou eternamente grata às minhas orientadoras, Claudete Fernandes Pereira e Giovannia Araujo de Lima Pereira, sobretudo pela amizade e por sempre terem sido tão acolhedoras e prestativas. Claudete e Giovannia, vocês são grandes exemplos de professoras e pesquisadoras em quem eu me espelho e com quem tive a oportunidade de aprender muito nos últimos anos. Obrigada pela orientação, conselhos, confiança, paciência e motivação, e por sempre me ajudarem a viabilizar os meus projetos e planos excêntricos.

Agradeço aos professores Aldaléa Lopes Brandes Marques e Edmar Pereira Marques, da Universidade Federal do Maranhão, pela amizade e por terem me guiado desde os meus primeiros passos acadêmicos. Se eu escolhi seguir a carreira acadêmica, foi pelos conselhos, incentivos e exemplos que obtive com vocês.

Agradeço a todos os integrantes do grupo de Nanotecnologia Biomédica (NanoBio) e ao Laboratório Integrado de Nanoestruturas e Compostos de Coordenação (LINCC) da UFPE, em especial aos professores Beate Santos, Adriana Fontes, Goreti Pereira e Paulo Euzébio, pela colaboração, suporte e discussões, e aos colegas Jéssika Fernanda, Camila Monteiro, Ryan Cordeiro, Izabel Gomes, Jailson Silva, Ingrid Walesca, Wedja Maciel, Antônio Gomes, Mariana Cabrera e Isabela Andrade, pela ajuda e compartilhamento de conhecimentos e experiências, e também pelos momentos de descontração que tornaram os momentos de trabalho mais agradáveis.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ/UFPE), especialmente ao professor Arnóbio da Gama pela gentileza e disponibilidade para as valiosas discussões inorgânicas que foram tão agregadoras para mim. Sou grata, também, aos secretários da PPGQ, Patrícia Santa Rosa e Maurílio Souza, e a todos os técnicos da Central Analítica, pela gentileza e solicitude. Agradeço aos amigos da PPGQ, Josinete Paz, Lucas Silva,

Francielson Pereira, Ronmilson Marques, Leonel Oliveira, Alianda Dantas, Diana Maria e Paulo Cauás, pela amizade, companheirismo, acolhimento e descontração nos perrengues acadêmicos.

Agradeço aos professores Rasmus Bro e José Amigo, que me acolheram e orientaram e com quem tive a oportunidade de aprender bastante durante o intercâmbio na Universidade de Copenhague. Sou grata, também, aos professores Asmund Rinnan e Evrim Acar pelas contribuições teóricas, e a Lisbeth Dahl, por toda a ajuda e suporte técnico que me ofereceu sempre com muito ânimo e gentileza. Agradeço aos colegas de trabalho do CAT e aos amigos que fiz em Copenhague: Jeyne Castro, Rafaella Sales, Sahar Rahi, Stefano Dessalvi, Rocío Reina, Ellen Oliveira, Viola Aru, Dillen Augustijn, Daniel Caballero, Asger Friis, Roseane Farias, Nise Souto, Giacomo Baccolo e Terry-hale Wijker. Obrigada pela amizade e companhia nas mais diversas situações que compartilhamos juntos nesse ciclo!

Sou muito grata ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de doutorado no país e sanduíche, respectivamente. Por fim, mas não menos importante, agradeço também à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), à Universidade de Copenhague, à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), pelas estruturas cedidas, e ao Instituto Serrapilheira, ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA), ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica (INCT-INFO) e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelos apoios através de financiamento de projetos.

RESUMO

Quantum dots (QDs) são nanomateriais que têm sido progressivamente estudados e extensivamente aplicados devido às suas propriedades ópticas e eletrônicas excepcionais decorrentes do regime de confinamento quântico. Nesse contexto, o presente trabalho propõe a aplicação de ferramentas da quimiometria para otimizar propriedades ópticas de QDs e estudar o seu processo de conjugação com biomoléculas. A otimização multivariada de um procedimento *one-pot* para síntese de QDs de seleneto de cádmio (CdSe) estabilizados com ácido mercaptossuccínico (MSA) em meio aquoso foi conduzida com a finalidade de aprimorar suas propriedades fotoluminescentes. Após o delineamento de planejamentos experimentais e obtenção de superfícies de resposta por equações estatisticamente validadas, as seguintes condições sintéticas otimizadas foram obtidas: razões molares de MSA: Cd de 6:1 e Cd: Se de 8:1, pH 5,0, temperatura de 30 °C e agitação por 60 min. Os QDs de CdSe obtidos sob essas condições apresentaram primeiro máximo de absorção e máxima emissão em 411 e 504 nm, respectivamente, com um diâmetro médio de 3,2 nm, estrutura cristalina cúbica da blenda de zinco e rendimento quântico relativo de até 29,7%. Técnicas de planejamento experimental também foram empregadas na otimização da fluorescência de QDs de seleneto de prata (Ag₂Se) estabilizados com MSA em meio aquoso. As condições otimizadas obtidas para a síntese dos QDs de Ag₂Se foram razões molares de MSA: Ag de 6:1 e Ag: Se de 8:1, pH 5,0, temperatura de 60 °C e agitação por 20 min. Os nanocristais obtidos sob tais condições apresentaram primeiro máximo de absorção em 583 nm e emissão no início da região do infravermelho próximo, em 789 nm, com estrutura cristalina ortorrômbica e diâmetro médio de 5,7 nm. Na última etapa deste trabalho, a fusão e fatoração de dados de ordem superior de fluorescência foram empregadas para extrair características subjacentes do processo de conjugação de proteínas a QDs. A interpolação foi o melhor pré-processamento para minimizar os efeitos dos espalhamentos Rayleigh e Raman. Os conjuntos de dados das regiões espectrais de fluorescência das proteínas e dos QDs foram decompostos por Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC) em 3 e 2 componentes, respectivamente. Posteriormente, os dois conjuntos de dados foram fatorados conjuntamente pelo método de Fatoração Avançada de Matriz e Tensor Acoplados (ACMTF), o que possibilitou aprimorar os perfis obtidos nos modos compartilhados. Com os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que as ferramentas de otimização multivariada e análise de ordem superior têm grande potencial no aprimoramento de propriedades ópticas desses nanossistemas e na extração de informações implícitas acerca de processos químicos associados à conjugação de QDs a moléculas de interesse biológico.

Palavras-chave: *Quantum dots*. Fotoluminescência. Bioconjugação. Otimização multivariada. Análise de dados de ordem superior. Análise de Fatores Paralelos

ABSTRACT

Quantum dots (QDs) are nanomaterials that have been progressively studied and extensively applied due to their outstanding optical and electronic properties arising from the quantum confinement regime. In this context, the present work proposes the application of chemometrics tools to optimize optical properties of QDs and to study their process of conjugation with biomolecules. The multivariate optimization of a one-pot procedure for aqueous synthesis of cadmium selenide (CdSe) quantum dots (QDs) stabilized with mercaptosuccinic acid (MSA) was carried out aiming to improve their photoluminescence properties. With experimental designs and response surfaces obtained by statistically validated equations, the following optimal synthetic conditions were found: MSA/Cd molar ratio of 6:1, Cd/Se molar ratio of 8:1, pH 5.0, temperature of 30 °C and stirring for 60 min. The CdSe QDs obtained under these conditions presented absorption and emission at 411 and 504 nm, respectively, with an average diameter of 3.2 nm, cubic zinc blende structure and relative quantum yield of up to 29.7%. Experimental design techniques were also applied to optimize the fluorescence of silver selenide (Ag₂Se) QDs stabilized with MSA in aqueous medium. The optimal conditions obtained for the synthesis of Ag₂Se QDs were MSA/Ag molar ratio of 6:1, Ag/Se molar ratio of 8:1, pH 5.0, temperature of 60 °C and stirring for 20 min. The nanocrystals obtained under these conditions presented absorption at 583 nm and emission within the near infrared region, at 789 nm, with orthorhombic crystal structure and average diameter of 5.7 nm. In the last phase of this work, the coupling and factorization of multi-way fluorescence data were used to extract underlying characteristics of the QD-protein conjugation process. Interpolation was the best preprocessing method for handling Rayleigh and Raman scatterings. The datasets of fluorescence spectral regions of proteins and QDs were decomposed by Parallel Factor Analysis (PARAFAC) in 3 and 2 components, respectively. Subsequently, the two datasets were jointly factorized by Advanced Coupled Matrix and Tensor Factorization (ACMTF), which allowed improving the profiles obtained in shared modes. From the results obtained in the present work, we conclude that the tools of multivariate optimization and multi-way analysis have great potential in improving optical properties of these nanosystems and extracting implicit information about chemical processes associated with the conjugation of QDs to molecules of biological interest.

Keywords: Quantum dots. Photoluminescence. Bioconjugation. Multivariate optimization. Multi-way analysis. Parallel Factor Analysis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 –** (A) Espectro de emissão em função do tamanho de quantum dots com a mesma composição química; os círculos coloridos representam o tamanho do nanocristal. (B) Espectros de absorção (linha contínua) e de emissão (linha tracejada) típicos de quantum dots. (C) Espectros de absorção (linha contínua) e de emissão (linha tracejada) de um fluoróforo orgânico convencional 25
- Figura 2 –** Esquema do efeito do confinamento quântico em quantum dots: com a diminuição do tamanho do nanocristal, o band gap (E_g) aumenta, ocorre discretização dos níveis de energia e o comprimento de onda de emissão fotoluminescente aumenta. Na parte superior do esquema, é apresentada uma imagem de suspensões coloidais aquosas de quantum dots de CdSe de diferentes tamanhos, obtidas neste trabalho, sob radiação de uma lâmpada ultravioleta 26
- Figura 3 –** Esquema de excitação do quantum dot e possíveis processos de decaimento: (1) relaxação excitônica intrabandas não-radiativa, (2) recombinação excitônica radiativa, (3) decaimento não-radiativo por emissão de fônons, (4) recombinação mediada por defeitos ou por impurezas. Os círculos preto e branco representam respectivamente o elétron e o buraco. A distância energética entre os níveis discretos é da ordem de 0,001 eV 27
- Figura 4 –** Esquema da reação de bioconjugação de moléculas contendo grupo amina a quantum dots carboxilados via formação de ligação amida 32
- Figura 5 –** Esquema da reação de bioconjugação de moléculas contendo grupo tiol a quantum dots contendo aminas via formação de ligação tioéter 32
- Figura 6 –** Esquema ilustrativo de dados classificados de acordo com a ordem do tensor que os representa 37
- Figura 7 –** Representação do modelo Tucker3 40
- Figura 8 –** Representação do modelo PARAFAC 41
- Figura 9 –** Esquema representativo da fatoração de duas matrizes acopladas 45
- Figura 10 –** Esquema representativo da fatoração de uma matriz e um tensor de terceira ordem (três vias) acoplados 46
- Figura 11 –** Espectros de absorção (UV-Vis) e emissão (PL) ($\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$) da suspensão de quantum dots de CdSe estabilizados com MSA obtidos nas 58

seguintes condições: razão molar de MSA:Cd 6:1, razão molar de Cd:Se 5:1, pH 5,0, temperatura de 30 °C e tempo de agitação de 120 min

- Figura 12** – Gráfico de Pareto das estimativas padronizadas dos efeitos, para os resultados de intensidade de emissão de quantum dots de CdSe obtidos pelo planejamento Doehlert 61
- Figura 13** – Gráfico de Pareto das estimativas padronizadas dos efeitos, para os resultados de FWHM da banda de emissão de quantum dots de CdSe obtidos pelo planejamento Doehlert 61
- Figura 14** – (A) Gráfico de correlação entre os valores de intensidade de emissão preditos pela Equação 14 em função dos valores experimentais e (B) distribuição dos resíduos em função dos valores de intensidade de emissão preditos 64
- Figura 15** – (A) Gráfico de correlação entre os valores de FWHM preditos pela Equação 15 em função dos valores experimentais e (B) distribuição dos resíduos em função dos valores de FWHM preditos 64
- Figura 16** – Superfícies de resposta de (A) intensidade de emissão e (B) FWHM de quantum dots de CdSe em função da razão molar de MSA:Cd e da razão molar de Cd:Se, com pH e temperatura fixados em 5,0 e 30 °C, respectivamente 66
- Figura 17** – Gráficos de correlação (A) entre FWHM e intensidade de emissão e (B) entre o comprimento de onda do primeiro máximo de absorção dos nanocristais e intensidade de emissão 67
- Figura 18** – Superfícies de resposta de (A) intensidade de emissão e (B) FWHM de quantum dots de CdSe em função do pH e da temperatura, com as razões molares de MSA:Cd e Cd:Se fixadas em 6:1 e 8:1, respectivamente 69
- Figura 19** – (A) Estrutura química do ácido mercaptossuccínico. (B) Função de formação (o) e diagramas de distribuição (linhas contínuas) de espécies de MSA protonadas e desprotonadas em mistura 40% v/v de dioxano em água 70
- Figura 20** – Espectros de absorção (UV-Vis) e de emissão (PL) ($\lambda_{exc} = 400$ nm) de três suspensões de quantum dots de CdSe estabilizados com MSA sintetizados sob as mesmas condições experimentais: pH 5,0 e temperatura de 30 °C, com razões molares de MSA:Cd e Cd:Se de 6:1 e 8:1, respectivamente, e agitação por 60 min. As imagens inseridas correspondem a fotografias da suspensão de quantum dots de CdSe da síntese A irradiada com luz ambiente (à esquerda) e lâmpada ultravioleta (365 nm e potência de 20 W) 72
- Figura 21** – Espectros de absorção de quantum dots com diferentes larguras de distribuição gaussiana de tamanho 73

- Figura 22** – Intensidades de emissão ao longo de sete semanas após a síntese de quantum dots de CdSe preparados a 30 °C e pH 5,0, com razões molares de MSA:Cd e Cd:Se de 6:1 e 8:1, respectivamente, e agitação por 60 min. Os desvios padrão amostrais foram calculados para 1 a 3 semanas com $n = 3$ amostras e para 4 semanas com $n = 2$ amostras 74
- Figura 23** – Rendimento quântico relativo ao longo de sete semanas após a síntese de quantum dots de CdSe preparados a 30 °C e pH 5,0, com razões molares de MSA:Cd e Cd:Se de 6:1 e 8:1, respectivamente, e agitação por 60 min. Os desvios padrão amostrais foram calculados para 2 e 3 semanas com $n = 2$ amostras 74
- Figura 24** – Espectro de excitação ($\lambda_{\text{exc}} = 505 \text{ nm}$) de quantum dots de CdSe estabilizados com MSA obtidos nas seguintes condições: razões molares de MSA:Cd de 6:1 e Cd:Se de 8:1, pH 5,0, temperatura de 30 °C e agitação por 60 min 75
- Figura 25** – Espectros de FT-IR de MSA puro e de quantum dots de CdSe estabilizados com MSA (CdSe-MSA) obtidos nas seguintes condições: razões molares de MSA:Cd de 6:1 e Cd:Se de 8:1, pH 5,0, temperatura de 30 °C e agitação por 60 min 76
- Figura 26** – Padrões de DRX de quantum dots de CdSe estabilizados com MSA sintetizados a 30 °C e pH 5,0, com razões molares de MSA:Cd e Cd:Se de 6:1 e 8:1, respectivamente, e agitação por 60 min 78
- Figura 27** – (A) Micrografia de HR-TEM e (B) distribuição de tamanho de partícula dos quantum dots de CdSe estabilizados com MSA sintetizados a 30 °C e pH 5,0, com razões molares de MSA:Cd e Cd:Se de 6:1 e 8:1, respectivamente, e agitação por 60 min 78
- Figura 28** – Absortividade molar da água e da oxi- e desoxi-hemoglobina em função do comprimento de onda 81
- Figura 29** – Estrutura do complexo MSA-Ag em solução aquosa contendo íons nitrato, em pH básico 89
- Figura 30** – Espectros de (A) absorção e de (B) emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$) de suspensões de nanocristais de Ag₂Se estabilizados com MSA. As bandas de emissão em 393 nm são atribuídas a artefatos 90
- Figura 31** – Espectros de absorção (UV-Vis) e de emissão (PL) ($\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$) da suspensão de quantum dots de Ag₂Se estabilizados com MSA obtidos nas seguintes condições: razões molares de MSA:Ag 8:1 e Ag:Se 10:1, pH 5,0, temperatura de 30 °C e tempo de agitação de 60 min 92

Figura 32 –	Espectros de absorção (UV-Vis) e emissão (PL) ($\lambda_{exc} = 484 \text{ nm}$) da suspensão de quantum dots de Ag_2Se estabilizados com MSA obtidos nas seguintes condições: razões molares de MSA:Ag 6:1 e Ag:Se 6:1, pH 5,0, temperatura de 5 °C e tempo de agitação de 60 min	94
Figura 33 –	Espectros de absorção (UV) e emissão (PL) ($\lambda_{exc} = 308 \text{ nm}$) da suspensão de nanocristais de Ag_2Se estabilizados com MSA obtidos nas seguintes condições: razões molares de MSA:Ag 2:1 e Ag:Se 8:1, pH 12,0, temperatura de 5 °C e tempo de agitação de 60 min. A banda de emissão em 340 nm é atribuída a artefatos	98
Figura 34 –	Espectros de absorção (UV-Vis) e de emissão (PL) ($\lambda_{exc} = 450 \text{ nm}$) da suspensão de quantum dots de Ag_2Se estabilizados com MSA obtidos nas seguintes condições: razões molares de MSA:Ag 6:1 e Ag:Se 8:1, pH 5,0, temperatura de 60 °C e tempo de agitação de 20 min	98
Figura 35 –	Espectros de absorção (UV-Vis) e emissão (PL) ($\lambda_{exc} = 460 \text{ nm}$) da suspensão de quantum dots de Ag_2Se estabilizados com MSA obtidos nas seguintes condições: razões molares de MSA:Ag 7:1 e Ag:Se 8:1, pH 5,0, temperatura de 80 °C e tempo de agitação de 20 min	101
Figura 36 –	Espectros de absorção (UV-Vis) e de emissão (PL) ($\lambda_{exc} = 460 \text{ nm}$) de cinco suspensões de quantum dots de Ag_2Se estabilizados com MSA sintetizados sob as mesmas condições experimentais: razões molares de MSA:Ag 6:1 e Ag:Se 8:1, pH 5,0, temperatura de 60 °C e tempo de agitação de 20 min. A imagem inserida corresponde a uma fotografia da suspensão de quantum dots de Ag_2Se da síntese A irradiada com luz ambiente	102
Figura 37 –	Espectro de excitação fotoluminescente ($\lambda_{ems} = 790 \text{ nm}$) de quantum dots de Ag_2Se estabilizados com MSA sintetizados sob as seguintes condições experimentais: razões molares de MSA:Ag 6:1 e Ag:Se 8:1, pH 5,0, temperatura de 60 °C e tempo de agitação de 20 min	103
Figura 38 –	Padrões de DRX de quantum dots de Ag_2Se estabilizados com MSA sintetizados a 60 °C e pH 5,0, com razões molares de MSA:Ag e Ag:Se de 6:1 e 8:1, respectivamente, e agitação por 20 min	104
Figura 39 –	(A) Micrografia de HR-TEM e (B) distribuição de tamanho de partícula dos quantum dots de Ag_2Se estabilizados com MSA sintetizados a 60 °C e pH 5,0, com razões molares de MSA:Ag e Ag:Se de 6:1 e 8:1, respectivamente, e agitação por 20 min	104
Figura 40 –	Esquema do preparo das amostras: os retângulos sombreados com números ordinais representam a presença e a sequência de adição do respectivo componente	110

Figura 41	– Estrutura dos conjuntos de dados de fluorescência das faixas inferior (tensor A) e superior (tensor B)	112
Figura 42	– Esquema do espalhamento que ocorre nas EEMs das faixas inferior e superior	113
Figura 43	– Espectros de absorção (UV-Vis) e de emissão (PL) ($\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$) da suspensão de quantum dots de CdTe estabilizados com MSA obtidos nas seguintes condições: razão molar de MPA:Cd 6:1, razão molar de Cd:Te 8:1, pH 5,1, temperatura de 100 °C e tempo de agitação de 7 h	115
Figura 44	– Espectros de (A) absorção e (B) emissão de fenilalanina (PHE), tirosina (TYR) e triptofano (TRP) em água com pH 7,0	116
Figura 45	– Dados brutos (DB) e pré-processados (PP) de EEMs da região espectral inferior de algumas amostras representativas do conjunto de dados	118
Figura 46	– Gráficos de barras da variância explicada, número de iterações e tempo de convergência dos modelos PARAFAC com (A) 3 e (B) 4 fatores, ajustados com os dados da região espectral inferior	119
Figura 47	– Análise <i>split-half</i> de modelos PARAFAC com (A) 3 e (B) 4 fatores, ajustados com os dados da região espectral inferior: perfis obtidos pelos modelos ajustados com as amostras do subconjunto 1 (linhas azuis) e do subconjunto 2 (linhas vermelhas) e com todas as amostras (linhas pretas)	121
Figura 48	– Concentrações relativas e perfis recuperados pelo melhor modelo PARAFAC obtido com (A) 3 e (B) 4 fatores, ajustados com os dados da região espectral inferior	122
Figura 49	– Dados brutos (DB) e pré-processados (PP) de EEMs da região espectral superior de algumas amostras representativas do conjunto de dados	124
Figura 50	– Gráficos de barras da variância explicada, número de iterações e tempo de convergência dos modelos PARAFAC com (A) 2 e (B) 3 fatores, ajustados com os dados da região espectral superior	125
Figura 51	– Análise <i>split-half</i> de modelos PARAFAC com (A) 2 e (B) 3 fatores, ajustados com os dados da região espectral superior: perfis obtidos pelos modelos ajustados com as amostras do subconjunto 1 (linhas azuis) e do subconjunto 2 (linhas vermelhas) e com todas as amostras (linhas pretas)	126
Figura 52	– Concentrações relativas e perfis recuperados pelo melhor modelo PARAFAC obtido com (A) 2 e (B) 3 fatores, ajustados com os dados da região espectral superior	127
Figura 53	– Concentrações relativas e perfis recuperados pelo melhor modelo PARAFAC ajustado com os dados das regiões espectrais inferior e superior	129

acoplados. Fator A: linhas azuis; Fator B: linhas vermelhas; Fator C: linhas amarelas

Figura 54 – Gráfico de barras da fluorescência das amostras determinada pelo método de referência 132

Figura 55 – Gráfico de barras da fluorescência relativa das amostras contendo bioconjugados, determinada pelo método de referência 133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Planejamentos Doehlert para dois, três e quatro fatores	35
Tabela 2	Resumo das condições de síntese e algumas características ópticas de quantum dots de CdSe obtidos em meio aquoso	49
Tabela 3	Níveis variados para cada fator do planejamento fatorial completo	52
Tabela 4	Níveis experimentais variados para cada fator do planejamento por matriz Doehlert, com seus respectivos níveis codificados entre parênteses	53
Tabela 5	Condições experimentais e resultados das sínteses do planejamento fatorial completo 2^4 com tempo de agitação de 120 min	56
Tabela 6	Estimativa dos efeitos lineares principais e das interações dos fatores, para os resultados de intensidade de emissão de quantum dots de CdSe obtidos pelo planejamento fatorial completo 2^4 , com tempo de agitação de 120 min	57
Tabela 7	Condições experimentais e resultados das sínteses do planejamento Doehlert, com tempo de agitação de 60 min	59
Tabela 8	Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos principais e das interações dos fatores, para os resultados de intensidade de emissão de quantum dots de CdSe obtidos pelo planejamento Doehlert, com tempo de agitação de 60 min	60
Tabela 9	Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos principais e das interações dos fatores, para os resultados de FWHM da banda de emissão de quantum dots de CdSe obtidos pelo planejamento Doehlert, com tempo de agitação de 60 min	60
Tabela 10	Análise de variância para a equação polinomial obtida para estimar a intensidade de emissão de quantum dots de CdSe	63
Tabela 11	Análise de variância para a equação polinomial obtida para estimar a FWHM da banda de emissão de quantum dots de CdSe	63
Tabela 12	Principais vibrações características de MSA e dos quantum dots de CdSe estabilizados com MSA	76
Tabela 13	Resumo das condições de síntese e algumas características ópticas de quantum dots de Ag ₂ Se obtidos em meio aquoso	82
Tabela 14	Níveis variados para cada fator do planejamento fatorial fracionário 2^{4+1} delineado para a síntese dos quantum dots de Ag ₂ Se estabilizados com MSA	85

Tabela 15 –	Níveis variados para cada fator do planejamento fatorial com níveis misturados delineado para a síntese dos quantum dots de Ag ₂ Se estabilizados com MSA	85
Tabela 16 –	Níveis variados para cada fator do planejamento fatorial completo 2 ⁴ delineado para a síntese dos quantum dots de Ag ₂ Se estabilizados com MSA	85
Tabela 17 –	Níveis variados para cada fator do planejamento fatorial completo 2 ³ delineado para a síntese dos quantum dots de Ag ₂ Se estabilizados com MSA	86
Tabela 18 –	Condições experimentais e resultados das sínteses do planejamento fatorial fracionário 2 ⁴⁻¹ delineado para as sínteses dos quantum dots de Ag ₂ Se estabilizados com MSA	88
Tabela 19 –	Estimativa dos efeitos principais e de algumas interações dos fatores, para os resultados de comprimento de onda do primeiro máximo de absorção de quantum dots de Ag ₂ Se obtidos pelo planejamento fatorial fracionário 2 ⁴⁻¹	89
Tabela 20 –	Condições experimentais e resultados das sínteses do estudo multivariado sobre o pH e a temperatura de síntese dos quantum dots de Ag ₂ Se estabilizados com MSA	93
Tabela 21 –	Condições experimentais e resultados das sínteses do planejamento fatorial completo 2 ⁴ delineado para as sínteses dos quantum dots de Ag ₂ Se estabilizados com MSA	95
Tabela 22 –	Estimativa dos efeitos principais e das interações dos fatores, para os resultados de comprimento de onda do primeiro máximo de absorção de <i>quantum dots</i> de Ag ₂ Se obtidos pelo planejamento fatorial completo 2 ⁴	96
Tabela 23 –	Estimativa dos efeitos principais e das interações dos fatores, para os resultados de intensidade de emissão de <i>quantum dots</i> de Ag ₂ Se obtidos pelo planejamento fatorial completo 2 ⁴ , com pH 5,0	96
Tabela 24 –	Estimativa dos efeitos principais e das interações dos fatores, para os resultados de intensidade de emissão de <i>quantum dots</i> de Ag ₂ Se obtidos pelo planejamento fatorial completo 2 ⁴ , com pH 12,0	97
Tabela 25 –	Condições experimentais e resultados das sínteses do planejamento fatorial completo 2 ³ delineado para as sínteses dos quantum dots de Ag ₂ Se estabilizados com MSA	99
Tabela 26 –	Estimativa dos efeitos lineares principais e das interações dos fatores, para os resultados de intensidade de emissão de <i>quantum dots</i> de Ag ₂ Se obtidos pelo planejamento fatorial completo 2 ³	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a_B	Raio de Bohr do éxciton
ACMTF	Fatoração avançada de matriz e tensor acoplados, do inglês <i>Advanced Coupled Matrix and Tensor Factorization</i>
ALS	Mínimos quadrados alternantes, do inglês <i>Alternating Least Squares</i>
ANOVA	Análise de variância, do inglês <i>Analysis Of Variance</i>
BC	Banda de condução
BV	Banda de valência
CANDECOMP	Decomposição canônica, do inglês <i>Canonical Decomposition</i>
CMTF	Fatoração de matriz e tensor acoplados, do inglês <i>Coupled Matrix and Tensor Factorization</i>
CORCONDIA	Diagnóstico de consistência trilinear, do inglês <i>Core Consistency Diagnostic</i>
DRX	Difração de raios X
EDC	Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EEM	Matriz de excitação-emissão de fluorescência, do inglês <i>fluorescence Excitation-Emission Matrix</i>
FT-IR	Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i>
FWHM	Largura à meia altura, do inglês <i>Full Width at Half Maximum</i>
HR-TEM	Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução, do inglês <i>High-Resolution Transmission Electron Microscopy</i>
IR	Infravermelho, do inglês <i>Infrared</i>
L-BFGS-B	Algoritmo de Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno com memória limitada para otimização restrita por limites, do inglês <i>Limited-Memory Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno Method for Bound-Constrained Optimization</i>
MCR	Resolução multivariada de curvas, do inglês <i>Multivariate Curve Resolution</i>
MPA	Ácido mercaptopropiônico

MSA	Ácido 2-sulfanilbutanodioico ou ácido mercaptossuccínico
MSCs	Aglomerados de tamanhos mágicos, do inglês <i>Magic-Size Clusters</i>
NaN	Valores complexos ou irrepresentáveis, do inglês <i>Not a Number</i>
NHS	N-hidroxissuccinimida
NIR	Infravermelho próximo, do inglês <i>Near-Infrared</i>
PARAFAC	Análise de fatores paralelos, do inglês <i>Parallel Factor Analysis</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PCA	Análise de componentes principais, do inglês <i>Principal Component Analysis</i>
QDs	Pontos quânticos, do inglês <i>Quantum Dots</i>
QY	Rendimento quântico relativo, do inglês <i>Quantum Yield</i>
<i>r</i>	Coefficiente de correlação
RMSE	Raiz do erro médio quadrático, do inglês <i>Root Mean Square Error</i>
SMCC	Ácido 4-(N-maleimidometil)ciclohexanocarboxílico
TGA	Ácido tioglicólico
USNs	Nanocristais ultrapequenos, do inglês <i>Ultrasmall Nanocrystals</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	23
1.1	OBJETIVOS GERAIS	23
1.2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	24
1.2.1	Quantum dots	24
1.2.1.1	Efeito do confinamento quântico	25
1.2.1.2	Relaxação e recombinação do éxciton	27
1.2.1.3	Defeitos em <i>quantum dots</i>	29
1.2.1.4	Síntese de <i>quantum dots</i>	29
1.2.1.5	Conjugação de biomoléculas a <i>quantum dots</i>	30
1.2.2	Otimização multivariada	33
1.2.2.1	Planejamento fatorial	34
1.2.2.2	Matriz Doehlert	35
1.2.3	Análise de dados de ordem superior	36
1.2.3.1	Modelos de Tucker.....	38
1.2.3.2	Análise de fatores paralelos	40
1.2.3.3	Fusão de dados de ordem superior.....	44
2	OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DE PROPRIEDADES ÓPTICAS DE QUANTUM DOTS DE CdSe OBTIDOS POR UM PROCEDIMENTO ONE-POT EM MEIO AQUOSO.....	48
2.1	INTRODUÇÃO	48
2.2	OBJETIVOS	50
2.3	METODOLOGIA	51
2.3.1	Materiais	51
2.3.2	Planejamentos experimentais e sínteses dos <i>quantum dots</i> de CdSe	51
2.3.3	Caracterização óptica, estrutural e morfológica dos <i>quantum dots</i> de CdSe	53
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
2.4.1	Tratamento estatístico dos resultados dos planejamentos experimentais	55
2.4.2	Superfícies de resposta e efeitos dos fatores estudados sobre a intensidade de emissão e a FWHM da banda de emissão de <i>quantum dots</i> de CdSe	65

2.4.3	Caracterização óptica, estrutural e morfológica dos <i>quantum dots</i> de CdSe estabilizados com MSA obtidos sob condições otimizadas.....	71
2.5	CONCLUSÃO	79
3	OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA FOTOLUMINESCÊNCIA DE QUANTUM DOTS DE Ag₂Se SINTETIZADOS EM MEIO AQUOSO	80
3.1	INTRODUÇÃO	80
3.2	OBJETIVOS	83
3.3	METODOLOGIA	83
3.3.1	Materiais	83
3.3.2	Planejamentos experimentais e sínteses dos <i>quantum dots</i> de Ag₂Se	84
3.3.3	Caracterização óptica, estrutural e morfológica dos <i>quantum dots</i> de Ag₂Se	86
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
3.4.1	Tratamento estatístico dos resultados e avaliação dos efeitos dos fatores estudados sobre características ópticas dos <i>quantum dots</i> de Ag₂Se estabilizados com MSA.....	87
3.4.2	Caracterização óptica, estrutural e morfológica dos <i>quantum dots</i> de Ag₂Se estabilizados com MSA obtidos sob condições otimizadas.....	101
3.5	CONCLUSÃO	105
4	FATORAÇÃO DE DADOS DE ORDEM SUPERIOR DE FLUORESCÊNCIA PARA AVALIAR O PROCESSO DE CONJUGAÇÃO DE PROTEÍNAS A QUANTUM DOTS	106
4.1	INTRODUÇÃO	106
4.2	OBJETIVOS	107
4.3	METODOLOGIA	108
4.3.1	Materiais	108
4.3.2	Síntese e caracterização óptica dos <i>quantum dots</i> de CdTe.....	108
4.3.3	Preparo e análise das amostras e estruturação dos conjuntos de dados.....	109
4.3.4	Pré-processamento e tratamento de dados	111
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	115
4.4.1	Pré-processamento e fatoração dos dados da região espectral inferior	116
4.4.2	Pré-processamento e fatoração dos dados da região espectral superior.....	123

4.4.3	Fatoração conjunta dos dados das regiões espectrais inferior e superior	127
4.5	CONCLUSÃO	133
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	135
5.1	OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE <i>QUANTUM DOTS</i> DE CdSe	135
5.2	OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE <i>QUANTUM DOTS</i> DE Ag ₂ Se	135
5.3	AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE CONJUGAÇÃO DE PROTEÍNAS A <i>QUANTUM DOTS</i>	136
	REFERÊNCIAS	137
	APÊNDICE A – VARIAÇÃO DA INTENSIDADE DE EMISSÃO ($\lambda_{exc} = 400$ nm) COM O TEMPO DE SÍNTESE, PARA AS SUSPENSÕES DE <i>QUANTUM DOTS</i> DE CdSe COM AS MAIORES INTENSIDADES DE EMISSÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2⁴	144
	APÊNDICE B – CARACTERÍSTICAS ÓPTICAS DE <i>QUANTUM DOTS</i> DE CdSe SINTETIZADOS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA ÁREA DE PLATÔ DAS SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA FIGURA 16	145
	APÊNDICE C – ESPECTROS DE (A) ABSORÇÃO E DE (B) EMISSÃO ($\lambda_{exc} = 400$ nm) DE SUSPENSÕES DE <i>QUANTUM DOTS</i> DE CdSe SINTETIZADOS SOB AS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS ESPECIFICADAS NO APÊNDICE B E TEMPO DE AGITAÇÃO DE 60 MIN	146
	APÊNDICE D – CARACTERÍSTICAS ÓPTICAS DE <i>QUANTUM DOTS</i> DE Ag₂Se ESTABILIZADOS COM MSA SINTETIZADOS SOB CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS OTIMIZADAS: RAZÕES MOLARES DE MSA:Ag 6:1 E Ag:Se 8:1, pH 5,0, TEMPERATURA DE 60 °C E TEMPO DE AGITAÇÃO DE 20 MIN	147
	APÊNDICE E – ESPECTRO DE EXCITAÇÃO FOTOLUMINESCENTE ($\lambda_{ems} = 595$ nm) DE <i>QUANTUM DOTS</i> DE CdTe ESTABILIZADOS COM MSA OBTIDOS NAS SEGUINTE CONDIÇÕES: RAZÃO MOLAR DE MSA:Cd DE 6:1, RAZÃO MOLAR DE Cd:Te DE 8:1, pH 5,1, TEMPERATURA DE 100 °C E AGITAÇÃO POR 7 h	148

APÊNDICE F – FLUORESCÊNCIA DAS AMOSTRAS DETERMINADA PELO MÉTODO DE REFERÊNCIA.....	149
APÊNDICE G – FLUORESCÊNCIA RELATIVA DAS AMOSTRAS CONTENDO BIOCONJUGADOS, DETERMINADA PELO MÉTODO DE REFERÊNCIA.....	150

1 INTRODUÇÃO GERAL

Desde os primeiros estudos que demonstraram a possibilidade de modificar as propriedades físico-químicas de certos materiais em função do seu tamanho, do macro à nanoescala, houve um aumento do interesse nesse campo de pesquisa, culminando com o advento da nanotecnologia. Desse modo, a correlação das propriedades do material com seu tamanho e sua morfologia possibilita o desenvolvimento de excelentes nanomateriais [1,2]. Um grupo versátil de nanomateriais com essas características é constituído pelos *quantum dots* (QDs) ou pontos quânticos, que são nanocristais semicondutores com dimensões inferiores a 10 nm.

Devido às suas propriedades ópticas e eletrônicas excepcionais decorrentes do regime de confinamento quântico, os QDs apresentam diversas vantagens em relação aos corantes orgânicos convencionais e, portanto, têm sido aplicados em muitas áreas de pesquisa como optoeletrônica e fotonica (dispositivos emissores de luz, *lasers*, computação quântica, células solares, etc.), ciências analíticas (biossensores, sensores ópticos e eletroquímicos) e biomedicina (ferramentas de diagnóstico, marcadores fluorescentes, terapia fotodinâmica, agentes de contraste para imagens por ressonância magnética, etc.) [1-3]. Contudo, a elevada razão superfície/volume dos QDs intensifica a influência de defeitos de superfície nas suas propriedades ópticas, o que constitui uma desvantagem desses nanocristais em comparação com seus respectivos semicondutores em tamanho macroscópico. Nesse sentido, a otimização de parâmetros de síntese pode ser de grande utilidade na minimização de defeitos e consequente melhoria da fluorescência dos QDs, potencializando as diversas aplicações desse material [4].

1.1 OBJETIVOS GERAIS

Dada a importância da superfície desses nanomateriais tanto para qualidade óptica quanto para a sua (bio)aplicação, os objetivos gerais deste trabalho são (1) utilizar ferramentas da quimiometria para otimizar as propriedades ópticas de QDs através do ajuste multivariado dos parâmetros de síntese em meio aquoso e (2) aplicar QDs em processos de bioconjugação seguida do tratamento de dados de ordem superior de fluorescência para extrair informações subjacentes de tais processos.

Para tanto, os resultados alcançados neste trabalho estão divididos em 3 capítulos. Nos Capítulos 2 e 3, ferramentas quimiométricas foram eficientemente aplicadas para otimizar a síntese de suspensões coloidais de seleneto de cádmio e prata (CdSe e Ag₂Se), de modo a obter sistemas nanoestruturados opticamente otimizados. No Capítulo 4, QDs de telureto de cádmio (CdTe) foram sintetizados e conjugados a biomoléculas, e os respectivos resultados foram pré-processados e analisados utilizando Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC, do inglês *Parallel Factor Analysis*), um método de ordem superior que possibilita separar matematicamente os sinais ópticos (no caso, fluorescência) de espécies presentes no meio em diferentes condições. Por fim, o Capítulo 5 apresenta as considerações finais do trabalho resumizando as conclusões e perspectivas futuras de cada um dos capítulos descritos.

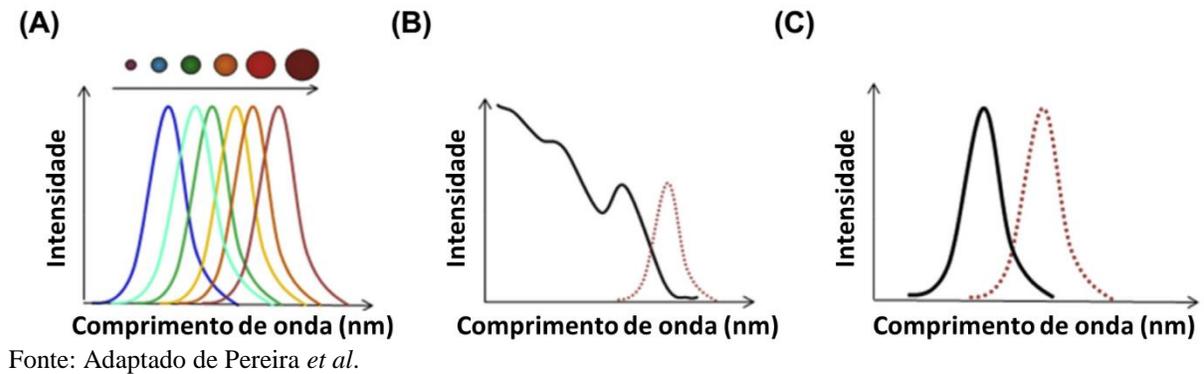
1.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.2.1 Quantum dots

Em decorrência de suas dimensões variarem de 2 a 10 nm, os QDs estão em regime de confinamento quântico, o que lhes confere algumas vantagens em comparação aos corantes orgânicos convencionais, tais como: (1) largos espectros de absorção, que permitem a transição eletrônica utilizando como fonte de excitação luz de diferentes comprimentos de onda, (2) bandas de emissão de fluorescência estreitas que podem ser ajustadas desde a região ultravioleta (UV) até o infravermelho (IR, do inglês *infrared*) do espectro eletromagnético, (3) grandes desvios de Stokes que reduzem a sobreposição espectral, e (4) alta resistência à fotodegradação [1,5]. A Figura 1 ilustra espectros de absorção e de emissão representativos de QDs e de um fluoróforo orgânico.

Outra vantagem dos QDs é que sua superfície ativa permite a conjugação com uma variedade de biomoléculas, fármacos e outros nanossistemas, tais como nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro, dando-lhes um caráter bimodal para serem aplicados como eficientes nanossondas para imageamento [1,5].

Figura 1 - (A) Espectro de emissão em função do tamanho de *quantum dots* com a mesma composição química; os círculos coloridos representam o tamanho do nanocristal. (B) Espectros de absorção (linha contínua) e de emissão (linha tracejada) típicos de *quantum dots*. (C) Espectros de absorção (linha contínua) e de emissão (linha tracejada) de um fluoróforo orgânico convencional.



1.2.1.1 Efeito do confinamento quântico

Quando um semicondutor em tamanho macroscópico (*bulk*) absorve uma quantidade de energia maior ou igual ao *band gap*, isto é, a diferença entre as energias da banda de valência (BV) e da banda de condução (BC), um elétron é promovido da BV para a BC, deixando um “buraco” na sua banda de origem. Quantitativamente falando, o *gap* de energia entre as bandas, que determina a energia da luz de fluorescência, é inversamente proporcional ao quadrado do tamanho do QD ($E_g \propto 1/d^2$). Assim, QDs menores têm os níveis de energia mais espaçados. O buraco e o elétron, por serem considerados como quasipartículas com cargas opostas, se atraem mutuamente por interações de Coulomb formando um par elétron-buraco também descrito como uma quasipartícula: o “éxciton”. A distância entre o elétron e o buraco é chamada de raio de Bohr do éxciton (a_B) e pode variar de aproximadamente 2 a 50 nm, dependendo do semicondutor [2].

Quando as dimensões de um material semicondutor são reduzidas a poucos nanômetros e as partículas tornam-se menores do que a_B , diz-se que ele está em regime de confinamento quântico [2]. Por exemplo, a_B de CdS e CdSe são de aproximadamente 3 e 5 nm, respectivamente, e, sendo assim, partículas abaixo dessas dimensões de raios são consideradas QDs. Nesse caso, o elétron e o buraco estão confinados em um volume menor e, portanto, com interação coulombiana muito maior, em comparação com o *bulk*. Apesar disso, a energia cinética dessas quasipartículas é ainda maior que a interação eletrostática entre elas [2].

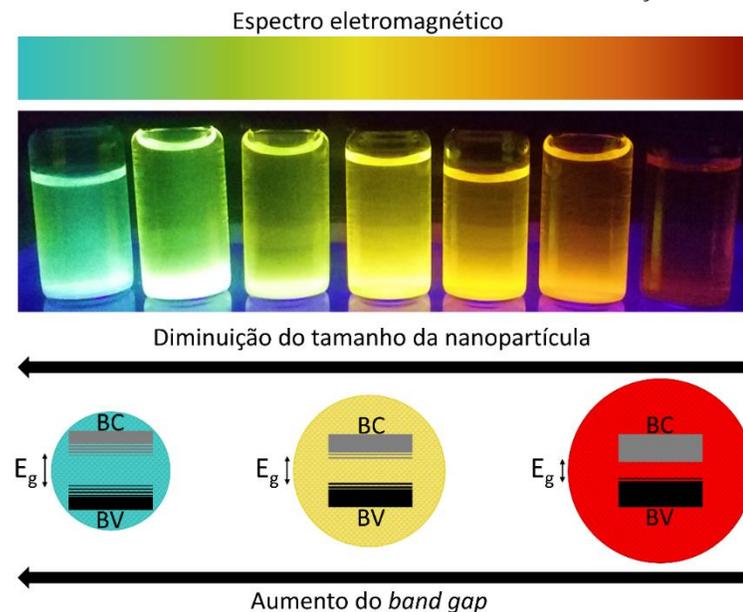
Logo, os QDs são nanocristais de semicondutores que se encontram em regime confinamento quântico em relação às três dimensões, não restando nenhum grau de liberdade

espacial para o éxciton. Portanto, o *band gap* de um QD pode ser descrito da mesma forma que o problema da “partícula em uma caixa” cujas paredes têm potencial infinito, resultando no aprisionamento dos elétrons e buracos em seu interior [2].

Considerando-se a abordagem *bottom-up*, como os QDs têm uma quantidade muito pequena de átomos (de dezenas a poucos milhares), menos orbitais moleculares estão presentes nas bandas de valência e condução [2,6], resultando em *band gaps* maiores e discretização dos níveis de energia nos limites da BV e da BC com a diminuição do tamanho do QD [2]. Essas são consequências diretas do regime de confinamento quântico que levam a propriedades ópticas e eletrônicas variáveis com o tamanho dos nanocristais [1,2].

A sintonização da região de emissão dos QDs é devido ao efeito de confinamento quântico: com a diminuição do tamanho dos nanocristais e aumento do *band gap*, ocorre o deslocamento da região de emissão para comprimentos de onda menores (*blue shift*), com maior energia. Inversamente, o aumento do tamanho dos QDs leva ao *red shift*, isto é, a emissão de fluorescência é deslocada para comprimentos de onda maiores (menor energia) [1], limitada ao comprimento de onda de emissão para o *bulk* do semiconductor (menor *band gap* possível). A Figura 2 esquematiza o efeito do confinamento quântico simplificadamente descrito acima.

Figura 2 - Esquema do efeito do confinamento quântico em *quantum dots*: com a diminuição do tamanho do nanocristal, o *band gap* (E_g) aumenta, ocorre discretização dos níveis de energia e o comprimento de onda de emissão fotoluminescente aumenta. Na parte superior do esquema, é apresentada uma imagem de suspensões coloidais aquosas de *quantum dots* de CdSe de diferentes tamanhos, obtidas neste trabalho, sob radiação de uma lâmpada ultravioleta.



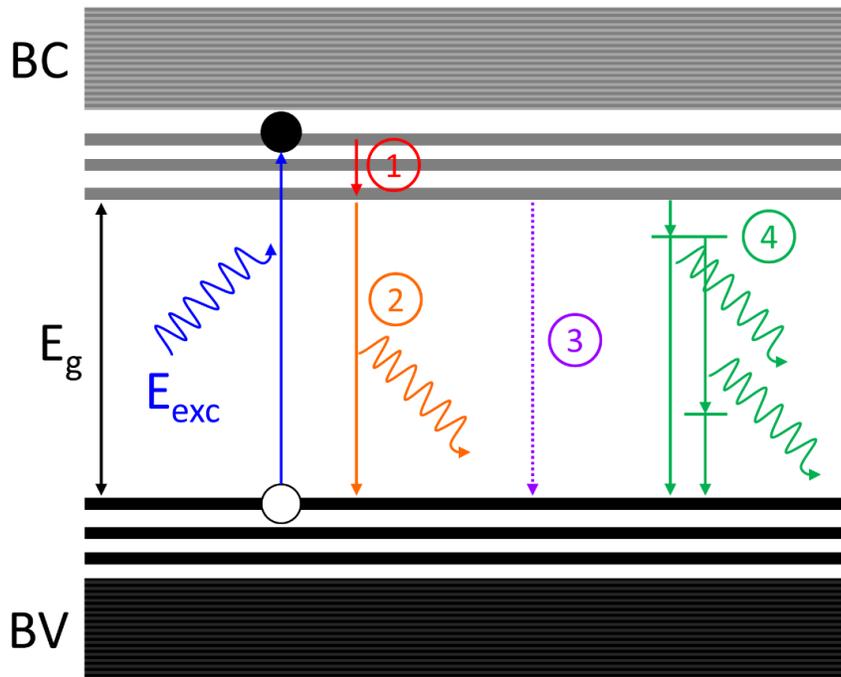
Fonte: A autora.

À medida que o tamanho do QD aumenta para raios maiores que a_B , o regime de confinamento quântico se torna fraco e seus efeitos desaparecem gradualmente. Quando o nanocristal atinge um diâmetro maior que duas a três vezes a_B , não se observa mais nenhum efeito do confinamento quântico e, portanto, as propriedades do *bulk* são constantes com variações de tamanho [2].

1.2.1.2 Relaxação e recombinação do éxciton

Quando o QD absorve um fóton com energia maior ou igual ao seu *band gap*, um elétron é excitado para algum dos níveis de energia discretos da BC e forma-se um éxciton. Esse processo está ilustrado pela seta azul na Figura 3. Em seguida, alguns processos de decaimento podem ocorrer para dissipar a energia absorvida [2].

Figura 3 - Esquema de excitação do *quantum dot* e possíveis processos de decaimento: (1) relaxação excitônica intrabandas não-radiativa, (2) recombinação excitônica radiativa, (3) decaimento não-radiativo por emissão de fônons, (4) recombinação mediada por defeitos ou por impurezas. Os círculos preto e branco representam respectivamente o elétron e o buraco. A distância energética entre os níveis discretos é da ordem de 0,001 eV.



Fonte: A autora.

Como o fóton absorvido geralmente tem uma energia maior que o *band gap* do QD, o elétron excitado ocupa algum dos níveis da BC acima do nível desocupado de mais baixa energia.

Nessa situação, o éxciton relaxa rapidamente para o estado excitônico fundamental por etapas intrabandas não-radiativas que resultam em dissipação de calor, e o elétron passa a ocupar o nível de fronteira da BC [2]. Essa relaxação não-radiativa está ilustrada pela seta vermelha na Figura 3.

A perda parcial de energia de excitação por transições vibracionais entre níveis de energia discretos próximos à BC faz com que a emissão do QD tenha energia menor que a excitação, resultando em um deslocamento da banda de emissão para um comprimento de onda maior que o da banda de absorção para a mesma transição. Tal deslocamento é conhecido como desvio de Stokes [7].

Tomando como origem o estado fundamental do éxciton, em que o elétron e o buraco estão ocupando os níveis de fronteira da BC e BV respectivamente, alguns processos de recombinação ocorrem até que o elétron retorne ao seu nível de origem na BV com dissipação radiativa ou não-radiativa de energia.

Na recombinação excitônica radiativa direta, representada pela seta laranja no esquema da Figura 3, ocorre a emissão de um fóton com energia próxima à transição eletrônica de absorção de menor energia correspondente ao *band gap* do QD [2]. Portanto, o comprimento de onda da emissão fotoluminescente de QDs também é dependente do tamanho dos nanocristais. Como a recombinação excitônica ocorre rapidamente (aproximadamente 10 ns), a emissão de fotoluminescência nesse caso se dá por fluorescência, em que há a recombinação de um elétron excitado na BC com spin oposto ao outro elétron no orbital de origem na BV [7].

Uma das formas de emissão não-radiativa de energia do éxciton é por acoplamento com fônons, que são quasipartículas que propagam um movimento vibratório na rede cristalina em que todas as partes oscilam na mesma frequência. Esse decaimento por interação éxciton-fônon, resultante em uma transição vibrônica, está ilustrado pela seta roxa pontilhada na Figura 3. Contudo, trata-se de um processo pouco provável de ocorrer em QDs já que requer a criação simultânea de uma grande quantidade de fônons para dissipar a energia entre estados eletrônicos (decaimento por multifônons) [2].

Uma outra forma de dissipação de energia é mediada por defeitos ou por impurezas presentes na estrutura cristalina do QD. Esse tipo de dissipação, representada pelas setas verdes na Figura 3, resulta quase sempre em relaxação não-radiativa e compete consideravelmente com a recombinação excitônica radiativa direta [2]. Apesar de ser pouco provável, a recombinação radiativa também pode ocorrer, mas como o rendimento quântico do éxciton aprisionado é muito

baixo (menor que 5%), a fotoluminescência por defeitos resulta em alargamento e deslocamento da banda de emissão para energias menores que o *band gap* do QD [2,8].

1.2.1.3 Defeitos em *quantum dots*

Como os QDs estão em escala nanométrica de tamanho, eles possuem uma elevada razão superfície/volume, o que torna mais significativa a influência dos defeitos de superfície na qualidade da emissão de fluorescência dos QDs [8]. Os defeitos pontuais intrínsecos são os mais predominantes em nanocristais de semicondutores, especificamente vacâncias (defeitos tipo Schottky) e átomos intersticiais (defeitos tipo Frenkel) do metal ou do ametal, sendo esses últimos reportados apenas para ZnSe e ZnTe. É possível ocorrer também a formação de defeitos de antissítio, embora esses sejam relevantes somente para QDs de elementos dos grupos III-V, cujos constituintes têm poucas diferenças químicas entre si [9].

A presença de defeitos ou de impurezas na rede cristalina causa quebra de simetria e distorções nas ligações (efeito Jahn-Teller), levando ao surgimento de níveis energéticos entre os orbitais de fronteira das bandas de valência e de condução que aprisionam o elétron excitado [2,9]. Esse aprisionamento diminui a sobreposição das funções de onda do elétron e do buraco, resultando frequentemente em relaxação não-radiativa [2,8].

Uma estratégia muito utilizada para diminuir a quantidade de defeitos de superfície de QDs é conhecida como processo de passivação, que pode ser feito pelo recobrimento da superfície dos QDs com uma camada fina de um outro semicondutor geralmente de *band gap* maior ou com ligantes orgânicos apropriados. O núcleo do QD (*core*) é responsável pelas propriedades ópticas observadas, enquanto a camada externa (*shell*) é responsável por completar ligações entre átomos na superfície dos QDs, reduzindo os defeitos do nanocristal e assim melhorando suas propriedades ópticas [2,10,11].

1.2.1.4 Síntese de *quantum dots*

Os QDs são comumente sintetizados por técnicas epitaxiais e por técnicas coloidais. Na síntese coloidal, os QDs são recobertos com compostos orgânicos ou inorgânicos para manter os nanocristais separados e estabilizá-los, impedindo o crescimento demasiado e a precipitação [1].

Dependendo do solvente utilizado como meio de dispersão, a síntese coloidal de QDs pode ser classificada, majoritariamente, em orgânica ou aquosa [1].

A síntese coloidal em fase orgânica produz QDs mais estáveis e com maiores rendimentos quânticos, mas utiliza solventes na maioria das vezes tóxicos, caros e com altos pontos de ebulição, o que requer condições mais enérgicas de síntese [1,12]. Além disso, os QDs em suspensão coloidal orgânica têm superfície hidrofóbica e para a maioria das aplicações é necessário fazer procedimentos de transferência de fase ou troca de ligantes para torná-los hidrofílicos. Esses são processos laboriosos e que geralmente resultam em redução de rendimento quântico e de estabilidade [12].

A síntese coloidal aquosa de QDs, apesar de produzir nanocristais com rendimentos quânticos mais baixos em comparação à síntese orgânica, é menos tóxica e mais barata, com relação ao solvente, e pode ser realizada em condições mais brandas [1,12,13]. Além disso, os QDs sintetizados dessa forma são hidrofílicos e, portanto, podem ser aplicados em sistemas biológicos sem procedimentos adicionais [12]. Contudo, os procedimentos sintéticos descritos até agora na literatura têm um número considerável de variáveis experimentais, o que, por sua vez, pode influenciar diretamente a qualidade das propriedades ópticas finais. Portanto, a modificação sistemática das estratégias de síntese é fundamental para definir condições otimizadas.

Os QDs mais estudados e aplicados na literatura são constituídos de elementos dos grupos II-VI, tais como calcogenetos (selenetos, sulfetos e teluretos) de cádmio e de mercúrio [1] e, em menor quantidade, também têm sido estudados os calcogenetos de chumbo, zinco e prata. Para alguns semicondutores, como CdTe [14,15] e CdS [16], há alguns estudos multivariados sobre as condições reacionais de síntese de QDs. Contudo, até o momento não há estudos de caráter multivariado para QDs de CdSe ou de semicondutores estudados em menores proporções.

1.2.1.5 Conjugação de biomoléculas a *quantum dots*

Os QDs têm uma superfície ativa que possibilita sua conjugação com diversas biomoléculas, dando origem a nanopartículas com características ópticas dos QDs e funções bioquímicas das moléculas conjugadas. Esse processo, chamado de bioconjugação, possibilita ampliar a capacidade de marcação específica das biossondas baseadas em QDs [5,17].

A conjugação de biomoléculas a QDs pode ser realizada por interação eletrostática (adsorção) ou por ligação covalente. Devido à alta razão superfície/volume e às cargas na superfície dos QDs, moléculas com cargas opostas podem se ligar diretamente aos nanocristais por atração eletrostática [5,17]. A bioconjugação por adsorção é um processo fácil, direto e que não envolve agentes de acoplamento e reações químicas, mas pode resultar em perda de fluorescência ou de estabilidade coloidal dos QDs e dissociação dos conjugados em ambientes biológicos complexos. Além disso, é muito difícil de controlar a orientação de conjugação das biomoléculas e de conservar a estrutura e a função bioquímica de proteínas adsorvidas, o que pode influenciar diretamente na capacidade de marcação específica dos conjugados QD-biomolécula [5].

A bioconjugação via ligação covalente, por sua vez, é a estratégia mais utilizada para construção de sondas com QDs porque permite controlar efetivamente a orientação e a quantidade das biomoléculas conjugadas aos nanocristais [5]. O protocolo de bioconjugação mais empregado no caso de QDs carboxilados envolve a formação de ligação amida mediada por cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e pode ser conduzido em uma ou duas etapas, conforme ilustrado na Figura 4 [5,18].

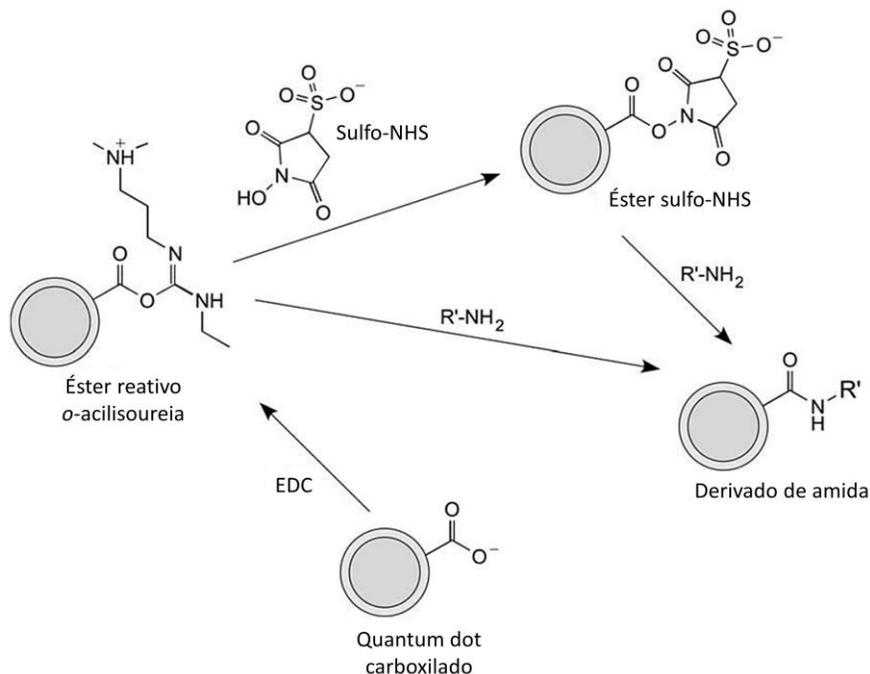
No processo de etapa única, os grupos carboxilato dos QDs ativados com EDC reagem com moléculas contendo grupo amina, formando ligações amida. Contudo, esse processo pode levar à polimerização de proteínas, além da conjugação aos QDs, pois os grupos carboxilato das proteínas também podem ser ativados pelo EDC e se ligar aos grupos amina de moléculas adjacentes [18].

O protocolo de duas etapas permite um maior controle na reação de bioconjugação. Após a ativação dos grupos carboxilato dos QDs com EDC, adiciona-se excesso de algum composto contendo N-hidroxissuccinimida (NHS), formando ésteres intermediários ativados e desativando o excesso de EDC. Ao adicionar-se a biomolécula contendo grupos amina, na etapa seguinte, acontecerá a conjugação ao QDs por formação de ligação amida, sem que ocorra polimerização mesmo se a biomolécula tiver grupos carboxilato [5,18].

A conjugação de biomoléculas contendo grupos tiol a QDs revestidos com grupos amino é feita comumente por uma reação de acoplamento por formação de ligação tioéter mediada pelo éster de NHS do ácido 4-(N-maleimidometil)ciclohexanocarboxílico (SMCC), conforme ilustrado na Figura 5 [5,18]. SMCC é um reagente heterobifuncional que contém um éster de NHS em uma terminação e um grupo maleimida na outra terminação. A terminação NHS do SMCC reage com

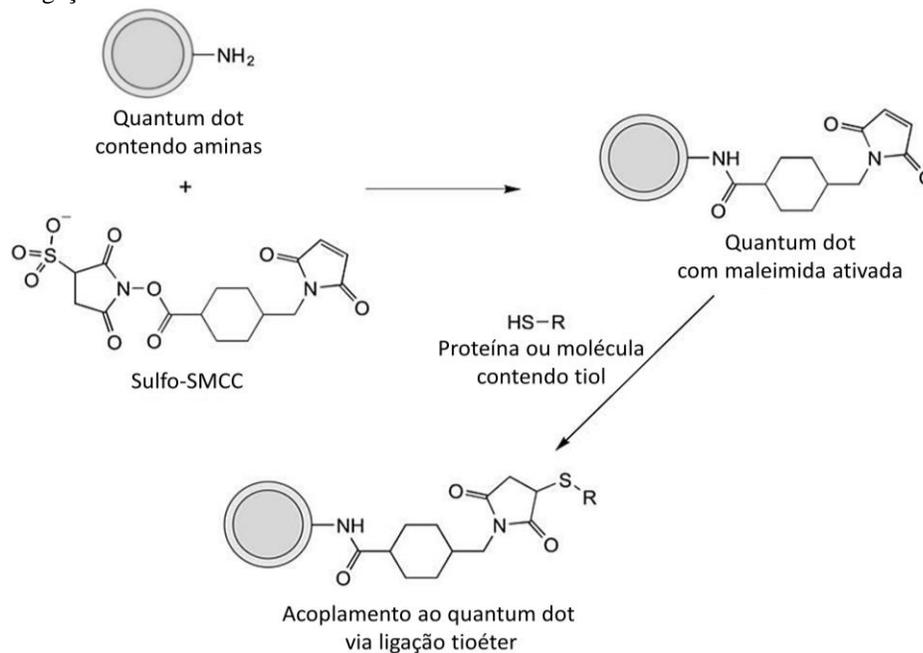
um grupo amina do QD, formando uma maleimida ativada que posteriormente reagirá com o grupo tiol da proteína ou de outra biomolécula a ser conjugada ao QD [5,18].

Figura 4 - Esquema da reação de bioconjugação de moléculas contendo grupo amina a *quantum dots* carboxilados via formação de ligação amida.



Fonte: Adaptado de Hermanson.

Figura 5 - Esquema da reação de bioconjugação de moléculas contendo grupo tiol a *quantum dots* contendo aminas via formação de ligação tioéter.



Fonte: Adaptado de Hermanson.

1.2.2 Otimização multivariada

Uma etapa crítica na obtenção de um procedimento ou método experimental consiste no estudo sobre como os fatores ou variáveis do experimento afetam a resposta desejada, a fim de encontrar as melhores condições dentro do objetivo almejado. Com esse intuito, a estratégia mais utilizada atualmente é a otimização univariada, que consiste na variação de um único fator por etapa mantendo-se os demais constantes. Encontrando-se a melhor condição para o fator estudado, este valor “ótimo” é fixado e um outro fator é variado na etapa subsequente. Esse processo é repetido até que se obtenham condições “ótimas” para todos os fatores [19]. Entretanto, há algumas desvantagens atreladas à estratégia de otimização univariada. Primeiramente, como apenas um fator é variado em cada etapa, é muito difícil constatar se há interação entre os efeitos de dois ou mais fatores [19,20]. Além disso, será necessária uma grande quantidade de experimentos até se chegar em uma resposta considerada “ótima”.

Nesse contexto, a otimização multivariada vem ganhando notoriedade por permitir variar simultaneamente todos os fatores em estudo e, assim, avaliar estatisticamente seus efeitos individuais e suas interações. Na otimização multivariada, são empregadas técnicas de planejamento experimental, que é uma das áreas de estudo da quimiometria – área da química que consiste na utilização de métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para a resolução de problemas de origem química.

As técnicas de planejamento experimental consistem em representações geométricas da distribuição de pontos experimentais no espaço de fatores que proporcionam uma varredura mais sistematizada e representativa do domínio experimental, possibilitando chegar à resposta ótima com uma quantidade reduzida de experimentos quando comparada à otimização univariada [19,21].

Como as grandezas dos níveis experimentais podem variar muito para cada fator, é conveniente fazer a codificação do domínio experimental de forma que todos os fatores vão variar em intervalos semelhantes estabelecidos por cada tipo de planejamento (por exemplo, de -1 a $+1$) e se tornam independentes da ordem de grandeza dos valores experimentais [19,21]. Para codificar os níveis experimentais de cada fator, utiliza-se a Equação 1 [21], em que C_i é o valor codificado para o nível do fator i , X_i é o valor real ou decodificado do nível em um experimento, X_i^0 é o valor real do ponto central do fator i (a média dos valores mínimo e máximo do fator), ΔX_i é o passo de

variação do valor real (diferença entre os valores mínimo e máximo do fator dividida por dois) e α é o valor máximo codificado para o fator em consideração, que depende do tipo de planejamento experimental.

$$C_i = \left| \frac{X_i - X_i^0}{\Delta X_i} \right| \alpha \quad \text{Equação 1}$$

1.2.2.1 Planejamento fatorial

O planejamento fatorial completo de dois níveis, também designado como planejamento fatorial 2^k , é uma das técnicas de planejamento experimental mais utilizadas. Nesse planejamento, os fatores são variados em dois níveis, um inferior (codificado para -1) e um superior (codificado para $+1$), portanto o valor de α é igual a 1 para todos os fatores [19,20].

A matriz de experimentos do planejamento fatorial 2^k é dada por todas as possíveis combinações entre níveis inferiores e superiores de todos os fatores, resultando em um número de experimentos igual a 2^k (k = número de fatores). A distribuição espacial dos pontos no espaço de fatores é representada por um quadrado para $k = 2$, um cubo para $k = 3$, e assim por diante.

O planejamento fatorial 2^k possibilita uma exploração inicial dos fatores com uma quantidade relativamente reduzida de experimentos, pois só considera os níveis extremos. Contudo, apesar desse planejamento geralmente ser utilizado como ponto de partida para otimizações multivariadas, outras técnicas de planejamento experimental que exploram outros níveis além dos extremos são necessárias para continuar a otimização.

A metodologia de superfície de resposta envolve um conjunto de planejamentos experimentais e regressões múltiplas que são empregadas para atingir o ponto experimental que leva à resposta otimizada. Basicamente, consiste em delinear um planejamento experimental, tratar os resultados obtidos para obter um modelo polinomial linear e, se não houver falta de ajuste, encontrar a direção de aumento (ou diminuição, dependendo do objetivo) da resposta. Nessa direção, um novo planejamento é feito, e esse processo de modelagem e deslocamento é repetido até que se verifique que está próximo do ponto ótimo. Nessa região, um novo planejamento que permita estimar um modelo quadrático é delineado, possibilitando encontrar o ponto de máxima ou mínima resposta [19,20].

1.2.2.2 Matriz Doehlert

Os principais planejamentos experimentais que permitem estimar os coeficientes de modelos quadráticos são o planejamento fatorial de três níveis, a matriz Doehlert, o planejamento composto central e o planejamento Box-Behnken. Desses planejamentos, o planejamento Doehlert possui a maior eficiência porque possibilita ajustar um modelo quadrático com um número menor de experimentos [19].

A matriz Doehlert é um planejamento de segunda ordem cujos pontos experimentais se distribuem nos vértices de um hexágono, sendo o número total de experimentos calculado por $k^2 + k + C$, para k fatores e C repetições no ponto central. Os valores codificados dos níveis dos fatores para matrizes Doehlert com até quatro variáveis estão apresentados na Tabela 1 [22].

Tabela 1 - Planejamentos Doehlert para dois, três e quatro fatores.

Combinação	Dois fatores		Três fatores			Quatro fatores			
	A	B	A	B	C	A	B	C	D
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	0	1	0	0	1	0	0	0
3	0,5	0,866	0,5	0,866	0	0,5	0,866	0	0
4	-1	0	0,5	0,289	0,817	0,5	0,289	0,817	0
5	-0,5	-0,866	-1	0	0	0,5	0,289	0,204	0,791
6	0,5	-0,866	-0,5	-0,866	0	-1	0	0	0
7	-0,5	0,866	-0,5	-0,289	-0,817	-0,5	-0,866	0	0
8			0,5	-0,866	0	-0,5	-0,289	-0,817	0
9			0,5	-0,289	-0,817	-0,5	-0,289	-0,204	-0,791
10			-0,5	0,866	0	0,5	-0,866	0	0
11			0	0,577	-0,817	0,5	-0,289	-0,817	0
12			-0,5	0,289	0,817	0,5	-0,289	-0,204	-0,791
13			0	-0,577	0,817	-0,5	0,866	0	0
14						0	0,577	-0,817	0
15						0	0,577	-0,204	-0,791
16						-0,5	0,289	0,817	0
17						0	-0,577	0,817	0
18						0	0	0,613	-0,791
19						-0,5	0,289	0,204	0,791
20						0	-0,577	0,204	0,791
21						0	0	-0,613	0,791

Fonte: A autora.

Um aspecto importante sobre o planejamento Doehlert é que a quantidade de níveis varia para cada fator, o que possibilita avaliar mais detalhadamente variáveis consideradas mais importantes que outras. Sendo assim, o valor de α pode ser 1, 0,866, 0,817 ou 0,791, dependendo do fator que se deseja estudar em um número maior de níveis [23].

1.2.3 Análise de dados de ordem superior

Dados obtidos de sistemas químicos podem ser classificados de acordo com o número de dimensões do tensor que os representa, isto é, a ordem do tensor. Instrumentos cuja medida é um valor escalar (tensor de ordem zero), como pHmetros e eletrodos íon-seletivos, produzem dados de ordem zero para cada amostra. Esses métodos demandam absoluta seletividade para o analito, pois não apresentam resultados confiáveis na presença de interferentes [24,25]. Um conjunto de dados de ordem zero para n amostras resulta em um vetor \mathbf{x} de dimensão n , conforme esquematizado na Figura 6, e tem que ser tratado por métodos de análise *one-way*, como calibração univariada [24].

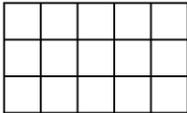
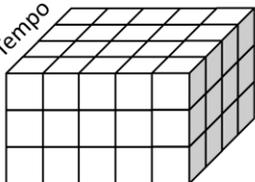
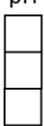
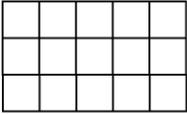
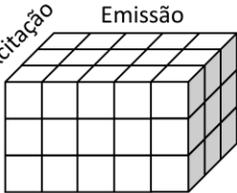
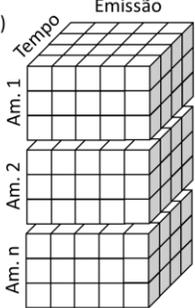
Dados de primeira ordem são obtidos por instrumentos que proporcionam um vetor (tensor de primeira ordem) como resposta para cada amostra, de tal forma que o conjunto de dados consiste em uma matriz \mathbf{X} de dimensões $n \times m$ em que n é o número de amostras e m é a quantidade de variáveis analisadas (comprimento de onda, potencial, tempo de retenção, composição, etc.), conforme ilustrado na Figura 6 [24,25]. Esse é o caso dos dados obtidos, por exemplo, por técnicas como voltametria, cromatografia e espectroscopia. O tratamento de tais dados requer métodos de análise *two-way* ou de primeira ordem, desde que os dados apresentem estrutura bilinear [24].

O conceito de bilinearidade pode ser explicado, resumidamente, através de uma matriz $\mathbf{X}(I \times J)$ à qual se deseje ajustar um modelo por Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*). O objetivo da PCA é decompor a matriz de dados \mathbf{X} em uma matriz de escores (*scores*) \mathbf{T} e uma matriz de pesos (*loadings*) \mathbf{P} , conforme representado na Equação 2, em que \mathbf{E} é a matriz de resíduos ou parte não explicada pelo modelo. Um modelo PCA com três componentes pode ser descrito pela Equação 3, onde se verifica que a parte modelada de \mathbf{X} é linear tanto em t_{i1} , t_{i2} e t_{i3} (fixando-se p_{j1} , p_{j2} e p_{j3}) quanto em p_{j1} , p_{j2} e p_{j3} (fixando-se t_{i1} , t_{i2} e t_{i3}). Portanto, pode-se afirmar que a Equação 3 é um modelo bilinear de \mathbf{X} [24].

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad \text{Equação 2}$$

$$x_{ij} = t_{i1}p_{j1} + t_{i2}p_{j2} + t_{i3}p_{j3} + e_{ij}; \quad i = 1, \dots, I; \quad j = 1, \dots, J \quad \text{Equação 3}$$

Figura 6 - Esquema ilustrativo de dados classificados de acordo com a ordem do tensor que os representa.

	Ordem zero	1ª ordem	2ª ordem	3ª ordem
Amostra 1	x_1 pH 	$x_{1(1,5)}$ Emissão 	$X_{1(3,5)}$ Emissão Excitação 	$\underline{X}_{1(3,5,4)}$ Emissão Tempo Excitação 
Amostra 2	x_2	$x_{2(1,5)}$	$X_{2(3,5)}$	$\underline{X}_{2(3,5,4)}$
Amostra n	x_n	$x_{n(1,5)}$	$X_{n(3,5)}$	$\underline{X}_{n(3,5,4)}$
Conjunto de dados	$x_{(n,1)}$ pH Amostras 	$X_{(n,5)}$ Emissão Amostras 	$\underline{X}_{(n,5,3)}$ Emissão Excitação Amostras 	$\underline{X}_{(nx3,5,4)}$ Emissão Tempo Excitação Am. 1 Am. 2 Am. n 

Fonte: A autora.

Algumas técnicas e estratégias de análise fornecem uma matriz (tensor de segunda ordem) como resposta para cada amostra, resultando em dados de segunda ordem (Figura 6). Dessa forma, pode-se obter um conjunto de dados de terceira ordem a partir da análise de duas ou mais amostras por técnicas hífenadas, voltametria em função do tempo, matrizes de excitação-emissão de fluorescência (EEMs, do inglês *fluorescence Excitation-Emission Matrices*), etc. Dados de ordem maior ou igual a dois são também chamados de dados de ordem superior ou dados multidimensionais. Se os registros dos dados forem perfeitamente sincronizados e não houver nenhuma dependência linear entre os modos instrumentais de aquisição, esses dados são ditos como trilineares e podem ser modelados por todos os métodos de análise *multi-way* ou de ordem superior [24,25].

A trilinearidade pode ser compreendida a partir de uma extensão do conceito de bilinearidade. Dado um conjunto de dados de segunda ordem representado por um tensor $\underline{X}(I \times J \times K)$, em que \underline{X} é decomposto a partir de um modelo com dois componentes como na Equação 4 e a , b e c representam cada modo de aquisição instrumental ou dimensão do conjunto de dados.

$$x_{ijk} = a_{i1}b_{j1}c_{k1} + a_{i2}b_{j2}c_{k2} + e_{ijk}; \quad i = 1, \dots, I; \quad j = 1, \dots, J; \quad k = 1, \dots, K \quad \text{Equação 4}$$

A parte modelada de $\underline{\mathbf{X}}$ é linear em a_{i1} e a_{i2} (fixando-se os conjuntos de parâmetros b e c), em b_{j1} e b_{j2} (fixando-se os conjuntos de parâmetros a e c) e em c_{k1} e c_{k2} (fixando-se os conjuntos de parâmetros a e b). Portanto, pode-se dizer que a Equação 4 é um modelo trilinear de $\underline{\mathbf{X}}$ [24]. O conceito de trilinearidade pode ser estendido para quadrilinearidade, dado um tensor com no mínimo quatro modos: variando-se apenas um conjunto de parâmetros e mantendo-se constantes os outros três conjuntos de parâmetros, o modelo é linear no conjunto de parâmetros que está sendo variado [24].

Contudo, é importante mencionar que os conceitos de multilinearidade não estão relacionados à quantidade de modos do conjunto de dados. Obviamente, um conjunto de dados precisa ter no mínimo dois, três ou quatro modos, respectivamente, para apresentar comportamento bi-, tri- ou quadrilinear. Mas nem todo conjunto de dados com três modos se comporta de forma trilinear [24]. Esse é o caso, por exemplo, de dados de imagens multivariadas: os modos constituídos pelas coordenadas espaciais podem ser desdobrados em um único modo, já que o espectro registrado não é linearmente independente dos pixels ou voxels. Portanto, uma imagem contendo três modos será mais adequadamente tratada por modelos bilineares, após o desdobramento dos dois modos contendo as coordenadas dos pixels, que por modelos trilineares.

1.2.3.1 Modelos de Tucker

Na década de 60, Ledyard Tucker propôs os primeiros métodos para decomposição de tensores de terceira ordem, os quais ficaram conhecidos por Tucker1, Tucker2 e Tucker3 ou, genericamente, análise de componentes principais de N modos. No modelo Tucker1, um tensor $\underline{\mathbf{X}}(I \times J \times K)$ é desdobrado em uma matriz $\mathbf{X}(I \times JK)$ e decomposto usando um algoritmo bilinear como PCA (Equação 2). Dessa forma, o modelo Tucker1 ignora a possível estrutura trilinear dos dados, já que se baseia em um modelo bilinear [24,25]. O modelo Tucker2 pode ser compreendido como um caso particular do modelo Tucker3 em que uma das dimensões é mantida constante na decomposição [25].

O Tucker3, representado na Equação 5, é o mais importante dos modelos de Tucker para a modelagem dos dados desta tese. Esse modelo decompõe o tensor $\underline{\mathbf{X}}(I \times J \times K)$ nas matrizes

$\mathbf{A}(I \times D)$, $\mathbf{B}(J \times E)$ e $\mathbf{C}(K \times F)$, contendo os pesos referentes a cada modo do conjunto de dados, e na matriz conectora não-diagonal $\mathbf{G}(D \times EF)$. O tensor $\underline{\mathbf{E}}$, de mesmas dimensões que $\underline{\mathbf{X}}$, contém os resíduos deixados pelo modelo [24,25].

$$\underline{\mathbf{X}} = \mathbf{A}\mathbf{G}(\mathbf{C} \otimes \mathbf{B})^T + \underline{\mathbf{E}} \quad \text{Equação 5}$$

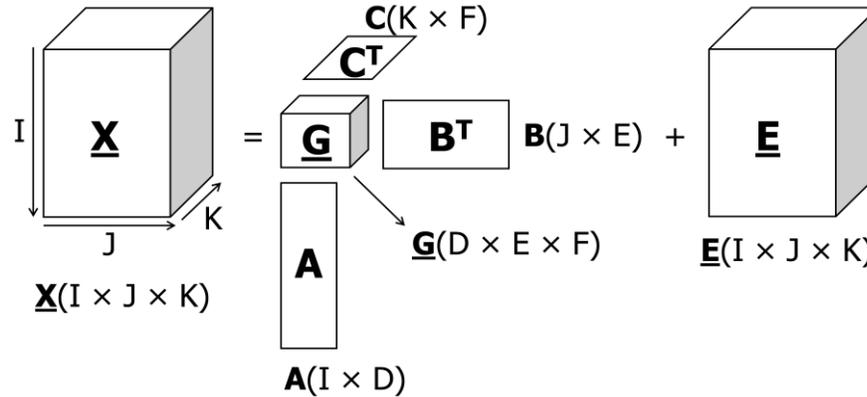
As dimensões D , E e F da matriz conectora correspondem ao número de fatores no primeiro, segundo e terceiro modos, respectivamente. Dessa forma, o modelo Tucker3 permite que o número de fatores decompostos em cada modo seja diferente. O produto de Kronecker (representado pelo símbolo \otimes) entre as matrizes \mathbf{C} e \mathbf{B} possibilita expressar esses dois modos em apenas um modo combinado. Dadas as matrizes $\mathbf{B}(J \times E)$ e $\mathbf{C}(K \times F)$ representadas abaixo, o produto de Kronecker $\mathbf{C} \otimes \mathbf{B}$ da Equação 6 é obtido a partir de uma generalização do produto externo de vetores para matrizes, resultando numa matriz com estrutura de bloco [24,25].

$$\mathbf{B} = \begin{bmatrix} b_{1,1} & \cdots & b_{1,E} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ b_{J,1} & \cdots & b_{J,E} \end{bmatrix}_{J \times E} ; \mathbf{C} = \begin{bmatrix} c_{1,1} & \cdots & c_{1,F} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ c_{K,1} & \cdots & c_{K,F} \end{bmatrix}_{K \times F}$$

$$\mathbf{C} \otimes \mathbf{B} = \begin{bmatrix} c_{1,1}\mathbf{B} & \cdots & c_{1,F}\mathbf{B} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ c_{K,1}\mathbf{B} & \cdots & c_{K,F}\mathbf{B} \end{bmatrix}_{KJ \times FE} \quad \text{Equação 6}$$

No modelo Tucker3, todos os pesos individuais interagem nos diferentes modos. A importância dessas interações entre fatores pode ser avaliada diretamente pela magnitude dos elementos da matriz conectora \mathbf{G} . A decomposição de dados do modelo Tucker3 está representada no esquema da Figura 7 [24,25].

Figura 7 - Representação do modelo Tucker3.



Fonte: A autora.

1.2.3.2 Análise de fatores paralelos

Na década de 70, um novo modelo para decomposição ou fatoração de dados de ordem superior foi proposto independente e simultaneamente por Richard Harshman [26] e Douglas Carroll e Jih-Jie Chang [27]. Esse modelo foi chamado de PARAFAC por Harshman e Decomposição Canônica (CANDECOMP, do inglês *Canonical Decomposition*) por Carroll e Chang.

O modelo PARAFAC decompõe um tensor $\underline{\mathbf{X}}(I \times J \times K)$ nas matrizes $\underline{\mathbf{A}}(I \times F)$, $\underline{\mathbf{B}}(J \times F)$ e $\underline{\mathbf{C}}(K \times F)$, em que o número de fatores F é o mesmo para todos os modos. Esta é uma diferença importante entre PARAFAC e Tucker3: como o número de fatores pode ser diferente para cada modo na decomposição por Tucker3, as interações entre fatores podem ser de difícil interpretação física [24,25]. PARAFAC pode ser compreendido como uma versão restrita de Tucker3 em que a matriz conectora é uma superidentidade, isto é, os elementos são iguais a 1 na superdiagonal e 0 nas demais posições. Dessa forma, o primeiro fator de um modo só se relaciona com os primeiros fatores dos outros modos, e assim sucessivamente, e qualquer variação associada a interações entre fatores diferentes (elementos fora da superdiagonal) é desconsiderada [24,25,28].

Há várias notações para representar o modelo PARAFAC, e uma delas, apresentada na Equação 7, usa o produto de Khatri-Rao (representado pelos símbolos \odot ou \otimes), em que $\underline{\mathbf{E}}$ é o tensor de resíduos.

$$\underline{\mathbf{X}} = \underline{\mathbf{A}}(\underline{\mathbf{C}} \odot \underline{\mathbf{B}})^T + \underline{\mathbf{E}}$$

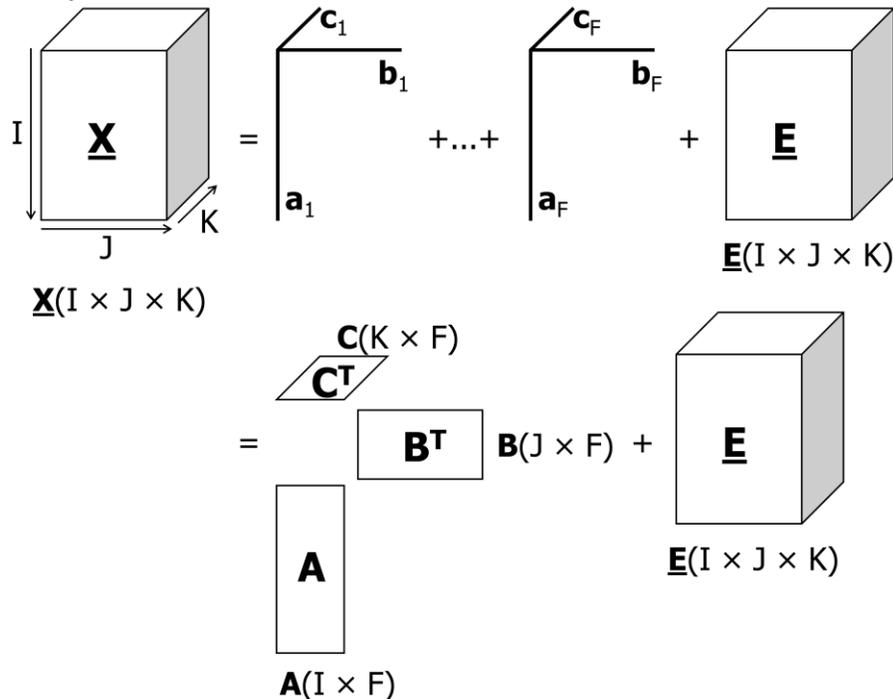
Equação 7

O produto de Khatri-Rao das matrizes $\mathbf{B}(J \times F)$ e $\mathbf{C}(K \times F)$ é igual ao produto de Kronecker entre os vetores coluna com mesmo índice f (\mathbf{c}_f e \mathbf{b}_f) das matrizes \mathbf{C} e \mathbf{B} , conforme representado na Equação 8. Portanto, o produto de Khatri-Rao $\mathbf{C} \odot \mathbf{B}$ é matematicamente mais simples que o produto de Kronecker $\mathbf{C} \otimes \mathbf{B}$.

$$\mathbf{C} \odot \mathbf{B} = [\mathbf{c}_1 \otimes \mathbf{b}_1 \quad \mathbf{c}_2 \otimes \mathbf{b}_2 \quad \mathbf{c}_F \otimes \mathbf{b}_F]_{JK \times F} = \begin{bmatrix} c_{1,1} \mathbf{b}_1 & c_{1,2} \mathbf{b}_2 & c_{1,F} \mathbf{b}_F \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ c_{K,1} \mathbf{b}_1 & c_{K,2} \mathbf{b}_2 & c_{K,F} \mathbf{b}_F \end{bmatrix}_{KJ \times F} \quad \text{Equação 8}$$

A decomposição de dados do modelo PARAFAC para um tensor com m modos ($m = 3$) pode ser representada em F tríades de vetores de pesos, como na parte superior da Figura 8, ou em m matrizes de pesos, como na parte inferior da mesma ilustração.

Figura 8 - Representação do modelo PARAFAC.



Fonte: A autora.

Uma grande vantagem de PARAFAC é a singularidade de soluções. Um tensor com três modos ou mais pode ser decomposto sem liberdade rotacional, desde que os dados sejam realmente trilineares, o número de fatores do modelo seja escolhido adequadamente e a razão sinal/ruído seja apropriada. Como resultado, são obtidas soluções únicas que possibilitam estimar as concentrações

e perfis puros (espectros, voltamogramas, cromatogramas, etc.) dos componentes individuais das amostras [24,28]. Por essa razão, o modelo PARAFAC também é conhecido como um dos métodos de “cromatografia matemática”.

Unicidade significa, matematicamente, que os componentes estimados por PARAFAC não podem sofrer rotação sem perda de ajuste. Uma das formas menos restritivas para avaliar se um modelo PARAFAC apresenta soluções singulares requer que a condição da Equação 9 seja satisfeita, em que F é o número de componentes do modelo, e k_A , k_B e k_C são os postos k das matrizes de pesos **A**, **B** e **C** [28].

$$k_A + k_B + k_C \geq 2F + 2 \quad \text{Equação 9}$$

Se uma combinação aleatória de k colunas de uma matriz tem posto-coluna completo, e o mesmo não é válido para uma combinação de $k + 1$ colunas, então k é o posto k (k -rank) dessa matriz. O posto e o posto k de uma matriz estão relacionados, mas não são iguais, pois o posto k não pode exceder o posto [24,28]. Dado um tensor $\underline{\mathbf{X}}(6,6,6)$, é possível estimar soluções singulares com PARAFAC para até 8 componentes a partir de 6 amostras. O mesmo não seria possível, por exemplo, a partir da decomposição de uma matriz $\mathbf{X}(6,6)$.

Embora seja possível encontrar soluções singulares com até F componentes satisfazendo a Equação 9, isso não implica que F corresponde ao número correto de componentes que proporcionem uma interpretação química válida do modelo PARAFAC. Se o número de componentes escolhido for inferior ao número de espécies químicas responsáveis pelo sinal medido, o modelo PARAFAC vai combinar o sinal de compostos químicos distintos. Se o número de componentes for superior, o sinal de um único composto químico será representado por dois ou mais componentes do modelo [29].

Há várias formas propostas para avaliar se o número de componentes do modelo PARAFAC é condizente com o número real de componentes químicos nas amostras. Contudo, não há um procedimento absoluto e, por vezes, métodos diferentes de validação podem levar a indicações conflitantes acerca do número de componentes a ser escolhido. Portanto, a subjetividade é inevitável em alguns casos, mas pode ser minimizada pela combinação de métodos de validação com o conhecimento químico sobre o sistema estudado [28,29].

Os principais métodos utilizados de forma combinada para validar a escolha do número de componentes do modelo são: (1) verificação da variância explicada e dos resíduos deixados pelo modelo, (2) indicações algorítmicas (número de iterações e tempo necessário para convergência, degenerescência, mínimos locais, etc.), (3) divisão das amostras em dois subconjuntos e comparação entre os modelos PARAFAC ajustados a todo o conjunto de amostras e a cada subconjunto separadamente (análise *split-half*), (4) diagnóstico de consistência trilinear (CORCONDIA, do inglês *Core Consistency Diagnostic*) e (5) inspeção visual dos perfis recuperados (pesos) de cada componente aliada ao conhecimento químico sobre os dados.

A análise *split-half* é uma forma importante para examinar se o número de fatores escolhido para o modelo PARAFAC é adequado, em que o conjunto de dados é dividido em subconjuntos independentes e modelos PARAFAC ajustados a cada subconjunto são comparados. Os dados são igualmente divididos em duas partes, por exemplo, e em seguida modelos PARAFAC com mesmo número de componentes são ajustados aos dois subconjuntos. Se o número de componentes for adequado e se os mesmos compostos químicos estiverem presentes em ambos os subconjuntos, espera-se que os perfis recuperados pelos modelos obtidos com todos os dados e subconjuntos sejam iguais ou semelhantes [28,29].

Qualquer um dos modos pode ser selecionado para ser dividido na análise *split-half*, desde que tenha um número suficiente de amostras ou variáveis independentes. A colinearidade de variáveis espectrais colabora para que o modo das amostras seja preferível [28]. Entretanto, a partir de um certo número de componentes, o número total de amostras deve ser grande o suficiente para que os subconjuntos satisfaçam a condição da Equação 9 e os modelos obtidos sejam singulares [29].

No CORCONDIA, um modelo Tucker3 é ajustado às matrizes de pesos do modelo PARAFAC com F componentes, e o tensor central $\underline{\mathbf{G}}$ obtido é comparado a um tensor superidentidade. Como o PARAFAC pode ser interpretado como um modelo Tucker3 restrito, o tensor $\underline{\mathbf{G}}$ será aproximadamente igual ao tensor superidentidade se o conjunto de dados tiver consistência trilinear [25,30].

O CORCONDIA é uma ferramenta que ajuda a identificar o sobreajuste de um modelo PARAFAC, pois tende a ter valor alto (próximo de 100%) para modelos com poucos componentes e cai abruptamente quando o número de componentes for maior do que o necessário. Dessa forma, deve-se escolher o maior número de componentes que ainda proporcione um modelo com

CORCONDIA alto [29,30]. Na prática, o CORCONDIA não deve ser usado como um método absoluto para a escolha do número de componentes já que, muito frequentemente, modelos com cinco ou mais componentes apresentam valor de CORCONDIA baixo ou até negativo, ainda que os perfis recuperados sejam condizentes com o fenômeno químico real [29].

A validação química é, certamente, indispensável na escolha do número mais adequado de componentes do modelo. As concentrações e pesos recuperados pelo modelo PARAFAC devem ser visualmente inspecionados para averiguar se são coerentes e quimicamente interpretáveis [24,29]. Nessa etapa, somente o conhecimento químico e físico sobre o sistema e os compostos sob estudo pode proporcionar a percepção de que o modelo obtido é válido e útil.

1.2.3.3 Fusão de dados de ordem superior

Os problemas de muitas áreas, como química, medicina, engenharia, informática, etc., são de natureza multivariada e, em muitas das vezes, oriundos de múltiplas fontes. Nesse cenário, a fusão ou análise conjunta de dados têm se tornado muito atrativa quando se deseja extrair mais informações a partir de dados de múltiplas fontes ou sensores combinados. Dessa forma, é possível obter vantagens tais como ganhos em qualidade ou relevância das informações e diminuição de custos ou tempo de análise [31,32].

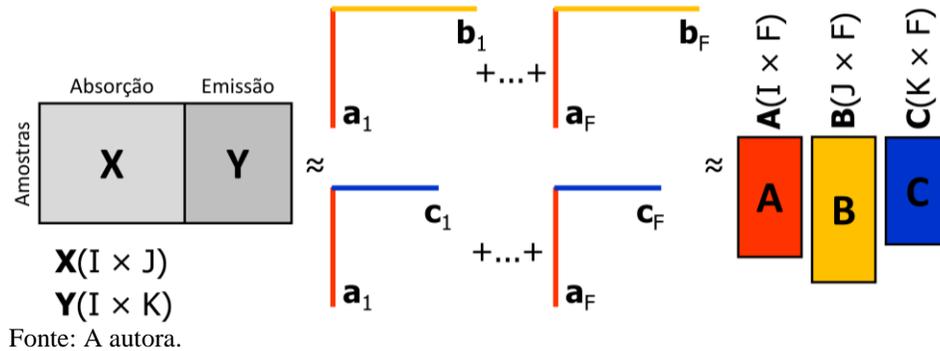
A análise de I amostras por absorção UV (J comprimentos de onda) e emissão (K comprimentos de onda), por exemplo, constitui as matrizes $\mathbf{X}(I \times J)$ e $\mathbf{Y}(I \times K)$ representadas na Figura 9. O problema da fatoração conjunta dessas duas matrizes pode ser formulado como a minimização da função objetivo representada na Equação 10 [31], em que \mathbf{A} representa a matriz com os escores dos F fatores nas amostras e \mathbf{B} e \mathbf{C} são as matrizes de pesos dos F fatores respectivamente nos modos de absorção e emissão.

$$f(\mathbf{A}, \mathbf{B}, \mathbf{C}) = \|\mathbf{X} - \mathbf{A}\mathbf{B}^T\|^2 + \|\mathbf{Y} - \mathbf{A}\mathbf{C}^T\|^2 \quad \text{Equação 10}$$

As matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} estão acopladas no primeiro modo, o das amostras, o que possibilita a fatoração conjunta dessas duas matrizes. Entretanto, o problema da Equação 10 pode ser estendido para mais que duas matrizes acopladas em diferentes modos. Além disso, a adição de termos de

penalidade indutores de esparsidade na fatoração de matrizes acopladas possibilita extrair fatores mais interpretáveis, que refletem os perfis “puros” dos fatores recuperados matematicamente [33].

Figura 9 - Esquema representativo da fatoração de duas matrizes acopladas.

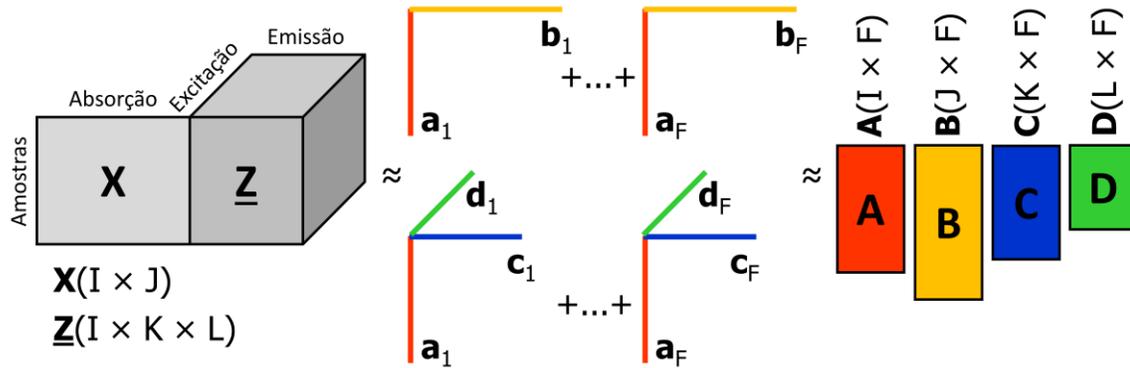


Frequentemente, dados de ordem superior são comprimidos e forçados a serem de primeira ordem, ainda que sejam trilineares, a fim de facilitar a fusão de dados e a extração de informações usando modelos bilineares. Todo conjunto de dados que possa ser adequadamente decomposto com PARAFAC também o será com Tucker3 ou PCA, e o ajuste do modelo PCA sempre será melhor que o ajuste de um modelo PARAFAC. Isso decorre do fato de que PCA usa mais graus de liberdade (geralmente em excesso) que PARAFAC, modelando inclusive ruídos ou variações sistemáticas nos dados. Entretanto, métodos de ordem superior proporcionam modelos mais adequados, robustos e interpretáveis, além de serem menos sensíveis a ruídos e valores ausentes nos dados. Portanto, uma vez que dados de ordem superior apresentem consistência trilinear, não é recomendado que sejam desdobrados para matrizes [24,28].

Considerando a aquisição de EEMs para I amostras, o conjunto de dados resultante pode ser representado pelo tensor de terceira ordem $\underline{\mathbf{Z}}(I \times K \times L)$. Esse tensor pode ser acoplado à matriz $\mathbf{X}(I \times J)$ contendo os espectros de absorção UV das mesmas I amostras, constituindo um conjunto de dados heterogêneo representado na Figura 10.

A fatoração conjunta de dados heterogêneos pode ser formulada como na Equação 11, em que a matriz \mathbf{X} e o tensor $\underline{\mathbf{Z}}$ são simultaneamente decompostos em F fatores pela minimização da função objetivo a seguir. Dessa forma, a matriz \mathbf{X} é fatorada e um modelo PARAFAC é ajustado a $\underline{\mathbf{Z}}$ de tal forma que a matriz de fatores \mathbf{A} (correspondente ao modo compartilhado de \mathbf{X} e $\underline{\mathbf{Z}}$) será a mesma [31]. \mathbf{C} e \mathbf{D} são matrizes de pesos do segundo e terceiro modos de $\underline{\mathbf{Z}}$.

Figura 10 - Esquema representativo da fatoração de uma matriz e um tensor de terceira ordem (três vias) acoplados.



Fonte: A autora.

$$f(\mathbf{A}, \mathbf{B}, \mathbf{C}, \mathbf{D}) = \|\mathbf{X} - \mathbf{A}\mathbf{B}^T\|^2 + \|\underline{\mathbf{Z}} - \llbracket \mathbf{A}, \mathbf{C}, \mathbf{D} \rrbracket\|^2 \quad \text{Equação 11}$$

A formulação da Equação 11, também chamada de fatoração de matriz e tensor acoplados (CMTF, do inglês *Coupled Matrix and Tensor Factorization*), tem sido muito estudada recentemente, inclusive com outros métodos de fatoração tensorial além de PARAFAC, e pode ser utilizada também quando se tem somente tensores acoplados. Uma característica importante do modelo CMTF, herdada de PARAFAC, é a unicidade de soluções. Contudo, o modelo CMTF falha na identificação de fatores compartilhados e não-compartilhados nos conjuntos de dados acoplados, pois a formulação da Equação 11 assume que todas as colunas da matriz de fatores \mathbf{A} são iguais, ou seja, que todos os F fatores estão presentes na matriz \mathbf{X} e no tensor $\underline{\mathbf{Z}}$ [31].

É muito frequente a presença de fatores não-compartilhados em conjuntos de dados distintos, ainda que sejam oriundos das mesmas amostras. Supondo-se que as I amostras que compõem a matriz \mathbf{X} e o tensor $\underline{\mathbf{Z}}$ são misturas de cinco compostos dos quais dois não apresentam emissão de fluorescência, mas todos apresentam absorção na região espectral avaliada. Dessa forma, espera-se que os sinais observados nos espectros de absorção sejam referentes a cinco fatores, mas somente três deles são responsáveis pelos sinais das EEMs.

O modelo CMTF foi reformulado por Acar *et al.* para incluir constantes de modelagem através das quais é possível identificar componentes compartilhados e não-compartilhados em conjuntos de dados acoplados. Esse novo modelo, representado pela função objetivo da Equação 12 para $\alpha \geq 1$, foi denominado fatoração avançada de matriz e tensor acoplados (ACMTF, do inglês *Advanced CMTF*) [31].

$$\begin{aligned}
f(\boldsymbol{\sigma}, \boldsymbol{\lambda}, \mathbf{A}, \mathbf{B}, \mathbf{C}, \mathbf{D}) &= \|\mathbf{X} - \mathbf{A}\boldsymbol{\Sigma}\mathbf{B}^T\|^2 + \|\underline{\mathbf{Z}} - \llbracket \boldsymbol{\lambda}; \mathbf{A}, \mathbf{C}, \mathbf{D} \rrbracket\|^2 + \beta \sum_{f=1}^F \sqrt{\sigma_f^2 + \varepsilon} + \beta \sum_{f=1}^F \sqrt{\lambda_f^2 + \varepsilon} \\
&+ \alpha \sum_{f=1}^F (\|\mathbf{a}_f\| - 1)^2 + \alpha \sum_{f=1}^F (\|\mathbf{b}_f\| - 1)^2 + \alpha \sum_{f=1}^F (\|\mathbf{c}_f\| - 1)^2 + \alpha \sum_{f=1}^F (\|\mathbf{d}_f\| - 1)^2
\end{aligned}$$

Equação 12

Na Equação 12, $\boldsymbol{\sigma}_{(F,1)}$ e $\boldsymbol{\lambda}_{(F,1)}$ são vetores contendo os pesos dos componentes de posto 1 na matriz \mathbf{X} e no tensor $\underline{\mathbf{Z}}$, respectivamente, $\boldsymbol{\Sigma}_{(F,F)}$ é uma matriz diagonal com entradas de $\boldsymbol{\sigma}$ na diagonal, \mathbf{a}_f é a f -ésima coluna de \mathbf{A} , F é o número total de fatores (compartilhados ou não), $\|\cdot\|$ denota a norma de Frobenius para matrizes e tensores de ordem superior e a norma 2 para vetores, e $\beta \geq 0$ é um parâmetro de penalidade.

Resumidamente, o objetivo do modelo ACMTF é esparsificar os pesos $\boldsymbol{\sigma}$ e $\boldsymbol{\lambda}$ usando as penalidades de norma 1 de forma que os fatores não-compartilhados tenham normas igual ou próxima de 0 em um dos conjuntos de dados. Mais detalhes matemáticos e algorítmicos do modelo ACMTF podem ser encontrados em Acar *et al.* [31].

2 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DE PROPRIEDADES ÓPTICAS DE *QUANTUM DOTS* DE CdSe OBTIDOS POR UM PROCEDIMENTO *ONE-POT* EM MEIO AQUOSO

2.1 INTRODUÇÃO

Os nanocristais de sulfeto de cádmio (CdS) foram os primeiros sistemas em confinamento quântico tridimensional bem-estabelecidos com propriedades significativamente diferentes de sistemas anteriormente sintetizados em confinamento quântico unidimensional [5]. O conhecimento proveniente dos estudos desenvolvidos com QDs de CdS foi gradativamente estendido à síntese aquosa de QDs de outros semicondutores, tais como outros calcogenetos (selenetos e teluretos) de cádmio e de mercúrio [1], que são os mais reportados, e, em menores proporções, os calcogenetos de chumbo e de zinco.

Do ponto de vista químico, a síntese de QDs em fase aquosa se baseia simplificada em uma reação de precipitação controlada dos nanocristais do semicondutor, em que um agente estabilizante é necessário para limitar o crescimento das partículas e evitar que elas se agreguem posteriormente e precipitem [5]. A síntese em meio aquoso apresenta algumas vantagens, em relação à síntese em fase orgânica, pois utiliza um solvente barato, atóxico e com ponto de ebulição relativamente baixo em comparação a solventes orgânicos comumente usados na obtenção de QDs, como 1-octadeceno, trioctilfosfina e ácido oléico [34,35], o que possibilita realizar as sínteses em condições mais brandas. Ainda que QDs sintetizados em meio aquoso geralmente apresentem rendimentos quânticos inferiores, comparados àqueles sintetizados em meio orgânico [36-38], é possível contornar isso com a otimização das condições sintéticas.

Apesar de apresentarem uma forte tendência à formação de defeitos intrínsecos, QDs de seleneto de cádmio (CdSe) são um dos materiais nanoestruturados mais estudados e aplicados, com um *band gap* do *bulk* de 1,75 eV e a_B de 4,9 nm [2]. Na Tabela 2, é apresentado um resumo das condições sintéticas, comprimentos de onda de emissão e rendimentos quântico encontrados em trabalhos envolvendo a síntese QDs de CdSe em meio aquoso.

Tabela 2 - Resumo das condições de síntese e algumas características ópticas de *quantum dots* de CdSe obtidos em meio aquoso.

Precusores de Cd e Se	Estabilizante	pH	Temperatura (°C)	Gás	Tempo (min)	λ_{ems} (nm)	Rendimento quântico (%)	Referência
$Cd(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$, Al_2Se_3	2-mercaptoetanol, tioglicerol, ácido tioglicólico	11,2	-	N_2	≤ 720	≤ 600	<0,1	[39]
$CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$, Se	Ácido 3-mercapto-propiónico	9,0-10,0	Ambiente-100	-	30-110	384-600	12-43	[40]
$CdCl_2$, Se	Ácido mercaptosuccínico, quinina	7,0	-	N_2	1440	534 e 542	0,04-0,1	[41]
$CdCl_2 \cdot H_2O$, Se	Ácido 3-mercapto-propiónico, ácido tioglicólico, tioglicerol, glutationa	10,0	100	Ar	≤ 180	642-686	-	[42]
$CdCl_2$, Na_2SeO_3	Ácido mercaptosuccínico	-	40-50	-	1-75	489-512	17,6-31,4	[43]
$CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$, SeO_2	Ácido tioglicólico	8-12	100	-	10-300	523-633	0,6-4,1	[44]
$3CdSO_4 \cdot 8H_2O$, $CdCl_2$, Se	Ácido tioglicólico, mercaptoetanol, polivinilpirrolidona	7, 9 e 11	-	N_2	60	-	-	[45]
$CdCl_2 \cdot H_2O$, SeO_2	Ácido 3-mercapto-propiónico	11	100	-	30-90	505-647	2,6-24	[46]
$CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$, Se	Ácido 3-mercapto-propiónico	11,0	-	-	30-540	485-514	≤ 16	[38]
$CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$, $SeCl_4$	Ácido mercaptosuccínico	11,8	100	-	30-420	495-545	3,2-32,4	[47]
$(CH_3COO)_2Cd \cdot 2H_2O$, Se	Ácido tioglicólico	9-10	25-80	-	420-540	517-600	10	[48]
$CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$, SeO_2	Ácido mercaptosuccínico	11,8	100	-	30-600	514-561	1,9-22,7	[36]

Fonte: A autora.

Rogach *et al.* sintetizaram QDs de CdSe em meio aquoso a partir de $Cd(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$, Al_2Se_3 como precursores de Cd e Se, respectivamente, e testaram três agentes estabilizantes (2-mercaptoetanol, 1-tioglicerol e ácido tioglicólico) em pH 11,2. Os QDs, sintetizados sob refluxo e atmosfera inerte de N_2 por até 12 h, apresentaram emissão em comprimento de onda de até 600 nm e baixos rendimentos quânticos (inferiores a 0,1%) [39].

Song, Duan e Zhan propuseram um procedimento *one-pot* para obter QDs de CdSe a partir de soluções aquosas de $CdCl_2$ e de Na_2SeO_3 , com temperatura variando de 40 a 50 °C e tempo de refluxo de até 75 min. O ácido mercaptosuccínico (MSA) foi empregado como agente estabilizante, e os nanocristais obtidos apresentaram emissão na faixa de 489 a 512 nm, com rendimento quântico variando de 17,6 a 31,4% [43].

Um outro procedimento *one-pot* para obter QDs de CdSe estabilizados com MSA foi reportado por Wang *et al.*, utilizando $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ e SeO_2 como precursores de Cd e Se, respectivamente. Os autores fixaram o pH em 11,8 e a temperatura de síntese em 100 °C, e otimizaram univariadamente a razão molar de MSA:Cd e o tempo de síntese. Os QDs de CdSe que apresentaram o maior rendimento quântico neste trabalho (22,7%) foram obtidos com 10 h de refluxo.

A reação *one-pot* – procedimento de etapa única em que todos os precursores são adicionados a um único vaso reacional – é uma das estratégias mais simples relatada para obtenção de QDs de CdSe [36,43-47]. Contudo, após uma busca exaustiva, constatou-se que até o momento ainda não foram descritos na literatura estudos multivariados sobre os parâmetros de síntese e como eles afetam as propriedades ópticas de QDs de CdSe.

Nesse contexto, o presente capítulo visa estabelecer um procedimento *one-pot* simples e rápido para obtenção de QDs de CdSe com propriedades ópticas otimizadas. Os parâmetros experimentais mais comumente estudados na síntese coloidal aquosa desse material, que são as razões molares de Cd:Se e de agente estabilizante:Cd, pH, temperatura e tempo de reação [34-37,43-46,48,], serão otimizados de forma multivariada.

2.2 OBJETIVOS

O presente capítulo tem como objetivo geral o desenvolvimento de um procedimento *one-pot* otimizado para a síntese em meio aquoso de QDs de CdSe altamente fluorescentes, utilizando estratégias de otimização multivariada. Os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Otimizar simultaneamente propriedades ópticas dos QDs de CdSe pela maximização da intensidade de emissão e minimização da largura à meia altura (FWHM, do inglês *Full Width at Half Maximum*) da banda de emissão;
- Caracterizar optica, estrutural e morfológicamente os QDs de CdSe obtidos em condições otimizadas de síntese.

2.3 METODOLOGIA

2.3.1 Materiais

Todos os materiais foram usados como recebidos sem purificação adicional, e todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida em um sistema de deionização (resistividade de 18,2 M Ω a temperatura ambiente). Foram utilizados os reagentes: cloreto de cádmio (CdCl₂, 99,99% - Sigma-Aldrich Co./EUA), selenito de sódio (Na₂SeO₃, 99,999% - Sigma-Aldrich Co./EUA), borohidreto de sódio (NaBH₄, 98% - Sigma-Aldrich Co./EUA), ácido 2-sulfanilbutanodioico – usualmente nomeado de ácido tiomálico ou ácido mercaptosuccínico – (MSA, 97% - Sigma-Aldrich Co./EUA), hidróxido de sódio (NaOH, 97% - Dinâmica Química Contemporânea Ltda/Brasil) e sulfato de quinina (Vetec Química Fina Ltda/Brasil).

2.3.2 Planejamentos experimentais e sínteses dos *quantum dots* de CdSe

As sínteses dos QDs de CdSe foram realizadas no Laboratório Integrado de Nanoestruturas e Compostos de Coordenação do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco. Soluções aquosas de CdCl₂ 0,005 mol L⁻¹ e de Na₂SeO₃ 0,25 mol L⁻¹ foram utilizadas como precursores de Cd e Se, respectivamente, e o MSA foi empregado como agente estabilizante. Todas as sínteses foram conduzidas sob atmosfera ambiente e com um volume de 100 mL da solução de CdCl₂, resultando em 0,5 mmol de Cd²⁺ no meio reacional. A adição dos demais reagentes e soluções, descritos a seguir, pode ter aumentado o volume total da reação em até aproximadamente 2%.

Quatro fatores foram selecionados para serem estudados na otimização multivariada da síntese: as razões molares de (1) MSA:Cd e de (2) Cd:Se, (3) o pH inicial e (4) a temperatura de síntese. Os valores desses fatores para cada síntese foram definidos de acordo com os planejamentos experimentais, e a quantidade de MSA e o volume da solução de Na₂SeO₃ foram calculados com base na quantidade fixada de íons Cd²⁺. NaBH₄ foi usado como agente redutor, com a razão molar NaBH₄:Se fixada em 2,5:1 com base em experimentos realizados previamente.

Para cada síntese, a solução CdCl₂ e o MSA foram adicionados a um béquer sob agitação magnética e o pH foi ajustado com uma solução de NaOH 3,0 mol L⁻¹. A solução MSA–Cd²⁺ foi

então transferida para um balão de fundo redondo de duas bocas (250 mL) sob agitação magnética vigorosa e posicionado em banho de água com temperatura controlada, permitindo variações máximas de ± 3 °C. Uma alíquota da solução de Na_2SeO_3 foi adicionada ao balão, seguida do NaBH_4 . Nesse momento, iniciou-se a contagem do tempo de reação, e o balão foi acoplado a um condensador e vedado com um septo (para as reações em temperatura maior que 30 °C) ou apenas vedado com dois septos (para as reações em temperatura menor ou igual a 30 °C). Após a síntese, as suspensões de QDs de CdSe e alíquotas retiradas foram armazenadas à temperatura ambiente (aproximadamente 30 °C) em frascos de vidro protegidos da incidência de luz.

Primeiramente, foi realizado um planejamento fatorial completo de dois níveis (2^4) com adição de três repetições apenas no ponto central, totalizando 19 sínteses realizadas em ordem aleatória. Os níveis para os fatores nesse planejamento, apresentados na Tabela 3, foram definidos com base em alguns trabalhos publicados sobre síntese aquosa *one-pot* de QDs de CdSe estabilizados com MSA [36,37,43-45,47]. Alíquotas da suspensão coloidal de CdSe foram coletadas de cada síntese nos seguintes períodos após o início da reação: 30, 45, 60, 90, 120, 180 e 240 min. Nesse primeiro planejamento experimental, o objetivo foi maximizar a intensidade de fluorescência.

Tabela 3 - Níveis variados para cada fator do planejamento fatorial completo.

Fator	Nível inferior (-1)	Ponto central (0)	Nível superior (+1)
Razão molar de MSA:Cd	2:1	4:1	6:1
Razão molar de Cd:Se	1:1	3:1	5:1
pH	5,0	8,5	12,0
Temperatura (°C)	30	60	90

Fonte: A autora.

Uma vez que a intensidade de fluorescência e a absorbância estão diretamente relacionadas à concentração de nanocristais em suspensão, de acordo com a Equação 13 descrita a seguir no subitem 2.3.3, surge então a necessidade da divisão da intensidade de fluorescência pela absorbância no mesmo comprimento de onda de excitação, para desconsiderar o efeito da densidade óptica nos resultados. Portanto, a partir deste capítulo os termos “intensidade de fluorescência” ou “intensidade de emissão” sempre estarão se referindo à razão entre a intensidade máxima de fluorescência e a absorbância no mesmo comprimento de onda de excitação (400 nm).

Com base nas condições de síntese de QDs de CdSe com a maior intensidade de emissão do planejamento fatorial 2^4 , um segundo planejamento experimental foi realizado por matriz Doehlert, cujos níveis experimentais, com seus respectivos níveis codificados entre parênteses, estão apresentados na Tabela 4. Nesta etapa, foram estudados novamente os fatores pH inicial (cinco níveis), temperatura de síntese (três níveis), e razões molares de MSA:Cd e Cd:Se (sete níveis). Alíquotas de cada suspensão coloidal de CdSe foram coletadas em 60 e 120 min após o início da reação. O erro puro foi estimado com seis repetições autênticas, três no ponto central e três nas seguintes condições: razão molar de MSA:Cd de 5:1, razão molar de Cd:Se de 9,7:1, pH 4,8 e temperatura de 25 °C. Os objetivos no planejamento Doehlert foram maximizar a intensidade de emissão e minimizar a FWHM da banda de emissão, que é calculada pela diferença entre os comprimentos de onda com intensidade de emissão igual à metade da intensidade máxima.

Tabela 4 - Níveis experimentais variados para cada fator do planejamento por matriz Doehlert, com seus respectivos níveis codificados entre parênteses

Fator	Níveis						
		(-1)	(-0,5)	(0)	(+0,5)	(+1)	
pH		3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	
Razão molar de MSA:Cd	(-0,866) 5:1	(-0,577) 6:1	(-0,289) 7:1	(0) 8:1	(+0,289) 9:1	(+0,577) 10:1	(+0,866) 11:1
Razão molar de Cd:Se	(-0,817) 4:1	(-0,613) 4,5:1	(-0,204) 5,5:1	(0) 6:1	(+0,204) 6,5:1	(+0,613) 7,5:1	(+0,817) 8:1
Temperatura (°C)			(-0,791) 15	(0) 30	(+0,791) 45		

Fonte: A autora.

O planejamento fatorial completo e todo o tratamento estatístico dos dados foram realizados utilizando-se o *software* STATISTICA[®] 12 (StatSoft, EUA), e o planejamento Doehlert foi obtido calculando-se os níveis experimentais pela Equação 1 a partir dos níveis codificados definidos na Tabela 1. O processamento dos espectros foi feito utilizando-se o *software* OriginPro[®] 8 (OriginLab, EUA) e os demais gráficos foram obtidos utilizando-se o *software* Microsoft Office Excel[®] 2013 (Microsoft Corporation, EUA).

2.3.3 Caracterização óptica, estrutural e morfológica dos *quantum dots* de CdSe

Os espectros de emissão (com comprimento de onda de excitação de 400 nm) e excitação (com comprimento de onda de emissão de 505 nm) foram obtidos utilizando-se um espectrômetro

de fluorescência PerkinElmer LS 55 (EUA) do Laboratório de Biofísica Química do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco, e os espectros de absorção UV-Visível (UV-Vis) foram coletados com um espectrofotômetro UV-Vis PerkinElmer Lambda 650 (EUA) da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco.

As medidas de absorção, emissão e excitação foram realizadas utilizando-se cubetas de quartzo apropriadas com caminho óptico de 10 mm, rigorosamente no sétimo dia após cada síntese para que a influência temporal não afetasse a interpretação dos efeitos dos fatores experimentais. Primeiramente, as amostras foram diluídas com água, no dia das análises, até que a absorbância no comprimento de onda de 400 nm fosse menor que 0,5, para evitar autoabsorção. O fator de diluição variou para amostras de suspensões coloidais sintetizadas em condições diferentes.

Os rendimentos quânticos relativos (QY, do inglês *Quantum Yield*) foram obtidos semanalmente em até 7 semanas após a síntese, utilizando-se uma solução aquosa de quinina em $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$ 0,1 mol L^{-1} como padrão de referência com QY conhecido (57,7% no comprimento de onda de excitação de 350 nm) [7]. A solução de referência foi preparada diluindo-se uma massa arbitrária de quinina em $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$ 0,1 mol L^{-1} até obter absorbância em 350 nm menor que 0,1. Da mesma forma, as amostras de QDs de CdSe foram diluídas em água até que a absorbância em 350 nm fosse menor que 0,1. Em seguida, espectros de emissão foram coletados em comprimento de onda de excitação de 350 nm e os valores de QY foram calculados utilizando-se a Equação 13 [7], onde QY é o rendimento quântico relativo, I é a intensidade de emissão integrada e A é a absorbância em 350 nm. O R subscrito se refere à solução de sulfato de quinina, e os índices de refração dos solventes foram desconsiderados, uma vez que são muito semelhantes.

$$QY = QY_R \times \frac{I}{I_R} \times \frac{A_R}{A} \times \frac{n^2}{n_R^2} \quad \text{Equação 13}$$

Espectros de absorção na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IR, do inglês *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*) foram obtidos com um espectrômetro Varian 640-IR (EUA) do Centro de Apoio à Pesquisa da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no modo de transmissão, calculando-se a média de 32 varreduras com resolução de 2 cm^{-1} no intervalo de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} . Para as medidas de FT-IR, as suspensões foram desestabilizadas, centrifugadas, secas e prensadas em KBr para formar pastilhas. O potencial

zeta foi medido com um analisador Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Reino Unido) da Central Analítica Multiusuária do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, em cubeta de vidro, e antes da análise a amostra foi lavada duas vezes com água ultrapura, mantendo-se constante a concentração da suspensão.

Os padrões de difração de raios X de pó (DRX) foram registrados com um difratômetro de raios X Siemens Nixdorf D5000 (EUA) do Laboratório Multiusuário de Nanotecnologia do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, usando radiação $\text{Cu K}\alpha$ (1,5418 Å) e varrendo o intervalo de 2θ de 10 a 60° com um passo de 0,05°. A amostra em pó para análise de DRX foi obtida pela desestabilização da suspensão coloidal concentrada de QDs de CdSe, seguida por centrifugação e secagem.

A suspensão de QDs foi filtrada, diluída em água ultrapura (proporção de 1:20), gotejada sobre uma grade de cobre de 400 mesh com filme ultrafino de carbono e, após secagem, foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HR-TEM, do inglês *High-Resolution Transmission Electron Microscopy*) com um microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai G² (EUA) operando a 200 kV, do Laboratório de Microscopia e Microanálise do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste. O tamanho dos QDs foi obtido pelas micrografias em campo claro, calculando-se a média do diâmetro de 500 nanocristais de CdSe medidos com o *software* ImageJ 1.50e (NIH, EUA).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Tratamento estatístico dos resultados dos planejamentos experimentais

As intensidades de emissão dos QDs de CdSe obtidos pelas sínteses do planejamento fatorial completo variaram substancialmente devido à grande variação nos níveis estudados para os fatores, conforme pode-se verificar na Tabela 5. Enquanto alguns QDs tiveram intensidade de emissão com valor próximo de zero, outros apresentaram resultados de até 1622 u. a. (unidades arbitrárias). Para cada síntese do planejamento fatorial 2⁴, foi calculada a média das intensidades de emissão das sete alíquotas coletadas. As variações de intensidade de emissão com o tempo de síntese das quatro sínteses com maiores médias de intensidades de emissão podem ser verificadas no Apêndice A.

Tabela 5 - Condições experimentais e resultados das sínteses do planejamento fatorial completo 2^4 com tempo de agitação de 120 min.

Síntese	Razão molar de MSA: Cd	Razão molar de Cd: Se	pH	Temperatura (°C)	Intensidade de emissão (u. a.)	λ_{abs} (nm)	λ_{ems} (nm)
18	2:1	1:1	5,0	30	244	449	607
5	6:1	1:1	5,0	30	4	497	634
20	2:1	5:1	5,0	30	833	439	570
8	6:1	5:1	5,0	30	1622	422	518
15	2:1	1:1	12,0	30	127	-	566
13	6:1	1:1	12,0	30	0	-	-
12	2:1	5:1	12,0	30	780	-	510
10	6:1	5:1	12,0	30	19	-	632
16 (C)	4:1	3:1	8,5	60	3	541	629
17 (C)	4:1	3:1	8,5	60	4	541	632
23 (C)	4:1	3:1	8,5	60	1	540	633
9	2:1	1:1	5,0	90	7	422	582
11	6:1	1:1	5,0	90	0	-	-
14	2:1	5:1	5,0	90	11	459	634
6	6:1	5:1	5,0	90	921	438	564
22	2:1	1:1	12,0	90	2	310	460
7	6:1	1:1	12,0	90	0	-	-
21	2:1	5:1	12,0	90	6	310	637
19	6:1	5:1	12,0	90	1	429	459

Fonte: A autora.

Para as suspensões das sínteses 8, 18 e 20, que foram realizadas à temperatura ambiente, a intensidade de emissão não variou muito com o tempo, apenas com um pequeno aumento da resposta em 120 min para a síntese 20. Por outro lado, as intensidades de emissão das suspensões da síntese 6, realizada a 90 °C, diminuiriam bastante com o aumento do tempo de aquecimento. Portanto, por haver a tendência em obter melhores resultados para sínteses sem aquecimento, o tempo de síntese escolhido para o tratamento de dados foi de 120 min, priorizando os resultados das sínteses 8, 18 e 20.

A estimativa do erro padrão para os efeitos do planejamento fatorial completo foi 0,76, calculado a partir de três repetições autênticas do ponto central. Esse erro multiplicado pelo valor crítico de t de Student com 2 graus de liberdade foi usado para decidir se um efeito é significativo ou não. Contudo, a estimativa do erro padrão foi muito baixa comparada com algumas intensidades de emissão, conforme apresentado na Tabela 5, o que sugere que esse erro é uma subestimativa para maiores intensidades de emissão. Portanto, optou-se apenas por selecionar as melhores condições desse planejamento experimental para guiar o planejamento Doehlert, ao invés de

discutir os efeitos dos fatores significativos nesta etapa. Para uma melhor compreensão, as estimativas dos efeitos podem ser verificadas na Tabela 6.

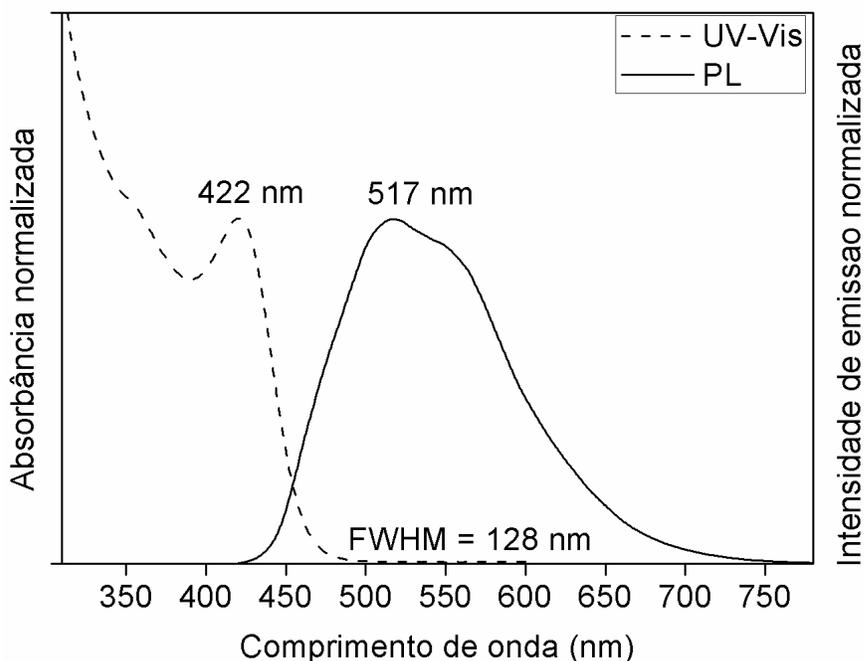
Tabela 6 - Estimativa dos efeitos lineares principais e das interações dos fatores, para os resultados de intensidade de emissão de *quantum dots* de CdSe obtidos pelo planejamento fatorial completo 2^4 , com tempo de agitação de 120 min.

Fator	Efeito	Erro padrão x t	Limite de confiança inferior (-95%)	Limite de confiança superior (+95%)
Média	241,32	1,64	239,68	242,96
(1) Razão molar de MSA:Cd	69,62	3,27	66,35	72,89
(2) Razão molar de Cd:Se	476,12	3,27	472,85	479,39
(3) pH	-338,38	3,27	-341,65	-335,11
(4) Temperatura	-335,12	3,27	-338,39	-331,85
1x2	163,62	3,27	160,35	166,89
1x3	-293,38	3,27	-296,65	-290,11
1x4	154,38	3,27	151,11	157,65
2x3	-306,88	3,27	-310,15	-303,61
2x4	-243,62	3,27	-246,89	-240,35
3x4	105,88	3,27	102,61	109,15
1x2x3	-322,88	3,27	-326,15	-319,61
1x2x4	64,88	3,27	61,61	68,15
1x3x4	65,88	3,27	62,61	69,15
2x3x4	76,88	3,27	73,61	80,15

Fonte: A autora.

As maiores intensidades de emissão foram obtidas para os QDs sintetizados a 30 °C e pH 5,0, com razões molares de MSA:Cd e Cd:Se de 6:1 e 5:1, respectivamente. Como essa síntese foi realizada a temperatura ambiente (~30 °C), a intensidade de emissão e as posições das bandas de absorção e de emissão não variaram muito com o tempo de síntese. A maior intensidade de emissão (1622 u. a.) foi obtida para a alíquota coletada em 120 min após o início da reação, a qual apresentou primeiro máximo de absorção em 422 nm, intensidade máxima de emissão em 518 nm e FWHM da banda de emissão de 128 nm. Os espectros normalizados de absorção e de emissão dessa suspensão coloidal de QDs de CdSe são apresentados na Figura 11.

Figura 11 - Espectros de absorção (UV-Vis) e emissão (PL) ($\lambda_{exc} = 400$ nm) da suspensão de *quantum dots* de CdSe estabilizados com MSA obtidos nas seguintes condições: razão molar de MSA:Cd 6:1, razão molar de Cd:Se 5:1, pH 5,0, temperatura de 30 °C e tempo de agitação de 120 min.



Um planejamento Doehlert foi delineado para os quatro fatores explorados anteriormente, centrado em níveis próximos daqueles que levaram à maior intensidade de emissão do planejamento fatorial 2^4 . Inicialmente, para verificar a influência do tempo de reação, as estimativas dos efeitos foram calculadas para os seguintes fatores e interações secundárias: razões molares de MSA:Cd e Cd:Se, temperatura, pH e tempo de agitação. Contudo, o efeito linear do tempo e os efeitos das interações do tempo com os demais fatores não foram estatisticamente significativos para a intensidade de emissão e a FWHM da banda de emissão, com nível de confiança de 95%. Portanto, os resultados das alíquotas com o menor tempo de agitação (60 min) foram selecionados para o tratamento completo de dados (Tabela 7), uma vez que as respostas não diferiram estatisticamente com o tempo de agitação.

Tabela 7 - Condições experimentais e resultados das sínteses do planejamento Doehlert, com tempo de agitação de 60 min.

Síntese	Razão molar de MSA:Cd	Razão molar de Cd:Se	pH	Temperatura (°C)	Intensidade de emissão (u. a.)	λ_{abs} (nm)	λ_{ems} (nm)	FWHM (nm)
44	5:1	6:1	4,0	30	75	452	595	146
27	5:1	6:1	6,0	30	322	456	587	143
47	5,1:1	9,7:1	4,8	25	2518	419	511	127
50	5,1:1	9,7:1	4,8	25	2625	418	511	126
51	5,1:1	9,7:1	4,8	25	2543	417	510	127
29	6:1	6,5:1	5,0	45	2046	416	511	127
43	6:1	8:1	5,0	30	2725	413	504	125
49	6:1	8:1	5,0	30	2745*	411*	503*	125*
52	6:1	8:1	5,0	30	2789*	410*	501*	125*
31	7:1	4:1	4,0	30	77	443	578	145
45	7:1	4:1	6,0	30	113	473	614	140
42	7:1	5,5:1	4,0	15	124	433	576	145
40	7:1	5,5:1	6,0	15	464	450	581	143
39	8:1	4,5:1	5,0	45	2114	420	512	128
33	8:1	6:1	3,0	30	0	470	-	-
30 (C)	8:1	6:1	5,0	30	2518	415	507	125
34 (C)	8:1	6:1	5,0	30	2241	413	506	126
41 (C)	8:1	6:1	5,0	30	2550	414	505	124
35	8:1	6:1	7,0	30	45	486	617	142
36	8:1	7,5:1	5,0	15	1583	418	513	127
25	9:1	6,5:1	4,0	45	88	429	573	146
26	9:1	6,5:1	6,0	45	715	443	573	142
24	9:1	8:1	4,0	30	90	432	574	147
37	9:1	8:1	6,0	30	1356	437	560	138
46	10:1	4:1	5,0	30	2265	418	511	126
38	10:1	5,5:1	5,0	15	2184	414	506	125
28	11:1	6:1	4,0	30	65	436	577	146
32	11:1	6:1	6,0	30	856	440	568	141

*Replicatas obtidas sob condições otimizadas, após o tratamento estatístico dos dados, e, portanto, esses resultados não foram considerados na estimativa dos efeitos e nos cálculos da ANOVA.

Fonte: A autora.

Os efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) de cada fator (razões molares de MSA:Cd e Cd:Se, temperatura e pH) e as interações entre cada dois fatores foram calculadas para a intensidade de emissão e a FWHM da banda de emissão. Os efeitos, o erro padrão multiplicado pelo t de Student com 2 graus de liberdade e os limites de confiança estão apresentados para a intensidade de emissão e FWHM nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

Tabela 8 - Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos principais e das interações dos fatores, para os resultados de intensidade de emissão de *quantum dots* de CdSe obtidos pelo planejamento Doehlert, com tempo de agitação de 60 min.

Fator	Efeito	Erro padrão x t	Limite de confiança inferior (-95%)	Limite de confiança superior (+95%)
Média	2470,02	192,95	2277,07	2662,97
(1) pH (L)	683,62	314,97	368,65	998,59
pH (Q)	-4894,51	630,39	-5524,90	-4264,11
(2) Razão molar de MSA:Cd (L)	278,48	262,78	15,70	541,26
Razão molar de MSA:Cd (Q)	-3057,41	472,60	-3530,01	-2584,81
(3) Razão molar de Cd:Se (L)	320,35	247,80	72,54	568,15
Razão molar de Cd:Se (Q)	-1201,79	406,15	-1607,94	-795,64
(4) Temperatura (L)	132,88	246,47	-113,59	379,35
Temperatura (Q)	-1256,65	355,06	-1611,71	-901,60
1x2	562,91	703,60	-140,69	1266,50
1x3	1030,98	741,95	289,03	1772,92
1x4	-166,20	747,09	-913,29	580,89
2x3	-4063,98	614,36	-4678,33	-3449,62
2x4	-2376,35	642,69	-3019,04	-1733,66
3x4	-868,72	592,30	-1461,02	-276,42

Fonte: A autora.

Tabela 9 - Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos principais e das interações dos fatores, para os resultados de FWHM da banda de emissão de *quantum dots* de CdSe obtidos pelo planejamento Doehlert, com tempo de agitação de 60 min.

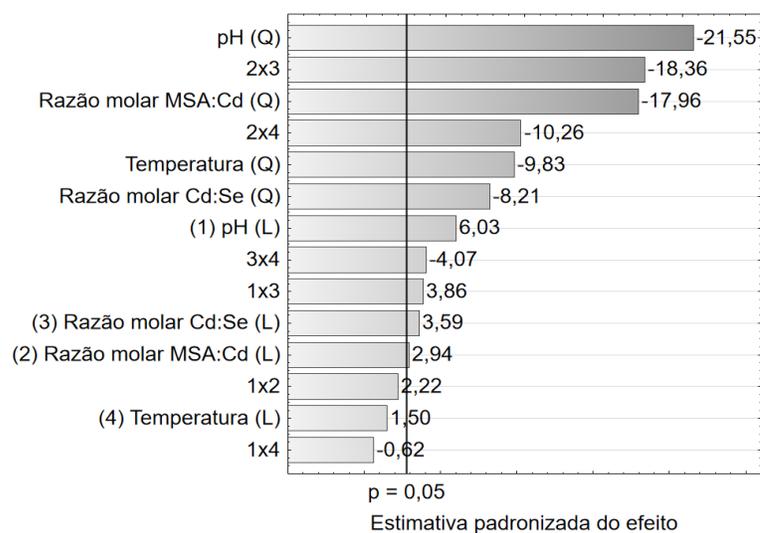
Fator	Efeito	Erro padrão x t	Limite de confiança inferior (-95%)	Limite de confiança superior (+95%)
Média	125,62	1,20	124,42	126,81
(1) pH (L)	8,96	2,18	6,78	11,13
pH (Q)	23,83	3,25	20,57	27,08
(2) Razão molar de MSA:Cd (L)	-0,72	2,02	-2,75	1,30
Razão molar de MSA:Cd (Q)	26,52	3,22	23,30	29,73
(3) Razão molar de Cd:Se (L)	-1,71	1,98	-3,69	0,27
Razão molar de Cd:Se (Q)	10,25	2,65	7,59	12,90
(4) Temperatura (L)	0,34	1,99	-1,64	2,33
Temperatura (Q)	8,30	2,30	6,00	10,60
1x2	-1,31	3,40	-4,70	2,09
1x3	-2,68	3,58	-6,26	0,90
1x4	-0,47	3,61	-4,07	3,14
2x3	30,91	4,19	26,71	35,10
2x4	25,66	4,26	21,39	29,92
3x4	13,97	3,87	10,10	17,84

Fonte: A autora.

As estimativas dos efeitos padronizadas pelos seus respectivos erros padrão estão representadas nos gráficos de Pareto das Figuras 12 e 13 para a intensidade de emissão e a FWHM,

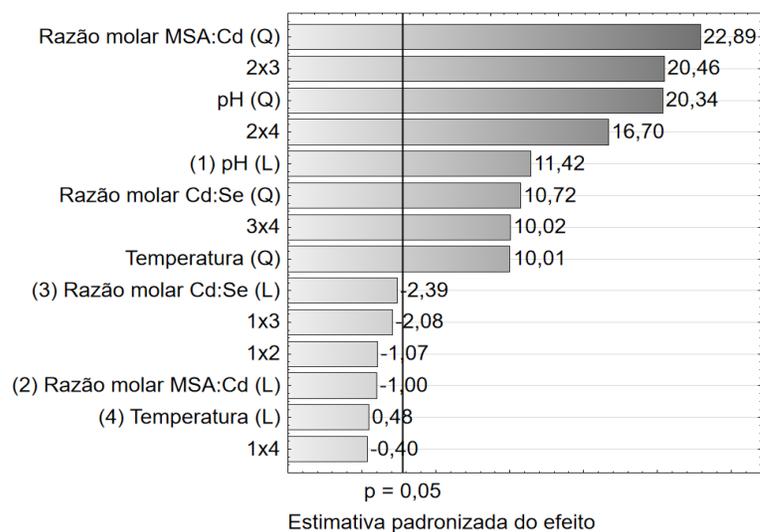
respectivamente. O intervalo de confiança para cada efeito é dado pelo efeito $\pm t_v \times s_{efeito}$, onde s_{efeito} é a estimativa do erro padrão do efeito e t_v é o valor crítico de t de Student com v graus de liberdade. Uma vez que os valores nos gráficos de Pareto correspondem aos efeitos divididos por seus erros padrão, esses valores devem ser comparados apenas com o valor de t_4 , que é 2,776 com nível de confiança de 95%: aqueles efeitos padronizados maiores que 2,776 serão significativos a 95% de confiança.

Figura 12 - Gráfico de Pareto das estimativas padronizadas dos efeitos, para os resultados de intensidade de emissão de *quantum dots* de CdSe obtidos pelo planejamento Doehlert.



Fonte: A autora.

Figura 13 - Gráfico de Pareto das estimativas padronizadas dos efeitos, para os resultados de FWHM da banda de emissão de *quantum dots* de CdSe obtidos pelo planejamento Doehlert.



Fonte: A autora.

Apenas o efeito linear da temperatura e as interações do pH com a razão molar de MSA:Cd (1x2) e com a temperatura (1x4) não foram estatisticamente significativos para a intensidade de emissão, a um nível de confiança de 95%. Além desses três efeitos, os efeitos lineares da razão molar de MSA:Cd e temperatura e a interação do pH com a razão molar de Cd:Se (1x3) também não foram significativos para a FWHM da banda de emissão, no nível de confiança estudado.

Os efeitos quadráticos dos quatro fatores estudados foram estatisticamente significativos para a intensidade de emissão e a FWHM, a um nível de confiança de 95%, o que está associado à existência de condições críticas nas superfícies de resposta. Os efeitos quadráticos dos fatores razões molares de MSA:Cd e Cd:Se, pH e temperatura foram todos negativos para a intensidade de emissão, o que corresponde a um ponto de máximo para essa resposta. Por outro lado, os quatro efeitos quadráticos foram positivos para a FWHM, o que indica que há um ponto de mínimo na superfície de resposta.

A melhor forma de estabelecer as condições experimentais ótimas é utilizando-se gráficos de superfície de resposta, uma vez que efeitos quadráticos e algumas interações foram significativos. As superfícies de resposta foram obtidas usando a Equação 14 para a intensidade de emissão (adimensional) e a Equação 15 para a FWHM da banda de emissão (dada em nm), onde x_1 , x_2 , x_3 e x_4 correspondem, respectivamente, aos valores codificados de pH, razão molar de MSA:Cd, razão molar de Cd:Se e temperatura (°C). Os coeficientes dessas equações foram calculados com os resultados das sínteses do planejamento Doehlert, desconsiderando os termos correspondentes aos efeitos não-significativos a nível de confiança de 95%, e os erros padrão estão escritos abaixo de seus respectivos termos.

$$\begin{aligned}
 \text{Intensidade de emissão} = & \frac{2467,7}{69,4} + \frac{341,7x_1}{56,7} - \frac{2445,0x_1^2}{113,5} + \frac{159,3x_2}{54,6} - \frac{2036,1x_2^2}{113,4} + \\
 & \frac{197,5x_3}{54,6} - \frac{899,6x_3^2}{109,6} - \frac{1001,9x_4^2}{102,1} + \frac{742,8x_1x_3}{150,6} - \frac{2867,1x_2x_3}{156,2} - \frac{1732,6x_2x_4}{169,0} - \\
 & \frac{676,2x_3x_4}{165,0}
 \end{aligned}
 \tag{Equação 14}$$

$$\begin{aligned}
 \text{FWHM (nm)} = & \frac{125,5}{0,4} - \frac{4,6x_1}{0,5} + \frac{21,1x_1^2}{1,0} + \frac{17,6x_2^2}{0,8} + \frac{7,7x_3^2}{0,7} + \frac{6,6x_4^2}{0,7} + \frac{21,8x_2x_3}{1,1} + \frac{18,7x_2x_4}{1,1} + \\
 & \frac{10,9x_3x_4}{1,1}
 \end{aligned}
 \tag{Equação 15}$$

A qualidade dos modelos ajustados foi avaliada pela aplicação da análise de variância (ANOVA, do inglês *Analysis Of Variance*) às respostas experimentais e estimadas de intensidade de emissão e FWHM, e os resultados estão apresentados nas Tabelas 10 e 11 [49].

Tabela 10 - Análise de variância para a equação polinomial obtida para estimar a intensidade de emissão de *quantum dots* de CdSe.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática
Regressão	28467110	11	2587919
Resíduos	914305	14	65308
Falta de ajuste	849889	10	84989
Erro puro	64416	4	16104
Total	29381415	25	1175257

Fonte: A autora.

Tabela 11 - Análise de variância para a equação polinomial obtida para estimar a FWHM da banda de emissão de *quantum dots* de CdSe.

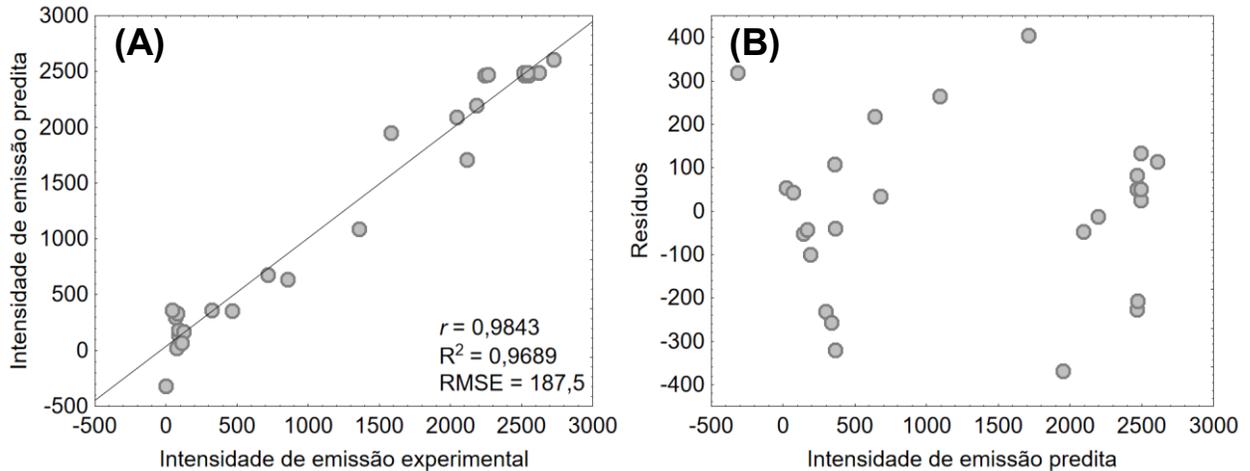
Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática
Regressão	1944,82	8	243,10
Resíduos	27,02	16	1,69
Falta de ajuste	24,36	12	2,03
Erro puro	2,67	4	0,67
Total	1971,84	24	82,16

Fonte: A autora.

Testes F foram realizados com os resultados da ANOVA para avaliar as significâncias estatísticas da regressão (F_{Reg}) e da falta de ajuste (F_{faj}) [49]. Os valores de F_{Reg} foram calculados dividindo-se a média quadrática da regressão pela média quadrática do erro residual, resultando em 39,6 e 143,9 para a intensidade de emissão e a FWHM, respectivamente. Esses dois valores foram maiores que $F_{crítico}$ a 95% de confiança, que é 2,6 com 11 e 14 graus de liberdade para a intensidade de emissão e 2,6 com 8 e 16 graus de liberdade para a FWHM. Isso indica que as Equações 14 e 15 são estatisticamente significativas a um nível de confiança de 95%. Por outro lado, não houve evidência estatística de falta de ajuste dos modelos, pois os valores de F_{faj} obtidos para intensidade de emissão e FWHM, 5,3 e 3,0, respectivamente, foram menores que $F_{crítico}$ a 95% de confiança, que é 6,0 com 10 e 4 graus de liberdade para intensidade de emissão e 5,9 com 12 e 4 graus de liberdade para FWHM. Os valores de F_{faj} foram calculados dividindo-se a média quadrática da falta de ajuste pela média quadrática do erro puro.

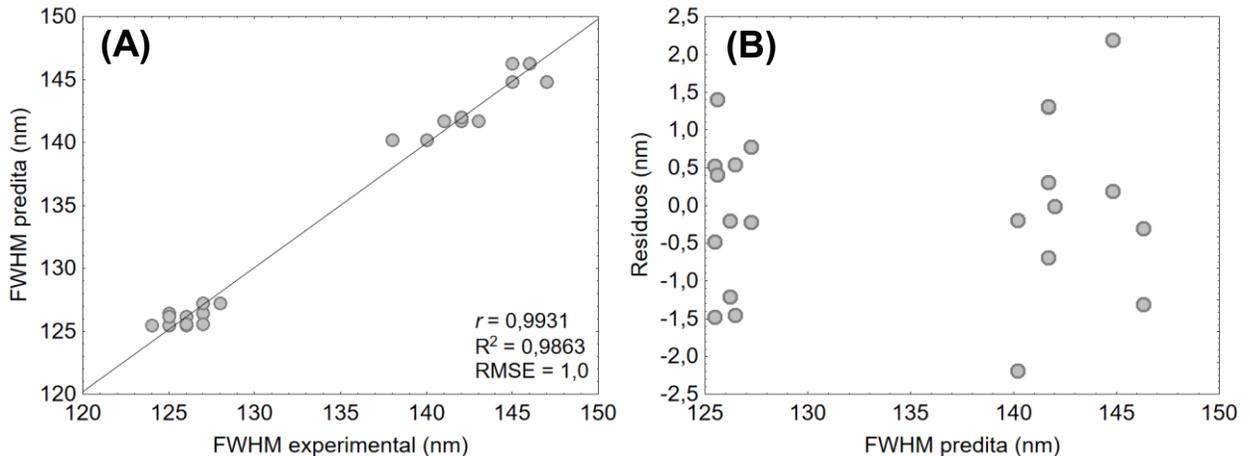
O ajuste das Equações 14 e 15 também pode ser verificado graficamente, pelos gráficos de correlação entre as respostas previstas e as respostas experimentais (Figuras 14-A e 15-A), bem como pelo gráfico de resíduos deixados pelas equações (Figura 14-B e 15-B).

Figura 14 - (A) Gráfico de correlação entre os valores de intensidade de emissão preditos pela Equação 14 em função dos valores experimentais e **(B)** distribuição dos resíduos em função dos valores de intensidade de emissão preditos.



Fonte: A autora.

Figura 15 - (A) Gráfico de correlação entre os valores de FWHM preditos pela Equação 15 em função dos valores experimentais e **(B)** distribuição dos resíduos em função dos valores de FWHM preditos.



Fonte: A autora.

Nos gráficos de correlação, pode-se observar que as respostas estimadas têm alta correlação com as respostas experimentais, com coeficientes de correlação (r) iguais a 0,9843 e 0,9931 para a intensidade de emissão e a FWHM, respectivamente. Além disso, os resíduos estão aleatoriamente distribuídos numa amplitude de aproximadamente ± 400 para intensidade de emissão e $\pm 2,5$ nm para a FWHM da banda de emissão, resultando em baixos valores da raiz do erro médio quadrático (RMSE, do inglês *Root Mean Square Error*) de 187,5 e 1,0 nm para intensidade de emissão e FWHM, respectivamente.

Como as regressões foram significativas e não houve falta de ajuste, pode-se concluir que as Equações 14 e 15 estão validadas para (i) estimar os resultados de intensidade de emissão e de

FWHM, dentro do domínio experimental estabelecido na Tabela 4, e para (ii) plotar as superfícies de resposta.

2.4.2 Superfícies de resposta e efeitos dos fatores estudados sobre a intensidade de emissão e a FWHM da banda de emissão de *quantum dots* de CdSe

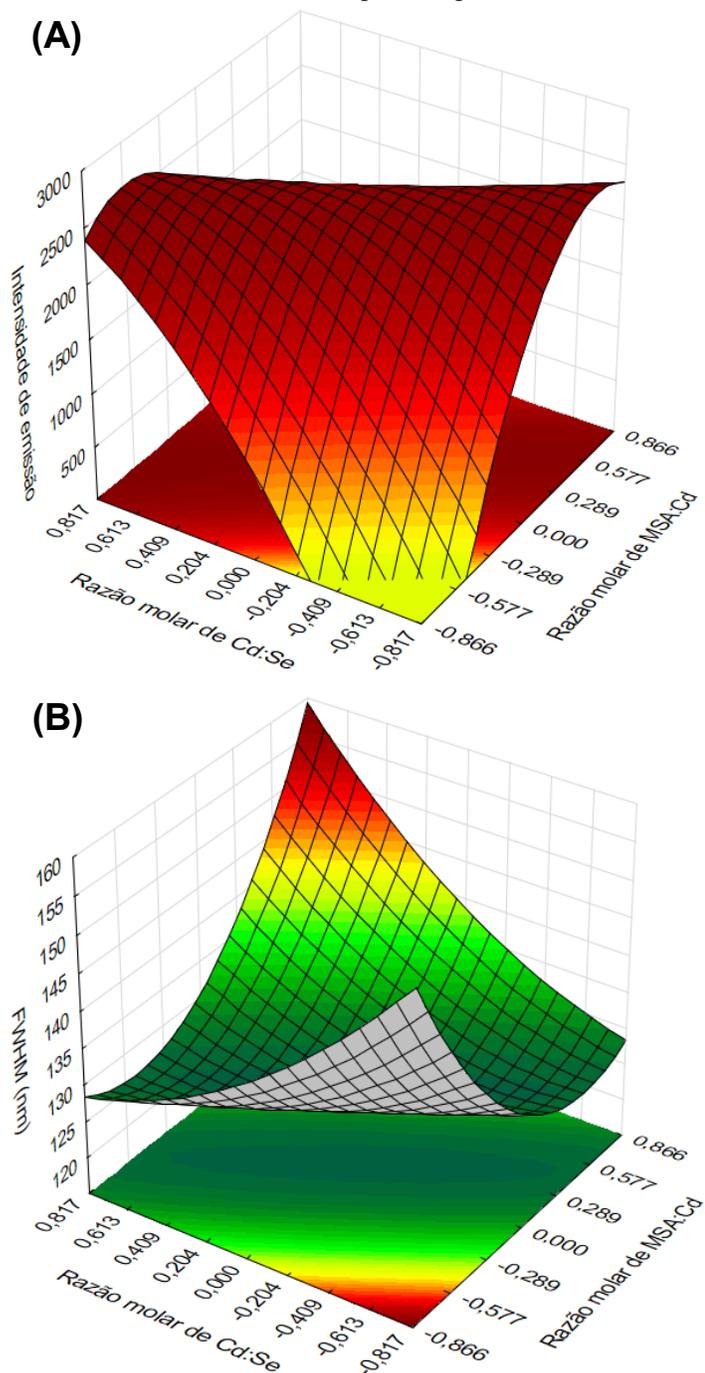
Como a superfície de resposta é uma representação gráfica tridimensional e uma das dimensões foi utilizada para representar a resposta, somente dois fatores poderão ser representados em cada gráfico. Em ambas as respostas sob estudo, a interação entre as razões molares de MSA:Cd e Cd:Se (2x3) teve o maior efeito em comparação com as outras interações. Portanto, as primeiras superfícies de resposta serão apresentadas e discutidas em função desses dois fatores, enquanto que os valores de pH e temperatura foram fixados nos níveis centrais, que são 5,0 e 30 °C, respectivamente.

As superfícies de resposta para a intensidade de emissão e a FWHM de QDs de CdSe em função das razões molares de MSA:Cd e Cd:Se estão representadas na Figura 16, onde pode-se observar o aumento da intensidade de emissão e a diminuição da FWHM com maiores razões molares de MSA:Cd e menores razões molares de Cd:Se (ou vice-versa). Contudo, a região de maior intensidade de emissão está centrada aproximadamente na razão molar de MSA:Cd de 6:1 e na razão molar de Cd:Se entre 7,5:1 e 8:1, condições experimentais que também levam à diminuição da FWHM. Portanto, as razões molares de MSA:Cd de 6:1 e Cd:Se de 8:1 podem ser estabelecidas como condições ótimas para ambas as respostas estudadas.

O estabelecimento das condições ótimas graficamente só foi possível devido à semelhança entre as condições que proporcionam as respostas ótimas com os dois objetivos: maximização da intensidade de emissão e minimização da FWHM. A intensidade de emissão e a FWHM estão alta e inversamente correlacionadas, com r igual a -0,9675, conforme pode ser verificado na Figura 17-A. Um dos grandes causadores de alargamento da banda de emissão é a presença de defeitos nos nanocristais de CdSe, que causam, principalmente, processos de decaimentos radiativos mediados por defeitos e, em menores proporções, recombinação excitônica com baixo rendimento quântico. Por essas razões, a intensidade de emissão, em geral, foi menor para os QDs de CdSe com maiores FWHM. Além disso, o comprimento de onda do primeiro máximo de absorção está diretamente relacionado ao tamanho do cristal, o que permite inferir, pelo gráfico da

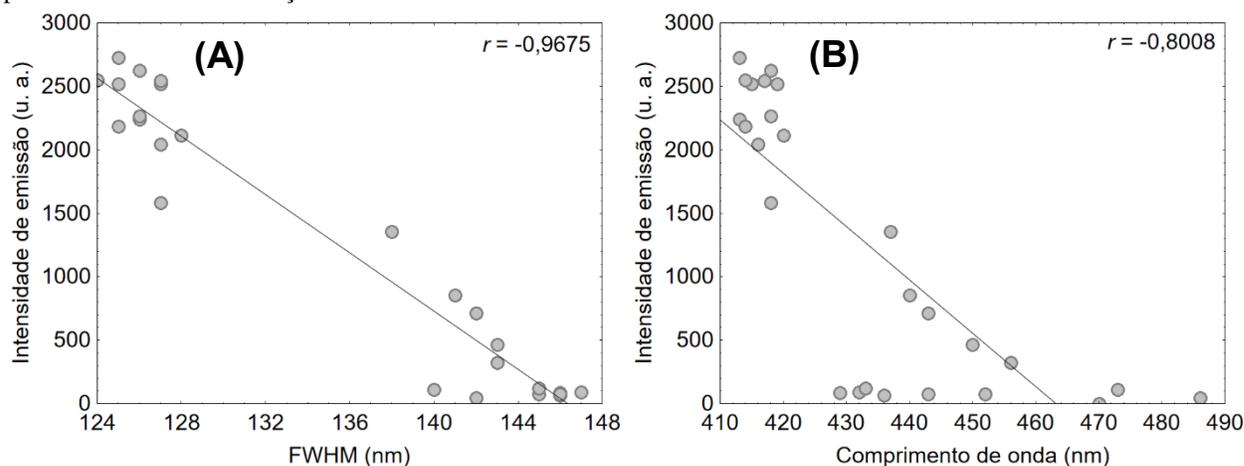
Figura 17-B, que houve também uma tendência de aumento da intensidade de emissão dos QDs de CdSe com a diminuição do diâmetro dos nanocristais (que é evidenciado pela diminuição do comprimento de onda de absorção).

Figura 16 - Superfícies de resposta de (A) intensidade de emissão e (B) FWHM de *quantum dots* de CdSe em função da razão molar de MSA:Cd e da razão molar de Cd:Se, com pH e temperatura fixados em 5,0 e 30 °C, respectivamente.



Fonte: A autora.

Figura 17 - Gráficos de correlação **(A)** entre FWHM e intensidade de emissão e **(B)** entre o comprimento de onda do primeiro máximo de absorção dos nanocristais e intensidade de emissão.



Fonte: A autora.

A síntese coloidal de QDs se baseia no fenômeno de maturação ou envelhecimento de Ostwald, que envolve dois estágios [36,47]. Inicialmente, pequenos núcleos de CdSe são formados na etapa de nucleação e, portanto, essa etapa é decisivamente influenciada pela disponibilidade dos precursores de Cd e Se. Na etapa posterior, o crescimento, alguns nanocristais tendem a crescer em detrimento dos núcleos menores e menos estáveis, que decrescem até se extinguir.

Para uma quantidade fixa de Cd, como nas sínteses do presente trabalho, quanto maior a razão molar de Cd:Se, menor será a quantidade do precursor de Se e, portanto, menos núcleos de CdSe serão formados na etapa de nucleação, levando a maior disponibilidade de íons Cd^{2+} para a etapa de crescimento. Além disso, provavelmente haverá uma maior quantidade de sítios de Cd na superfície do nanocristal para se ligar às moléculas de MSA, minimizando defeitos de superfície pela formação de uma camada fina de CdS [38,45]. Assim, maiores razões molares de Cd:Se proporcionam a formação de nanocristais com maiores intensidades de emissão e menores FWHM da banda de emissão.

O aumento da razão molar de MSA:Cd, por sua vez, contribui para a passivação efetiva dos defeitos de superfície pelo aumento de MSA disponível para se ligar aos sítios de Cd na superfície do nanocristal [36]. Além disso, os grupos carboxilato das moléculas de MSA em torno dos nanocristais em suspensão ficam voltados para a parte externa, o que é responsável pela estabilização dos QDs em fase aquosa [48]. Contudo, verifica-se pelas superfícies de resposta da Figura 16 que o aumento da intensidade de emissão e a diminuição da FWHM ocorreram em menores razões molares de MSA:Cd e maiores razões molares de Cd:Se.

Com o aumento da razão molar de MSA:Cd, mais complexos MSA-Cd⁺ são formados e menos íons Cd²⁺ livres estarão disponíveis para a formação inicial dos núcleos de CdSe. Conseqüentemente, novos núcleos ainda serão formados pela decomposição dos complexos MSA-Cd⁺ enquanto os núcleos inicialmente formados progridem para a etapa de crescimento, o que causa heterogeneidade na distribuição de tamanho de partícula [50]. Esse processo leva ao alargamento das bandas de absorção e de emissão e à diminuição da intensidade de emissão, o que está em concordância com os resultados obtidos para as sínteses realizadas com a maior razão molar de MSA:Cd do planejamento Doehlert.

Menores razões molares de MSA:Cd com maiores razões molares de Cd:Se aumentam a disponibilidade de íons Cd²⁺ para a etapa de nucleação e preservam o equilíbrio de crescimento e dissolução de Ostwald [50]. Essa condição contribui para a monodispersão de tamanhos dos QDs, levando a espectros de absorção estreitos e à conseqüente melhoria das propriedades fotoluminescentes.

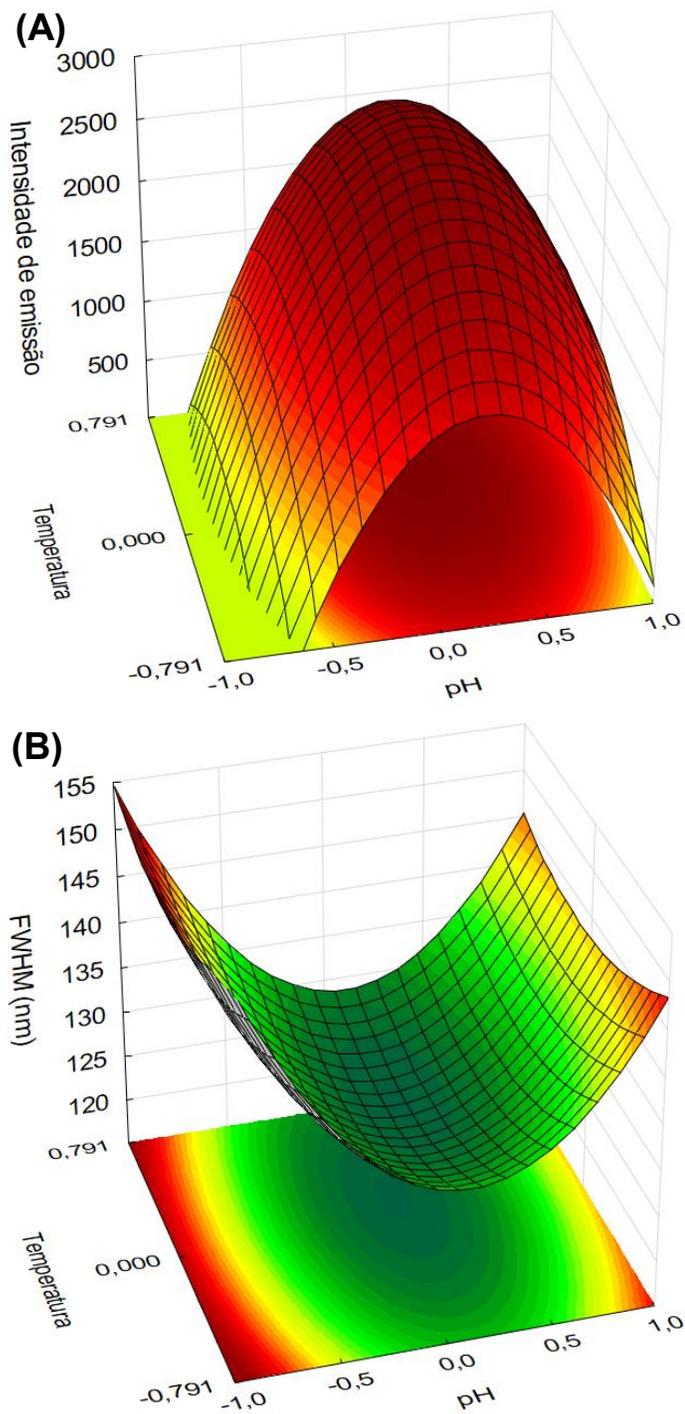
As superfícies de resposta da intensidade de emissão e FWHM em função de pH e temperatura estão apresentadas na Figura 18, onde os pontos críticos de máxima intensidade de emissão e mínima FWHM da banda de emissão são claramente observadas em torno do pH 5,0 e de temperaturas entre 30 e 35 °C. Para a elaboração desses gráficos, as razões molares de MSA:Cd e Cd:Se foram fixadas nas melhores condições estabelecidas (6:1 e 8:1, respectivamente).

Swayambunathan e colaboradores observaram que, em pH levemente ácido, os tióis interagem mais fortemente com partículas de CdS do que com íons Cd²⁺ livres [51], havendo então uma quantidade maior de Cd²⁺ disponível para a nucleação, crescimento e posterior melhoramento da superfície do nanocristal. O mesmo raciocínio se aplica aos nanocristais de CdSe, resultando na passivação dos defeitos de superfície e, conseqüentemente, melhores propriedades fotoluminescentes.

A influência do pH nas respostas em estudo está diretamente relacionada ao agente estabilizante utilizado nas sínteses dos QDs de CdSe. A molécula de MSA tem dois grupos carboxila ($pK_{a1} = 3,30$ e $pK_{a2} = 4,94$) e um grupo tiol ($pK_{a3} = 10,64$) na sua cadeia (Figura 19-A), e pode agir como ligante mono-, bi- ou tridentado e formar quelatos com diferentes íons metálicos [52,53]. Enquanto os agentes estabilizantes mais utilizados na síntese coloidal hidrofílica de QDs requerem pH básico, tais como os ácidos tioglicólico (TGA) e mercaptopropiônico (MPA),

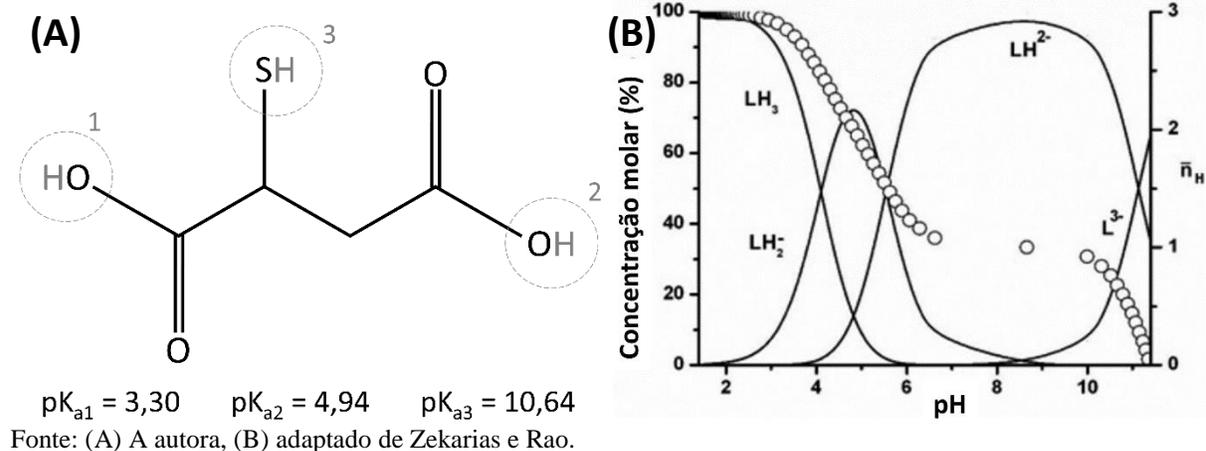
o MSA pode ser utilizado como estabilizante tanto em pH básico como em pH levemente ácido, principalmente por causa da presença de dois grupos carboxila em sua estrutura [37,54].

Figura 18 - Superfícies de resposta de (A) intensidade de emissão e (B) FWHM de *quantum dots* de CdSe em função do pH e da temperatura, com as razões molares de MSA:Cd e Cd:Se fixadas em 6:1 e 8:1, respectivamente.



Fonte: A autora.

Figura 19 - (A) Estrutura química do ácido mercaptossuccínico. (B) Função de formação (o) e diagramas de distribuição (linhas contínuas) de espécies de MSA protonadas e desprotonadas em mistura 40% v/v de dioxano em água.



Outro aspecto a ser destacado é que o grupo tiol perde facilmente seu próton na presença de alguns metais, mesmo em pH ácido, formando mercaptanas estáveis. Dessa forma, ocorre a quimissorção do MSA na superfície do metal em pH levemente ácido quando apenas o grupo carboxila mais próximo do grupo tiol está desprotonado. O outro grupo carboxila, que continua protonado, forma ligações de hidrogênio com grupos carboxila de moléculas de MSA vizinhas, compondo uma monocamada estável que recobre o nanocristal de CdSe e diminui defeitos de superfície [55]. Contudo, essa monocamada de recobrimento não afeta significativamente o tamanho da nanopartícula e o perfil de absorção e não pode ser distinguida nas imagens de HR-TEM [2,48].

No presente trabalho, o pH 5,0 proporcionou os melhores resultados de intensidade de emissão e FWHM porque, nesse pH, a concentração relativa de espécies de MSA em equilíbrio consiste predominantemente de moléculas com um ânion carboxilato e um grupo carboxila protonado (representadas por LH_2^- na Figura 19-B) e, em menor concentração, de moléculas com dois ânions carboxilato (representadas por LH^{2-} na Figura 19-B) [56]. Esse comportamento ajuda a passivação da superfície de CdSe contra defeitos por ligações de hidrogênio entre os grupos carboxila protonados mais distantes do grupo tio das moléculas de MSA. Por outro lado, a concentração relativa de MSA completamente protonado (representado por LH_3 na Figura 19-B) aumenta em pH menor que 5,0 [56], não havendo cargas na superfície dos nanocristais para conferir estabilidade coloidal. Por essa razão, as suspensões coloidais sintetizadas em pH 3,0 e 4,0 formaram um precipitado branco, atribuído principalmente à protonação do MSA.

O aumento da temperatura de síntese provoca o aumento das velocidades de nucleação e crescimento dos nanocristais de CdSe, levando ao crescimento desordenado. Consequentemente, são formados QDs com maior distribuição de tamanho e maior concentração de defeitos de superfície, inferidos pelo alargamento da banda de emissão e diminuição da intensidade de emissão [43,48]. Por essas razões, as sínteses conduzidas à temperatura ambiente (30 °C), sem aquecimento e refluxo, apresentaram os melhores resultados no presente estudo.

Em suma, as melhores condições experimentais obtidas na otimização multivariada para a síntese *one-pot* de QDs de CdSe estabilizados com MSA são razões molares de MSA:Cd de 6:1 e Cd:Se de 8:1, pH 5,0 e temperatura de 30 °C (temperatura ambiente), com agitação por um período de 60 min. A caracterização dos QDs obtidos sob essas condições está apresentada no próximo subitem.

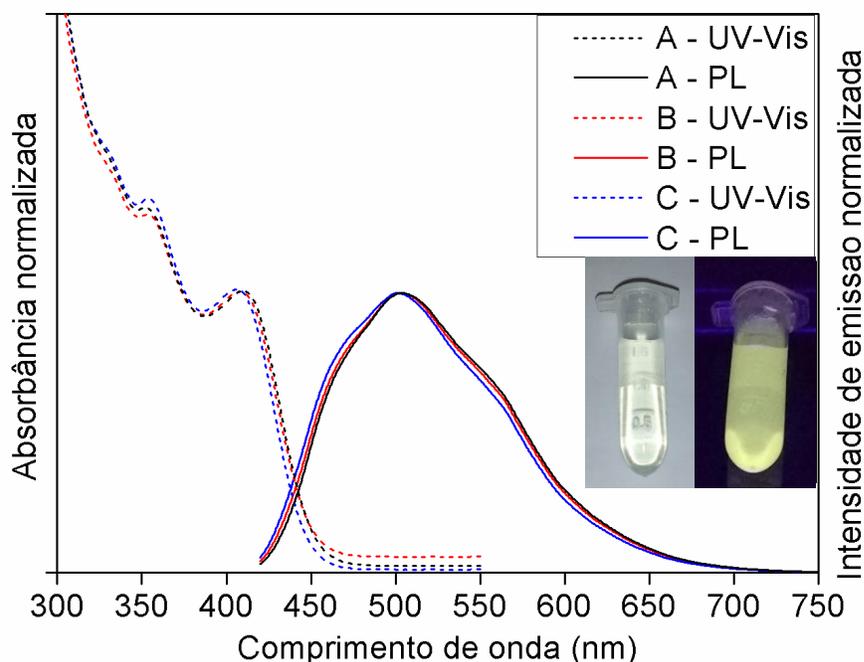
Embora as condições mencionadas acima levem à máxima intensidade de emissão e à mínima FWHM da banda de emissão dentro do domínio experimental estudado, respostas similares a essas podem ser obtidas sob condições experimentais na área de platô da Figura 16, tais como as razões molares de MSA:Cd de 8:1 e Cd:Se de 6:1, desde que a temperatura e o pH sejam fixados em 30 °C e 5,0, respectivamente. As características ópticas de QDs de CdSe obtidos sob diferentes condições, assim como seus espectros de absorção e de emissão, podem ser verificados nos Apêndices B e C. Como esses QDs não apresentaram grandes alterações nas suas propriedades ópticas, isso indica fortemente que as respostas estudadas e o tamanho das nanopartículas são robustos a mudanças nas razões molares de MSA:Cd e Cd:Se na área de platô. Contudo, as razões molares de MSA:Cd de 6:1 e Cd:Se de 8:1, estabelecidas como ótimas, são preferíveis pois consomem menores quantidades de reagentes em comparação às demais razões molares na área de platô da Figura 16.

2.4.3 Caracterização óptica, estrutural e morfológica dos *quantum dots* de CdSe estabilizados com MSA obtidos sob condições otimizadas

QDs de CdSe foram preparados em triplicata, sob as condições otimizadas, para avaliar a reprodutibilidade do procedimento de síntese *one-pot* otimizado. Os espectros normalizados de absorção e de emissão estão apresentados na Figura 20, onde as letras A, B e C representam amostras de três sínteses distintas.

Observa-se, pela sobreposição dos espectros da Figura 20, que as bandas de absorção e de emissão dos QDs de CdSe obtidos nas três sínteses foram muito semelhantes. As respostas estudadas na otimização multivariada (intensidade de emissão e FWHM), assim como os perfis de absorção e emissão, tiveram valores de desvio padrão muito baixos em comparação com suas respectivas médias. Foram obtidos coeficientes de variação de 1,2% para intensidade de emissão, 0% para FWHM da banda de emissão, 0,4% para comprimento de onda do primeiro máximo de absorção e 0,3% para comprimento de onda de máxima emissão. Esses resultados atestam a boa reprodutibilidade das sínteses com relação às respostas mencionadas.

Figura 20 - Espectros de absorção (UV-Vis) e de emissão (PL) ($\lambda_{exc} = 400$ nm) de três suspensões de *quantum dots* de CdSe estabilizados com MSA sintetizados sob as mesmas condições experimentais: pH 5,0 e temperatura de 30 °C, com razões molares de MSA: Cd e Cd: Se de 6:1 e 8:1, respectivamente, e agitação por 60 min. As imagens inseridas correspondem a fotografias da suspensão de *quantum dots* de CdSe da síntese A irradiada com luz ambiente (à esquerda) e lâmpada ultravioleta (365 nm e potência de 20 W).



Fonte: A autora.

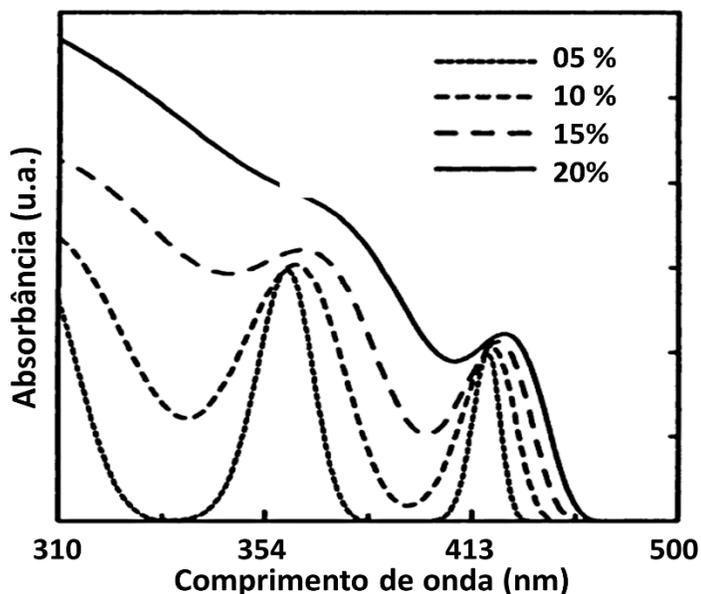
Os QDs de CdSe obtidos sob condições otimizadas tiveram intensidade de emissão de 2753 u. a. (± 81 u. a.) e FWHM da banda de emissão de 125 nm (± 0 nm), com o primeiro máximo da banda de absorção e máxima emissão em 411 nm (± 4 nm) e 503 nm (± 4 nm), respectivamente. Esses valores correspondem às médias \pm intervalos de confiança de 95% calculados pelos resultados das amostras das três sínteses. Os erros relativos entre as respostas calculadas (pelas

Equações 14 e 15) e os resultados experimentais foram -5,2% e 0,8% para intensidade de emissão e FWHM da banda de emissão, respectivamente.

Nos espectros de absorção dos QDs de CdSe mostrados na Figura 20, são observadas bandas referentes a três máximos de absorção em 411, 355 e 311 nm, que podem ser atribuídas às transições eletrônicas $1S_{\text{buraco}}-1S_{\text{elétron}}$, $1P_{\text{buraco}}-1P_{\text{elétron}}$ e $1D_{\text{buraco}}-1D_{\text{elétron}}$, respectivamente [2]. Além disso, a energia do *band gap* direto desses nanocristais de CdSe foi 3,14 eV, calculada a partir dos espectros de absorção pelo método gráfico de Tauc [57].

Pode-se inferir, pela comparação visual dos perfis de absorção bem definidos da Figura 20 com aqueles disponibilizados na Figura 21 [58], que os QDs de CdSe obtidos têm uma distribuição estreita de tamanho, aproximadamente entre 15 e 20%. Portanto, a largura e assimetria da banda de emissão pode ser atribuída à presença de defeitos intrínsecos e de superfície, uma vez que os QDs de CdSe têm uma distribuição de tamanho homogênea [43].

Figura 21 - Espectros de absorção de *quantum dots* com diferentes larguras de distribuição gaussiana de tamanho.

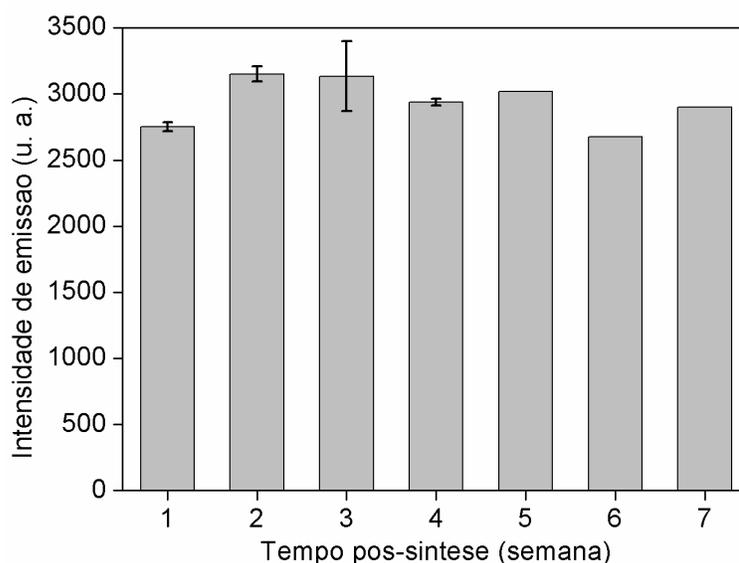


Fonte: Adaptado de Bányai e Koch.

As intensidades de emissão e QY das suspensões coloidais de QDs de CdSe foram monitoradas ao longo de sete semanas após síntese. De acordo com resultados apresentados na Figura 22, as maiores intensidades de emissão médias foram 3151 a 3134 u. a., obtidas em duas e três semanas pós-síntese, respectivamente. Contudo, as intensidades de emissão e os QYs não variaram muito com o tempo, com o maior QY médio (29,7%) obtido após três semanas

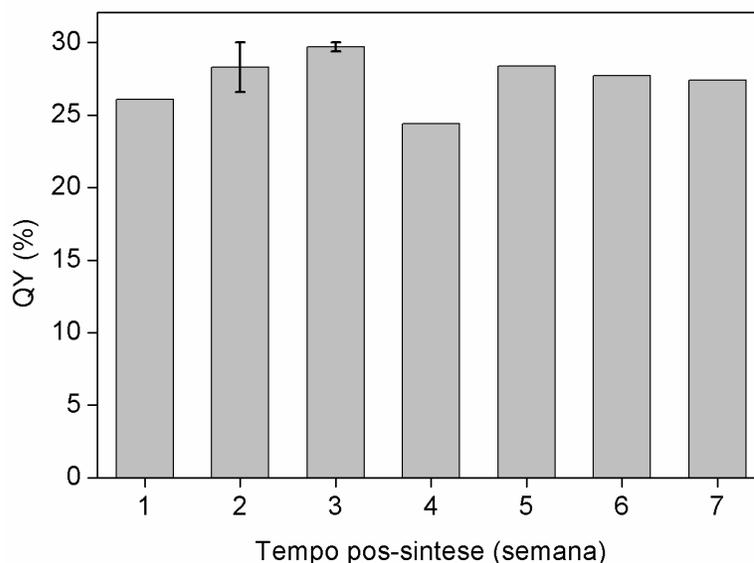
(Figura 23). Esses resultados são comparáveis [43,47] ou maiores [36,41] que os QYs de QDs de CdSe sintetizados em meio aquoso utilizando MSA como agente estabilizante. O aumento de intensidade de emissão com o tempo após a síntese está relacionado com o amadurecimento dos QDs e melhor passivação dos defeitos de superfície.

Figura 22 - Intensidades de emissão ao longo de sete semanas após a síntese de *quantum dots* de CdSe preparados a 30 °C e pH 5,0, com razões molares de MSA:Cd e Cd:Se de 6:1 e 8:1, respectivamente, e agitação por 60 min. Os desvios padrão amostrais foram calculados para 1 a 3 semanas com $n = 3$ amostras e para 4 semanas com $n = 2$ amostras.



Fonte: A autora.

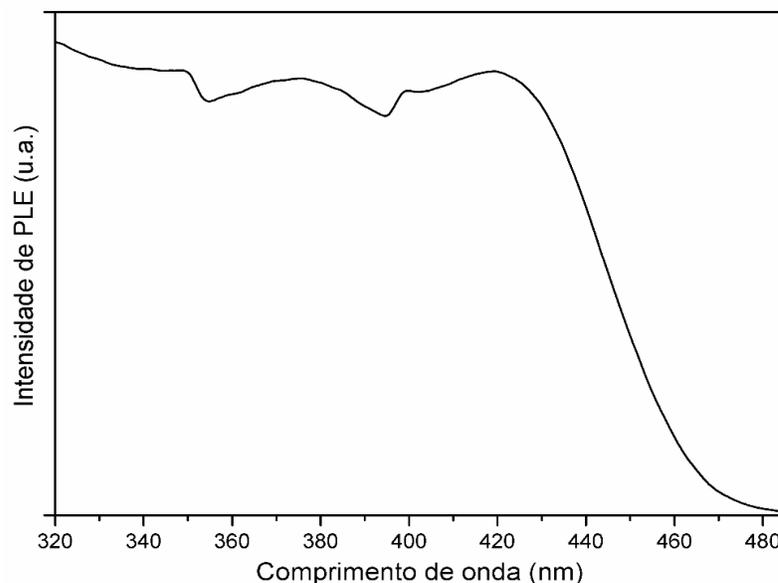
Figura 23 - Rendimento quântico relativo ao longo de sete semanas após a síntese de *quantum dots* de CdSe preparados a 30 °C e pH 5,0, com razões molares de MSA:Cd e Cd:Se de 6:1 e 8:1, respectivamente, e agitação por 60 min. Os desvios padrão amostrais foram calculados para 2 e 3 semanas com $n = 2$ amostras.



Fonte: A autora.

Na impossibilidade de obter experimentalmente o rendimento quântico absoluto, uma boa estimativa pode ser obtida pelo rendimento quântico relativo, em que um padrão com rendimento quântico bem conhecido é utilizado como referência. Para tanto, é importante que o padrão tenha características ópticas semelhantes ao material que se deseja caracterizar, especialmente quanto à banda de excitação fotoluminescente. A quinina foi o corante encontrado e disponível com comprimento de onda de excitação mais adequado para os QDs de CdSe, visto que, pelo espectro de excitação fotoluminescente (PLE) da Figura 24, os QDs obtidos podem ser excitados em comprimento de onda de 320 a 420 nm sem prejuízo à emissão fotoluminescente. Apesar de a quinina apresentar comprimento de onda de máxima emissão em torno de 452 nm [7], e os QDs de CdSe, em 503 nm, a Equação 13 utilizada para calcular o QY se baseia na intensidade de emissão integrada e, portanto, a diferença entre os comprimentos de onda de máxima emissão para a amostra e o padrão foi irrelevante para os cálculos.

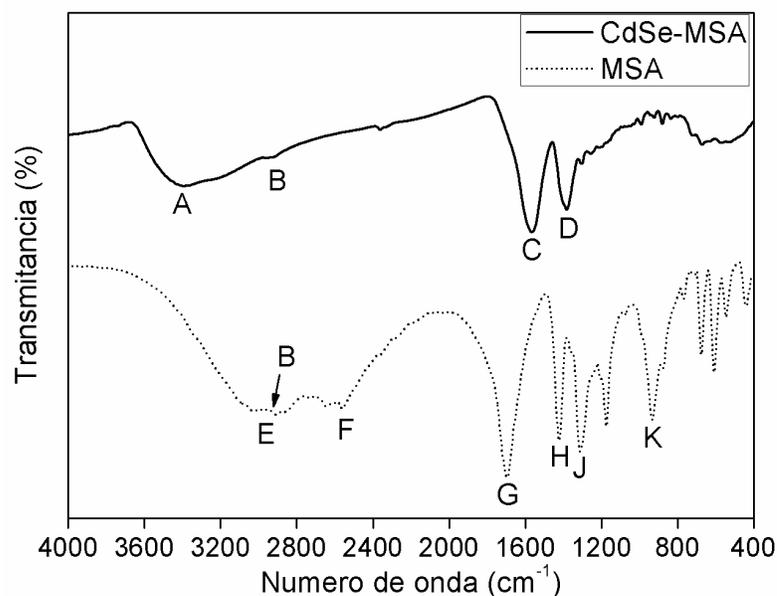
Figura 24 - Espectro de excitação ($\lambda_{\text{em}} = 505$ nm) de *quantum dots* de CdSe estabilizados com MSA obtidos nas seguintes condições: razões molares de MSA: Cd de 6:1 e Cd:Se de 8:1, pH 5,0, temperatura de 30 °C e agitação por 60 min.



Fonte: A autora.

Espectros de FT-IR foram coletados para os QDs de CdSe e para o MSA puro, para fins de comparação, e estão apresentados na Figura 25. A identificação das principais vibrações, baseadas em Silverstein, Webster, e Kiemle, pode ser consultada na Tabela 12 [59].

Figura 25 - Espectros de FT-IR de MSA puro e de *quantum dots* de CdSe estabilizados com MSA (CdSe-MSA) obtidos nas seguintes condições: razões molares de MSA:Cd de 6:1 e Cd:Se de 8:1, pH 5,0, temperatura de 30 °C e agitação por 60 min.



Fonte: A autora.

Tabela 12 - Principais vibrações características de MSA e dos *quantum dots* de CdSe estabilizados com MSA.

Símbolo	Vibração	Posição da banda (cm ⁻¹)
A	ν O–H	3630-3050
B	ν_{as} C–H (CH ₂)	2920
C	ν_{as} C=O (carboxilato)	1565
D	ν_s C=O (carboxilato)	1382
E	ν O–H (dímeros de ác. carboxílicos)	3300-2500
F	ν S–H	2584-2546
G	ν C=O (ác. carboxílico)	1696
H	δ_p O–H (ác. carboxílico)	1422
J	ν C–O (ác. carboxílico)	1312
K	δ_f O–H (dímeros de ác. carboxílicos)	930

ν = deformação axial; as = assimétrico; s = simétrico; δ = deformação angular; p = no plano; f = fora do plano.

Fonte: A autora.

O espectro FT-IR do MSA apresentou quatro bandas acentuadas nas posições G, H, J e K características de grupos carboxila de ácidos carboxílicos que, por sua vez, não foram observadas no espectro dos QDs de CdSe-MSA. Em pH 5,0, um ou dois ânions carboxilato estão presentes nas moléculas de MSA, como discutido anteriormente, então a concentração de ânions carboxilato é maior do que a concentração de grupos carboxila. Conseqüentemente, as ligações C=O e C–O em ressonância nos ânions carboxilato (em maior concentração do que os grupos carboxila pois estão presentes tanto em espécies LH₂⁻ como em LH²⁻) deram origem às duas bandas intensas e largas

nas posições C e D no espectro dos QDs de CdSe-MSA, o que pode ter causado sobreposição com as bandas esperadas para o grupo carboxila protonado nas posições G, H e J.

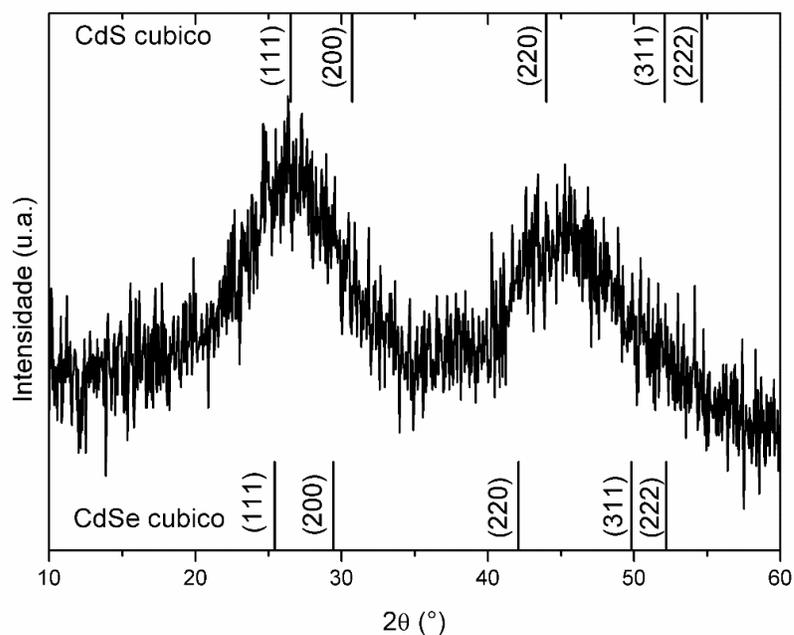
A presença dos ânions carboxilato voltados para a parte externa dos QDs de CdSe-MSA é evidenciada pelo potencial zeta de $\zeta = -14,7$ mV medido para a suspensão coloidal. Essa carga líquida negativa, atribuída aos ânions carboxilato, fornece estabilidade coloidal aos QDs por efeitos de impedimento eletrostático e estérico.

A banda muito larga e intensa na posição E, presente no espectro FT-IR do MSA, é característica de ligações de hidrogênio formadas em dímeros de ácidos carboxílicos. Por outro lado, a banda de O–H no espectro dos QDs de CdSe-MSA aparece na posição A com frequência maior que aquela da banda E, uma vez que ligações de hidrogênio nos nanocristais de CdSe-MSA são mais fracas do que as ligações diméricas no MSA puro. As ligações de hidrogênio no espectro dos QDs de CdSe-MSA podem ser atribuídas tanto à absorção de água durante a análise de FT-IR quanto à presença de grupos carboxila que formam ligações de hidrogênio com moléculas vizinhas de MSA, como proposto anteriormente.

A banda fraca na posição B, atribuída a ligações C–H provenientes do único CH₂ na molécula do MSA, está presente em ambos os espectros do MSA e dos QDs de CdSe-MSA, uma vez que essa região da molécula de MSA não foi modificada com a síntese dos QDs. O pico fraco na posição F no espectro FT-IR do MSA é característico de deformação axial na ligação S–H, embora fortemente sobreposto pela banda de O–H. Contudo, essa banda atribuída a S–H não foi observada no espectro dos QDs de CdSe-MSA, o que indica a ausência de ligação S–H e corrobora a hipótese de que as moléculas de MSA se ligam na superfície dos QDs de CdSe por ligações S–Cd [48].

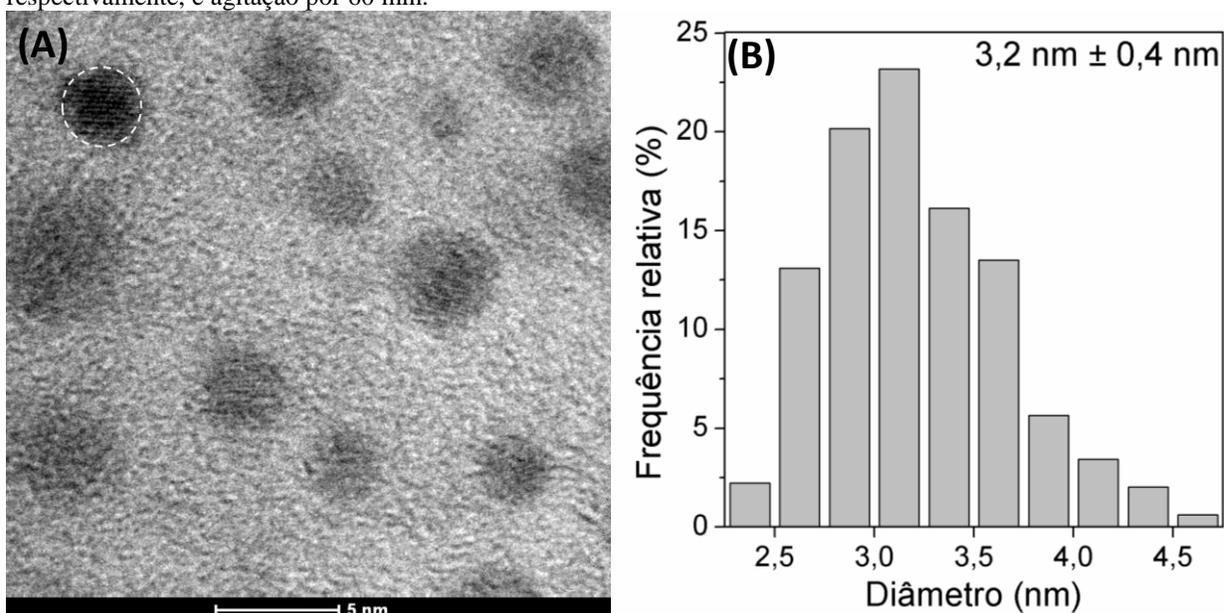
A cristalinidade e a estrutura dos QDs de CdSe obtidos sob condições otimizadas foram caracterizadas usando DRX, como mostrado na Figura 26, onde os picos de difração estão alargados devido ao tamanho nanocristalino. O pico largo em 2θ de $26,6^\circ$ corresponde aos planos de reflexão (111) e (200), e o pico largo na região de 40° a 55° aparentemente é devido à sobreposição dos picos de difração para os planos (220), (311) e (222). Esses planos de reflexão confirmam que os QDs de CdSe têm predominantemente a estrutura cúbica da blenda de zinco (grupo espacial $F\bar{4}3m$), fase mais estável obtida para QDs de calcogenetos de cádmio sintetizados em meio aquoso a baixas temperaturas (<260 °C) [36,46].

Figura 26 - Padrões de DRX de *quantum dots* de CdSe estabilizados com MSA sintetizados a 30 °C e pH 5,0, com razões molares de MSA:Cd e Cd:Se de 6:1 e 8:1, respectivamente, e agitação por 60 min.



Fonte: A autora.

Figura 27 - (A) Micrografia de HR-TEM e (B) distribuição de tamanho de partícula dos *quantum dots* de CdSe estabilizados com MSA sintetizados a 30 °C e pH 5,0, com razões molares de MSA:Cd e Cd:Se de 6:1 e 8:1, respectivamente, e agitação por 60 min.



Fonte: A autora.

Uma micrografia representativa dos QDs de CdSe, obtida por HR-TEM, é apresentada na Figura 27-A, onde é possível visualizar nitidamente as franjas de rede e confirmar a alta cristalinidade do material. Os nanocristais de CdSe apresentaram forma esférica com diâmetro

médio de $3,2 \text{ nm} \pm 0,4 \text{ nm}$, com um coeficiente de variação de 12% ainda menor que o resultado previamente inferido pelo espectro de absorção com base em Bányai e Koch [58], atestando a homogeneidade na distribuição do tamanho de partícula (Figura 27-B). O raio dos nanocristais de CdSe (1,6 nm) é três vezes menor que o a_B para CdSe (4,9 nm), confirmando que os QDs obtidos estão em regime de confinamento quântico forte [2].

2.5 CONCLUSÃO

Um procedimento *one-pot* otimizado para a síntese aquosa de QDs de CdSe estabilizados com MSA foi obtido pela otimização multivariada simultânea da intensidade de emissão e da FWHM da banda de emissão. As condições ótimas encontradas foram razões molares de MSA: Cd de 6:1 e Cd:Se de 8:1, pH 5,0, temperatura de 30 °C, sob agitação por 60 min. Desse modo, um procedimento de síntese simples, rápido e reproduzível foi obtido, o qual pode ser realizado à temperatura e atmosfera ambientes.

Os QDs de CdSe obtidos sob condições otimizadas apresentaram intensidade de emissão e QY de até 3151 u. a. e 29,7%, respectivamente, em três semanas após a síntese, com primeiro máximo de absorção em 411 nm, máxima emissão em 503 nm e FWHM da banda de emissão de 125 nm. O perfil de DRX indicou que esses QDs tiveram predominantemente a estrutura cúbica da blenda de zinco, e por HR-TEM pôde-se confirmar uma distribuição homogênea do tamanho de partícula com um diâmetro médio de 3,2 nm. O tamanho de partícula confirma que os QDs de CdSe obtidos estão em regime de confinamento quântico forte, e a energia de *band gap* calculada foi 3,14 eV.

Os QDs obtidos no presente trabalho apresentaram QY comparável aos maiores QY de QDs de CdSe estabilizados com MSA obtidos via síntese *one-pot* aquosa encontrados na revisão da literatura, que variaram de 1,9 [36] a 32,4% [47]. Além disso, o procedimento proposto nesta tese dispensa aquecimento, enquanto os procedimentos propostos por Song, Duan e Zhan [43] e por Qian *et al.* [47] empregaram temperaturas de 50 e 100 °C, respectivamente. Uma outra vantagem dos QDs de CdSe obtidos pelo procedimento otimizado é o pH inicial da síntese, o qual possibilita que ao final da síntese a suspensão tenha pH de aproximadamente 5,6. Esse pH é ideal para realizar a conjugação a biomoléculas dispensando a etapa de ajuste de pH, que às vezes resulta em perda de estabilidade coloidal dos QDs, e potencializa possíveis aplicações biológicas desse material.

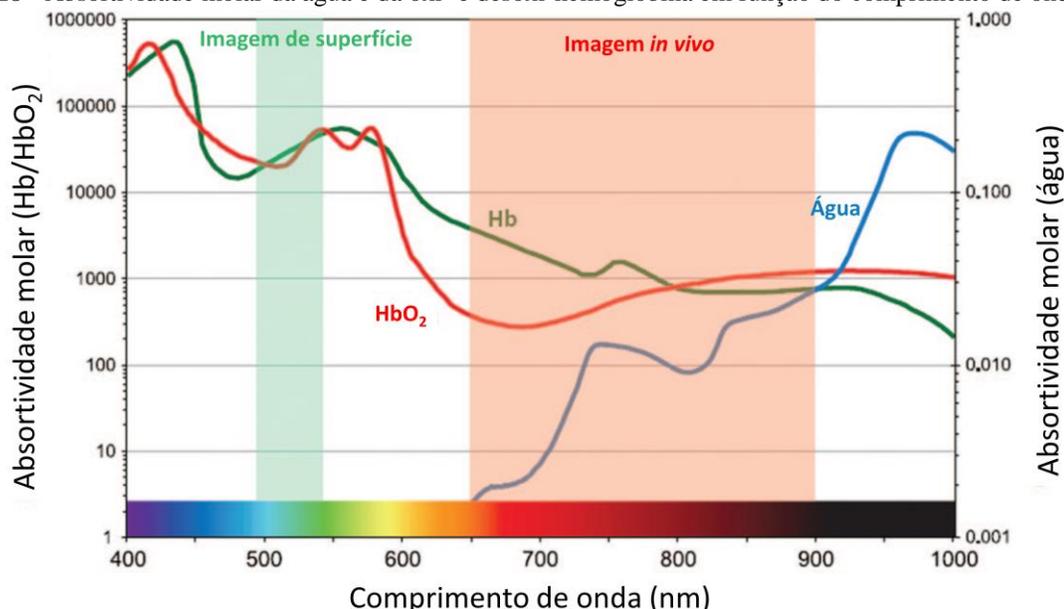
3 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA FOTOLUMINESCÊNCIA DE *QUANTUM DOTS* DE Ag₂Se SINTETIZADOS EM MEIO AQUOSO

3.1 INTRODUÇÃO

As primeiras aplicações de QDs como sondas fotoluminescentes na área biomédica datam de 1998 [60,61], e, desde então, alavancaram-se as pesquisas focadas em otimizar métodos de síntese e biocompatibilização dos QDs [12]. Vários tipos de QDs têm sido propostos com emissão desde a região UV até o infravermelho próximo (NIR, do inglês *Near-Infrared*) do espectro eletromagnético, geralmente compostos por átomos de elementos dos grupos II-VI (tais como os calcogenetos de cádmio e zinco), dos grupos III-V (tais como fosfeto de índio e arsenetos de índio e gálio) ou dos grupos IV-VI (tais como os calcogenetos de chumbo) da tabela periódica. Contudo, os QDs que emitem na região do NIR têm algumas vantagens sobre aqueles que emitem em comprimentos de onda na região UV-Vis, como por exemplo a redução significativa de sinal de fundo (*background*), resultando em melhoria da sensibilidade de detecção [12,13]. Conseqüentemente, os QDs com fotoluminescência na região do NIR são bastante promissores para aplicações biomédicas pois, além de penetrar mais profundamente tecidos biológicos, emitem luz na janela de diagnóstico biológico, região de 650 a 1450 nm em que a autofluorescência de tecidos biológicos é bastante reduzida [62]. A região de 650 a 900 nm é especialmente de interesse para simplificar as aplicações *in vivo*, pois é onde as absorbâncias da água e da oxi- e desoxi-hemoglobina concomitantemente são mínimas, conforme ilustrado na Figura 28 [63].

Para que os QDs apresentem fotoluminescência na região NIR (comprimento de onda maior que 750 nm [64]), é necessário que o *bulk* do semiconductor tenha energia de *band gap* menor que 1,65 eV, de acordo com a equação $E = hv$. Atualmente, os QDs de CdTe, HgTe, InP, InAs, GaAs, PbS e PbSe são os mais estudados com emissão na região do NIR [13]. Contudo, são crescentes as preocupações com a toxicidade de QDs contendo íons como Cd²⁺, Hg²⁺, Pb²⁺ e As³⁻, o que limita drasticamente as potenciais aplicações biológicas desses materiais. Uma alternativa para contornar essa limitação consiste no revestimento dos nanocristais desses semicondutores com uma camada de outro semiconductor atóxico (ZnS, por exemplo), tanto para diminuir a concentração de defeitos de superfície quanto para promover a biocompatibilidade desses sistemas. Porém, a síntese controlada de estruturas *core/shell* é um desafio [13].

Figura 28 - Absortividade molar da água e da oxi- e desoxi-hemoglobina em função do comprimento de onda.



Fonte: Adaptado de Kobayashi *et al.*

É nesse panorama que os QDs de calcogenetos de prata (Ag_2X , $\text{X} = \text{S}, \text{Se}$ e Te) surgem como uma alternativa promissora aos QDs emissores na região NIR, pois, além de não conterem elementos de toxicidade elevada, apresentam produtos de solubilidade significativamente baixos ($pK_{PS}(\text{Ag}_2\text{Se}) \cong 64$; $pK_{PS}(\text{CdSe}) \cong 35$; $pK_{PS}(\text{PbSe}) = 38$ [12,65]), resultando em mínima quantidade de íons Ag^+ liberada nas adjacências biológicas [12]. Os calcogenetos de prata são semicondutores com *band gaps* muito estreitos, de 1,1, 0,15 e 0,67 eV para o *bulk* de Ag_2S , Ag_2Se e Ag_2Te , respectivamente, o que justifica suas respectivas emissões alcançarem a região NIR.

O primeiro relato de síntese de QDs de prata que apresentaram fotoluminescência data de 2010 [66] e, até o presente, há poucas publicações relatando síntese e caracterização de QDs fotoluminescentes de calcogenetos de prata, especialmente em meio aquoso [12,13]. A síntese de QDs de Ag_2S são as mais reportadas, restando na literatura poucas publicações sobre a síntese em meio aquoso de nanocristais fotoluminescentes de Ag_2Se [12,13]. Na Tabela 13, é apresentado um resumo das condições sintéticas, comprimentos de onda de emissão e rendimentos quântico encontrados em trabalhos envolvendo a síntese QDs de Ag_2Se em meio aquoso.

Gu *et al.* biomimetizaram em meio aquoso a redução de Se em células de levedura utilizando Na_2SeO_3 , glutatona, glutatona redutase e fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido. Em seguida, o glutatioselenol (GSSeH) obtido por esse processo foi utilizado como precursor de Se, e AgNO_3 como precursor de Ag, para obter *quantum dots* de Ag_2Se em meio

aquoso estabilizados com alanina. A reação foi conduzida por 10 min a 90 °C sob atmosfera inerte de N₂, produzindo nanocristais com emissão entre 700 e 820 nm e rendimentos quânticos de 1,00 a 3,09%, variando de acordo com a razão molar de Ag:Se utilizada [67].

Tabela 13 - Resumo das condições de síntese e algumas características ópticas de *quantum dots* de Ag₂Se obtidos em meio aquoso.

Precusores de Ag e Se	Estabilizante	pH	Temperatura (°C)	Gás	Tempo (min)	λ_{ems} (nm)	Rendimento quântico (%)	Referência
AgNO ₃ , Na ₂ SeO ₃	L-Alanina	-	90	N ₂	10	700-820	1,00-3,09	[67]
AgNO ₃ , Se	Ácido 3-mercaptopropiônico e tioglicerol	7,5-11,5	0-100	N ₂	30-420	486-492	13,7	[68]
AgNO ₃ , Se	Ácido 3-mercaptopropiônico	12	90	N ₂	10-60	835-940	42	[69]
AgNO ₃ , Na ₂ SeO ₃	Polímero multidentado	-	Ambiente	-	30-180	966-1228	11,1-12,2	[70]
AgNO ₃ , Se	Galactomanana	-	Ambiente	-	20	705	-	[71]

Fonte: A autora.

Os trabalhos de Wang *et al.* e Che *et al.* reportam a síntese de QDs *core-shell* de Ag₂Se/ZnSe estabilizados com MPA [68,69]. Em ambos os trabalhos, os autores investigaram de forma univariada os efeitos de alguns fatores, como pH, temperatura, tempo de refluxo e razões molares de Ag:Se:Zn:MPA, sobre a emissão dos QDs. Wang e colaboradores obtiveram QDs com rendimento quântico de 13,7%, mas a emissão máxima dos nanocristais ocorreu em 492 nm, não atingindo a região do NIR [68]. No trabalho de Che *et al.*, os QDs obtidos tiveram rendimento quântico de até 42%, com emissão entre 835 e 940 nm [69].

Tan *et al.* sintetizaram QDs de Ag₂Se recoberto com um polímero multidentado em meio aquoso, à temperatura e atmosfera ambientes. Dependendo do tempo de síntese, que variou de 30 a 180 min, os nanocristais obtidos emitiram entre 966 e 1228 nm com rendimento quântico máximo de 12,2% [70]. Contudo, o procedimento experimental para obtenção do polímero funcionalizado com grupos amino tem algumas desvantagens como o uso de solvente orgânico e diversas etapas de síntese que levam pelo menos 6 dias até o produto final [70].

Em um trabalho mais recente, Lesnichaya *et al.* propuseram um procedimento para obter nanocompósitos híbridos formados por QDs de Ag₂Se dispersos em galactomanana, um polissacarídeo natural. Após 20 min de síntese, foram obtidos nanocompósitos solúveis em água com emissão máxima em 705 nm [71].

Dos trabalhos envolvendo síntese aquosa de QDs de Ag_2Se , apenas dois focaram em otimizar variáveis de síntese que afetam a fotoluminescência [68,69], mas o fizeram de forma univariada. Portanto, no presente capítulo, propõe-se realizar estudos multivariados sobre vários parâmetros sintéticos de forma a maximizar a emissão de QDs de Ag_2Se . Embora os QDs com emissão na região NIR apresentem rendimentos quânticos relativamente menores que os de QDs que emitem na região UV-Vis, com síntese mais elaborada e modificações nos seus parâmetros, esses QDs de Ag_2X podem ser mais fotoluminescentes que outros fluoróforos que emitem na região NIR.

3.2 OBJETIVOS

O principal objetivo deste capítulo consiste em realizar estudos sobre fatores da síntese de QDs de Ag_2Se em fase aquosa para propor um procedimento simples e otimizado que possibilite obter nanocristais com emissão na região NIR. Para isso, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Identificar e estudar de forma multivariada as variáveis de síntese que exercem influência relevante sobre propriedades ópticas de QDs de Ag_2Se , de forma a maximizar a intensidade de emissão;
- Caracterizar, quanto à estrutura e às propriedades ópticas de interesse, os QDs de Ag_2Se obtidos em condições otimizadas de síntese.

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Materiais

Todos os materiais foram usados como recebidos sem purificação adicional, e todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida em um sistema de deionização (resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega$ a temperatura ambiente). Foram utilizados os reagentes: nitrato de prata (AgNO_3 , 99% - Vetec Química Fina Ltda/Brasil), selenito de sódio (Na_2SeO_3 , 99,999% - Sigma-Aldrich Co.-EUA), borohidreto de sódio (NaBH_4 , 98% - Sigma-Aldrich Co.-EUA) e ácido mercaptossuccínico (MSA, 97% - Sigma-Aldrich Co.-EUA).

3.3.2 Planejamentos experimentais e sínteses dos *quantum dots* de Ag₂Se

As sínteses dos QDs de Ag₂Se foram realizadas no Laboratório Integrado de Nanoestruturas e Compostos de Coordenação do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco. Soluções aquosas de AgNO₃ 0,0025 mol L⁻¹ e de Na₂SeO₃ 0,25 mol L⁻¹ foram utilizadas como precursores de Ag e Se, respectivamente, e MSA foi empregado como agente estabilizante. Todas as sínteses foram conduzidas sob atmosfera ambiente e com um volume de 100 mL da solução de AgNO₃, resultando em 0,25 mmol de Ag⁺ no meio reacional. A adição dos demais reagentes e soluções, descritos a seguir, pode ter aumentado o volume total da reação em até 1%.

As quantidades de NaBH₄ (agente redutor de Se na razão molar de NaBH₄:Se de 2,5:1), do agente estabilizante e da solução de Na₂SeO₃ foram calculados para cada síntese com base na quantidade fixada de Ag⁺, de acordo com as razões molares de MSA:Ag e Ag:Se dos planejamentos experimentais.

Para cada síntese, a solução AgNO₃ e o agente estabilizante foram adicionados a um béquer sob agitação magnética e o pH foi ajustado com uma solução de NaOH 3,0 mol L⁻¹. Em seguida, a solução de MSA–Ag⁺ foi transferida para um balão de fundo redondo de duas bocas (250 mL) sob agitação magnética vigorosa e posicionado em banho de água com temperatura controlada com variações máximas de ± 3 °C. Uma alíquota da solução de Na₂SeO₃ foi adicionada ao balão, seguida do NaBH₄. Nesse momento, iniciou-se a contagem do tempo de reação, e o balão foi acoplado a um condensador e vedado com um septo (para as reações em temperatura maior que 30 °C) ou apenas vedado com dois septos (para as reações em temperatura menor ou igual a 30 °C). Após a síntese, os QDs foram armazenados à temperatura ambiente em frascos de vidro vedados e protegidos da incidência de luz.

O objetivo dos estudos realizados com QDs de Ag₂Se estabilizados com MSA foi de maximizar a intensidade de emissão dos QDs (calculada pela razão entre a intensidade máxima de fluorescência e a absorvância no mesmo comprimento de onda de excitação) medida no sétimo dia após a síntese. Contudo, para os planejamentos onde não foi possível avaliar a intensidade de emissão como resposta, o tratamento estatístico foi feito com o comprimento de onda do primeiro máximo de absorção.

Inicialmente, foi delineado um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para estudar as condições experimentais para as razões molares de MSA:Ag e Ag:Se, pH e temperatura, conforme níveis definidos na Tabela 14. Esses foram os fatores mais estudados em artigos reportando síntese aquosa de QDs de Ag_2X , e alíquotas foram retiradas de todas as sínteses de QDs de Ag_2Se estabilizados com MSA em 20 e 60 min após o início da reação.

Tabela 14 - Níveis variados para cada fator do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} delineado para a síntese dos *quantum dots* de Ag_2Se estabilizados com MSA.

Fator	Nível inferior (-1)	Nível superior (+1)
Razão molar de MSA:Ag	2:1	8:1
Razão molar de Ag:Se	2:1	10:1
pH	5,0	12,0
Temperatura (°C)	30	60

Fonte: A autora.

Em seguida, em decorrência da grande variação, com a temperatura, dos resultados obtidos pelo planejamento fatorial fracionário, foi delineado um planejamento fatorial somente com o pH (dois níveis) e a temperatura de síntese (três níveis), conforme níveis apresentados na Tabela 15, fixando-se ambas as razões molares de MSA:Ag e Ag:Se em 6:1.

Tabela 15 - Níveis variados para cada fator do planejamento fatorial com níveis misturados delineado para a síntese dos *quantum dots* de Ag_2Se estabilizados com MSA.

Fator	Nível inferior (-1)	Ponto central (0)	Nível superior (+1)
pH	5,0	-	12,0
Temperatura (°C)	5	25	45

Fonte: A autora.

Um terceiro estudo foi realizado sobre razão molar de MSA:Ag, razão molar de Ag:Se, pH e temperatura da síntese de QDs de Ag_2Se estabilizados com MSA, empregando um planejamento fatorial completo 2^4 . Os níveis estudados para esses fatores estão especificados na Tabela 16.

Tabela 16 - Níveis variados para cada fator do planejamento fatorial completo 2^4 delineado para a síntese dos *quantum dots* de Ag_2Se estabilizados com MSA.

Fator	Nível inferior (-1)	Nível superior (+1)
Razão molar de MSA:Ag	2:1	6:1
Razão molar de Ag:Se	2:1	8:1
pH	5,0	12,0
Temperatura (°C)	5	60

Fonte: A autora.

Por fim, um planejamento fatorial completo foi realizado com os fatores razão molar de MSA:Ag, pH e temperatura, mantendo-se constante a razão molar de Ag:Se em 8:1. Os níveis dos fatores explorados nesse planejamento estão especificados na Tabela 17.

Tabela 17 - Níveis variados para cada fator do planejamento fatorial completo 2^3 delineado para a síntese dos *quantum dots* de Ag_2Se estabilizados com MSA.

Fator	Nível inferior (-1)	Nível superior (+1)
Razão molar de MSA:Ag	5:1	7:1
pH	5,0	7,0
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	40	80

Fonte: A autora.

Os planejamentos experimentais e o tratamento estatístico dos dados foram realizados utilizando-se o *software* STATISTICA[®] 12 (StatSoft, EUA). O processamento dos espectros foi feito utilizando-se o *software* OriginPro[®] 8 (OriginLab, EUA) e os demais gráficos foram obtidos utilizando-se o *software* Microsoft Office Excel[®] 2013 (Microsoft Corporation, EUA).

3.3.3 Caracterização óptica, estrutural e morfológica dos *quantum dots* de Ag_2Se

Os espectros de absorção UV-Vis dos QDs de Ag_2Se foram coletados com um espectrofotômetro UV-Vis PerkinElmer Lambda 650 (EUA) da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, e os espectros de emissão e excitação foram obtidos utilizando-se um espectrômetro de fluorescência PerkinElmer LS 55 (EUA) do Laboratório de Biofísica Química do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco. As medidas de absorção, emissão e excitação foram realizadas utilizando-se cubetas de quartzo apropriadas com caminho óptico de 10 mm, após diluição das amostras com água quando a absorbância no comprimento de onda de excitação fosse muito maior que 0,5.

Os padrões de DRX foram coletados com um difratômetro de raios X Shimadzu XRD-7000 (Japão) do Laboratório de Materiais Compósitos e Integridade Estrutural do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Pernambuco, usando radiação $\text{Cu K}\alpha$ (1,5418 Å) e varrendo o intervalo de 2θ de 20 a 80° com um passo de $0,02^{\circ}$. A suspensão coloidal de QDs de Ag_2Se foi previamente concentrada, desestabilizada, centrifugada e seca para obter o pó para análise por DRX.

A suspensão de QDs foi filtrada, diluída em água ultrapura (proporção de 1:20), gotejada sobre uma grade de cobre de 400 mesh com filme ultrafino de carbono e, após secagem, foi analisada por HR-TEM com um microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai G² (EUA) operando a 200 kV, do Laboratório de Caracterização Estrutural do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos. O diâmetro dos QDs de Ag₂Se foi obtido pela média do tamanho de 425 nanocristais, medidos com o *software* ImageJ 1.50e (NIH, EUA).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Tratamento estatístico dos resultados e avaliação dos efeitos dos fatores estudados sobre características ópticas dos *quantum dots* de Ag₂Se estabilizados com MSA

A escassez de trabalhos que avaliem o efeito dos diversos fatores que afetam a fotoluminescência de QDs de Ag₂Se faz deste um tópico promissor a ser estudado, ao passo que dificulta o norteamento das primeiras explorações sobre esse tema. Algumas sínteses exploratórias foram realizadas inicialmente para definir o precursor de Se, a concentração das soluções de AgNO₃ e de Na₂SeO₃ e o tempo máximo de síntese. Até o momento, não há trabalhos empregando MSA como agente estabilizante para QDs de Ag₂Se. Portanto, esse foi o primeiro estabilizante estudado no presente trabalho. Além disso, diferentemente de outros ligantes com grupos tióis, MSA pode ser usado como estabilizante mesmo em condições levemente ácidas [37,54], o que torna os QDs estabilizados com MSA mais apropriados para aplicações biológicas.

As propriedades ópticas dos QDs de Ag₂Se obtidos no planejamento fatorial fracionário 2⁴⁻¹ variaram consideravelmente em consequência dos amplos intervalos explorados para os fatores. Não foi possível estabelecer um comprimento de onda de excitação que satisfizesse a todos os 16 sistemas obtidos no planejamento fatorial fracionário, o que impossibilitou a obtenção de intensidades de emissão comparáveis para os QDs. Dessa forma, não foi possível avaliar os efeitos dos fatores sobre a intensidade de emissão. Contudo, observou-se que os comportamentos dos sistemas se dividiram em dois grupos, principalmente em função do pH utilizado. Alguns sistemas apresentaram absorção em torno de 305 nm, com banda de emissão em 455 nm. Os demais QDs apresentaram absorção em comprimento de onda maior ou igual a 515 nm, com emissão em comprimento de onda médio de 615 nm. Os comprimentos de onda do primeiro máximo de

absorção, de máxima emissão e de excitação (utilizado para obter os espectros de emissão) estão apresentados na Tabela 18, bem como as condições experimentais das sínteses do planejamento fatorial fracionário.

Tabela 18 - Condições experimentais e resultados das sínteses do planejamento fatorial fracionário 2^{4+1} delineado para as sínteses dos *quantum dots* de Ag_2Se estabilizados com MSA.

Síntese	Razão molar de MSA:Ag	Razão molar de Ag:Se	pH	Temperatura (°C)	Tempo de síntese* (min)	λ_{abs} (nm)	λ_{ems} (nm)	λ_{exc} (nm)
15.1	2:1	2:1	5,0	30	20	550	655	450
15.2	2:1	2:1	5,0	30	60	555	660	450
18.1	8:1	2:1	5,0	60	20	355	393	350
18.2	8:1	2:1	5,0	60	60	365	393	350
14.1	2:1	10:1	5,0	60	20	535	690	450
14.2	2:1	10:1	5,0	60	60	540	700	450
12.1	8:1	10:1	5,0	30	20	515	708	450
12.2	8:1	10:1	5,0	30	60	515	710	450
17.1	2:1	2:1	12,0	60	20	300	455	350
17.2	2:1	2:1	12,0	60	60	293	455	350
13.1	8:1	2:1	12,0	30	20	305	455	350
13.2	8:1	2:1	12,0	30	60	305	455	350
16.1	2:1	10:1	12,0	30	20	310	455	350
16.2	2:1	10:1	12,0	30	60	305	455	350
11.1	8:1	10:1	12,0	60	20	305	455	350
11.2	8:1	10:1	12,0	60	60	305	455	350

*Tempo em que as alíquotas foram retiradas da síntese.

Fonte: A autora.

Os efeitos de primeira ordem dos fatores e de algumas interações foram calculados utilizando os resultados de comprimento de onda do primeiro máximo de absorção. Como houve pouca ou nenhuma variação dos resultados com o tempo de síntese, somente as razões molares de MSA:Ag e Ag:Se, pH e temperatura foram considerados para o tratamento dos dados. Além disso, por se tratar de um planejamento fatorial fracionário com resolução 4, as interações de dois fatores estão confundidas entre si. Porém os efeitos principais só estão confundidos com as interações entre três fatores, as quais normalmente não são significativas, o que torna esse planejamento apropriado para uso como triagem de quais fatores principais são significativos. As estimativas dos efeitos, o erro padrão multiplicado pelo *t* de Student com 8 graus de liberdade e os limites de confiança estão apresentados na Tabela 19.

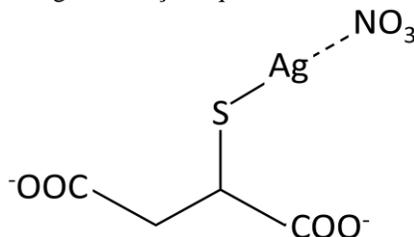
Tabela 19 - Estimativa dos efeitos principais e de algumas interações dos fatores, para os resultados de comprimento de onda do primeiro máximo de absorção de *quantum dots* de Ag_2Se obtidos pelo planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} .

Fator	Efeito	Erro padrão x t	Limite de confiança inferior (-95%)	Limite de confiança superior (+95%)
Média	397,38	2,16	395,22	398,31
(1) Razão molar de MSA:Ag	-52,25	4,31	-56,56	-50,38
(2) Razão molar de Ag:Se	37,75	4,31	33,44	39,62
(3) pH	-187,75	4,31	-192,06	-185,88
(4) Temperatura	-45,25	4,31	-49,56	-43,38
1x2 = 3x4	39,75	4,31	35,44	41,62
1x3 = 2x4	55,25	4,31	50,94	57,12
1x4 = 2x3	-32,25	4,31	-36,56	-30,38

Fonte: A autora.

A estimativa do efeito do pH foi consideravelmente maior que os efeitos dos demais fatores. Nas sínteses do planejamento fatorial fracionário, o aumento do pH de 5,0 para 12,0 causou a diminuição, em média, de 188 nm no comprimento de onda do primeiro máximo de absorção dos QDs, o que certamente está relacionado ao estabilizante utilizado. O MSA forma quelatos com diferentes íons metálicos, inclusive com Ag^+ [52]. Como Ag^+ tem número de coordenação dois, MSA poderia atuar como ligante mono- ou bidentado. Entretanto, alguns estudos apontam que, quando um grupo tiol está ligado a Ag^+ , a coordenação do íon ocorre por ligação monodentada com o MSA, pois uma segunda quelação pelo átomo de oxigênio carboxílico é estericamente difícil. Além disso, íons Ag^+ têm muita afinidade por íons nitrato em solução [53,72]. A estrutura proposta para o complexo MSA-Ag em meio básico está representada na Figura 29.

Figura 29 - Estrutura do complexo MSA-Ag em solução aquosa contendo íons nitrato, em pH básico.



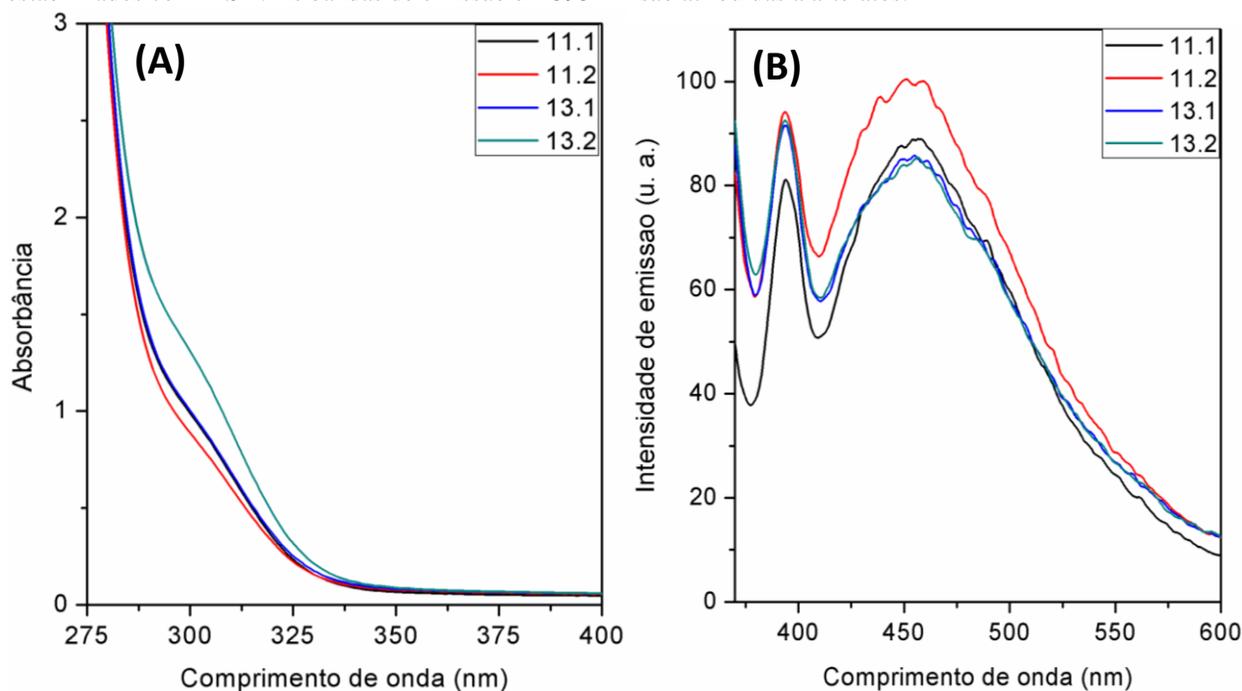
Fonte: A autora.

Em pH 12,0, os dois grupos carboxílicos e o grupo tiol da molécula do MSA estão desprotonados [53], o que pode ter ocasionado a formação de complexos MSA-Ag muito estáveis que impediram o crescimento dos QDs de Ag_2Se . Embora haja quimissorção do MSA na superfície de metais em pH levemente ácido como pH 5,0, conforme discutido na sessão 2.4.2, o complexo MSA-Ag formado em pH básico tende a ser mais estável. Consequentemente, os comprimentos de

onda do primeiro máximo de absorção, que estão diretamente relacionados ao tamanho dos nanocristais, foram muito menores para as suspensões coloidais obtidas em pH 12,0 que aquelas obtidas em pH 5,0.

Todos os nanocristais do planejamento fatorial fracionário sintetizados em pH 12,0 tiveram primeiro máximo de absorção em aproximadamente 305 nm e uma banda de emissão na mesma posição (455 nm), apenas com intensidades diferentes. Como as bandas de absorção e emissão de todas as suspensões coloidais obtidas em pH 12,0 são sobreponíveis, os espectros representativos de apenas quatro suspensões foram apresentados na Figura 30. As bandas de emissão em 393 nm são atribuídas a artefatos, pois foram observadas também nos espectros de emissão da água ultrapura e solução aquosa de AgNO_3 $0,0025 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 30 - Espectros de (A) absorção e de (B) emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$) de suspensões de nanocristais de Ag_2Se estabilizados com MSA. As bandas de emissão em 393 nm são atribuídas a artefatos.



Fonte: A autora.

Esses nanocristais de Ag_2Se formados em pH 12,0 – com características ópticas diferentes daquelas esperadas para QDs, mas praticamente idênticas para suspensões sintetizadas em diferentes temperaturas e razões molares de MSA:Ag e Ag:Se – apresentam comportamentos semelhantes aos de aglomerados de tamanhos mágicos (MSCs, do inglês *Magic-Size Clusters*) ou de nanocristais ultrapequenos (USNs, do inglês *Ultrasmall Nanocrystals*).

USNs são nanopartículas com muito menos átomos que os QDs e com tamanho menor que 2 nm. Como a maioria dos átomos de USNs estão na superfície, as propriedades físicas e ópticas são predominantemente determinadas pelas estruturas de superfície e pelo ambiente químico que envolve os nanocristais [73]. MSCs, por sua vez, são um caso específico de USNs em que os nanocristais têm números específicos (também chamados de “números mágicos”) de monômeros ($N = 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20$ etc., para Ag_N por exemplo [74]), o que lhes confere uma estrutura termodinamicamente muito estável [73,75]. MSCs são muito resistentes ao crescimento, o que os leva a crescimento quantizado no qual estruturas maiores se formam paralelamente, ao invés de uma estrutura que aumenta continuamente em tamanho [73].

Embora possam ter composição e tamanho similares, USNs e MSCs se distinguem pela FWHM das bandas de absorção excitônica e de emissão e pelo tipo de crescimento. USNs apresentam crescimento contínuo ou homogêneo, verificado pelo *red shift* contínuo nas bandas de absorção e de emissão. Além disso, a FWHM da banda de absorção dos USNs é geralmente larga e depende de diversos fatores, como a velocidade de disponibilização de Se para o crescimento [75]. MSCs, por sua vez, exibem crescimento heterogêneo observado pela degradação de bandas de maior energia e a criação de bandas em maiores comprimentos de onda que aumentam de intensidade com o tempo. Isso decorre do fato de que, durante o crescimento, os MSCs ascendem de uma família de tamanho discreto para outra de tamanho discreto maior. Dessa forma, MSCs têm distribuições de tamanho homogêneas resultando em bandas de absorção e de emissão muito estreitas especialmente em meio orgânico [75,76]. A obtenção de MSCs de semicondutores, como PbSe e CdSe, tem sido reportada na literatura [76-78].

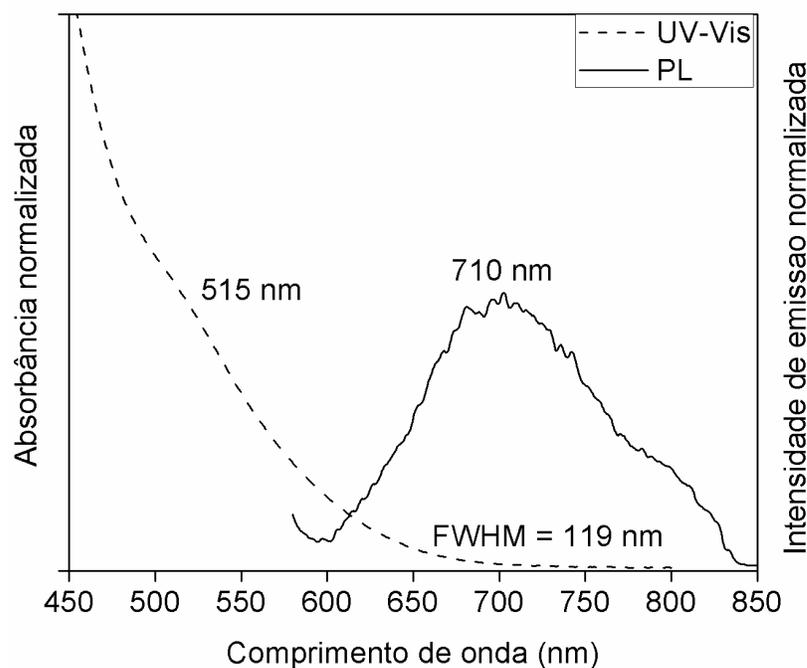
Observa-se, na Figura 30, que não houve *red shift* nas bandas de absorção e de emissão dos nanocristais de Ag_2Se obtidos em pH 12,0 com aumento do tempo de síntese de 20 para 60 min. Embora um intervalo de tempo maior possa ser necessário para que o crescimento quantizado de possíveis MSCs fosse comprovado, esse intervalo é o suficiente para se observar o crescimento homogêneo e *red shift* nas bandas de absorção e de emissão se os nanocristais obtidos fossem USNs, especialmente no caso da síntese 11, que foi realizada a 60 °C. Além disso, as bandas de emissão com máximo em 455 nm parecem ter sido bastante afetadas por defeitos de superfície, o que causou o alargamento dessas bandas e também das bandas de absorção.

Dentre as duas hipóteses – formação de MSCs ou formação de USNs – propostas para definir o tipo de nanocristais de Ag_2Se obtidos em pH 12,0, a primeira está em maior concordância

com os espectros de absorção e emissão obtidos. Contudo, não se descarta a obtenção de uma mistura de MSCs e de USNs de Ag_2Se . De toda forma, caracterizações adicionais, como HR-TEM e DRX, são necessárias para a confirmação de quaisquer conjecturas acerca dos nanocristais de Ag_2Se obtidos.

As seguintes condições experimentais levaram à maior intensidade de emissão do planejamento fatorial fracionário, que foi 20,3 u. a.: razões molares de MSA:Ag de 8:1 e Ag:Se de 10:1, temperatura ambiente (30 °C), pH 5,0 e agitação por 60 min. Essas condições foram escolhidas com base nas sínteses realizadas em pH 5,0, visto que o objetivo do trabalho se detém à otimização da fotoluminescência de QDs e as sínteses realizadas em pH 12,0 levaram à formação de MSCs ou de USNs. Na Figura 31, estão apresentados os espectros de absorção e emissão dos QDs de Ag_2Se obtidos nas condições mencionadas.

Figura 31 - Espectros de absorção (UV-Vis) e de emissão (PL) ($\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$) da suspensão de *quantum dots* de Ag_2Se estabilizados com MSA obtidos nas seguintes condições: razões molares de MSA:Ag 8:1 e Ag:Se 10:1, pH 5,0, temperatura de 30 °C e tempo de agitação de 60 min.



Fixando-se as razões molares de MSA:Ag e Ag:Se em 6:1 (valor aproximadamente intermediário àqueles estudados no planejamento fatorial fracionário), um estudo multivariado foi realizado para explorar melhor o efeito da temperatura de síntese em pH 5,0 e 12,0. As condições

experimentais desse estudo e os comprimentos de onda do primeiro máximo de absorção, máxima emissão e excitação (utilizado para obter os espectros de emissão) estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 - Condições experimentais e resultados das sínteses do estudo multivariado sobre o pH e a temperatura de síntese dos *quantum dots* de Ag_2Se estabilizados com MSA.

Síntese	pH	Temperatura (°C)	Tempo de síntese* (min)	λ_{abs} (nm)	λ_{ems} (nm)	λ_{exc} (nm)
19.1	5,0	5	20	595	816	484
19.2	5,0	5	60	597	798	484
21.1	5,0	25	20	592	816	484
21.2	5,0	25	60	592	819	484
23.1	5,0	45	20	592	820	484
23.2	5,0	45	60	592	820	484
20.1	12,0	5	20	305	456	350
20.2	12,0	5	60	305	456	350
22.1	12,0	25	20	305	458	350
22.2	12,0	25	60	305	455	350
24.1	12,0	45	20	305	454	350
24.2	12,0	45	60	305	451	350

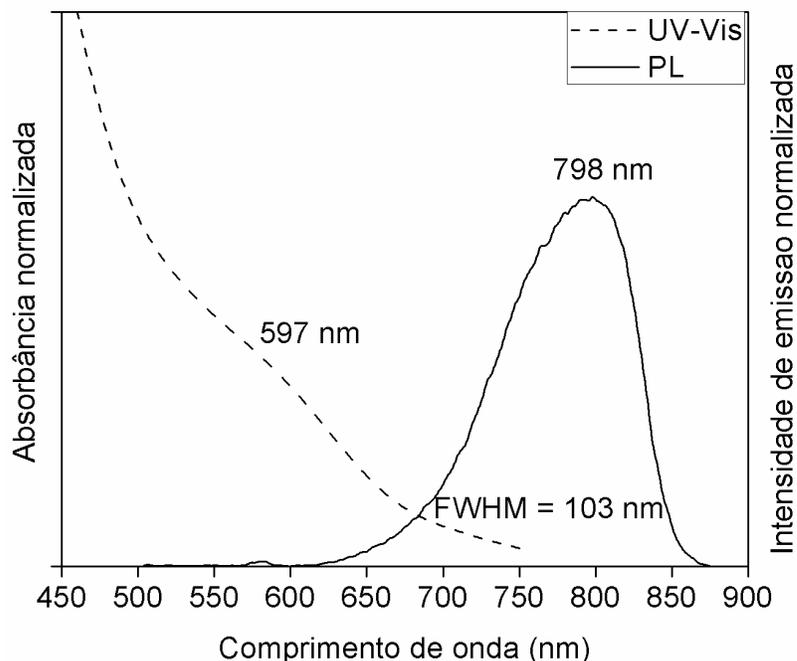
*Tempo em que as alíquotas foram retiradas da síntese.

Fonte: A autora.

Os nanocristais obtidos em pH 12,0 apresentaram perfis de absorção e emissão muito semelhantes, com primeiro máximo de absorção em 305 nm e pico de emissão em 455 nm, como aqueles obtidos no planejamento fatorial fracionário. Isso é um indicativo de que novamente foram obtidos MSCs ou USNs, mesmo em razões molares de MSA:Ag e Ag:Se diferentes daquelas estudadas anteriormente. As intensidades de emissão dos nanocristais de Ag_2Se obtidos em pH 12,0 aumentaram com o aumento da temperatura de síntese.

Os QDs obtidos em pH 5,0 no segundo planejamento fatorial apresentaram primeiro máximo de absorção e pico de emissão em média em torno de 593 e 815 nm, respectivamente. Embora as partículas quase não tenham crescido (posição constante das bandas de absorção e emissão) com variações na temperatura e no tempo, as intensidades de emissão aumentaram com a diminuição da temperatura. Isso indica que o aumento da temperatura provoca a formação de defeitos de superfície que diminuem a intensidade de emissão dos QDs de Ag_2Se sintetizados em pH 5,0. Os espectros de absorção e emissão das partículas com maior intensidade de emissão (87,8 u. a.), obtidas na síntese 19.2, estão apresentados na Figura 32.

Figura 32 - Espectros de absorção (UV-Vis) e emissão (PL) ($\lambda_{exc} = 484$ nm) da suspensão de *quantum dots* de Ag_2Se estabilizados com MSA obtidos nas seguintes condições: razões molares de MSA:Ag 6:1 e Ag:Se 6:1, pH 5,0, temperatura de 5 °C e tempo de agitação de 60 min.



Um planejamento fatorial completo 2^4 foi executado para investigar os efeitos da temperatura, de pH e razões molares de MSA:Ag e Ag:Se. A faixa de pH foi a mesma estudada nos planejamentos anteriores, uma vez que os resultados obtidos previamente não foram conclusivos sobre esse fator. Os resultados (intensidade de emissão e comprimentos de onda do primeiro máximo de absorção e de máxima emissão) do terceiro planejamento fatorial, bem como os comprimentos de onda de excitação utilizados para obter os espectros de emissão, estão apresentados na Tabela 21.

Verificou-se novamente a tendência das propriedades ópticas das partículas se dividirem em dois grupos de acordo com o pH da síntese. Portanto, os resultados obtidos foram tratados inicialmente considerando-se como resposta o comprimento de onda do primeiro máximo de absorção. Não houve variação significativa com o tempo e suas interações com outros fatores. Logo, somente os quatro fatores incluídos inicialmente no planejamento experimental foram avaliados. Os efeitos principais e interações, o erro padrão multiplicado pelo t de Student com 20 graus de liberdade e os limites de confiança estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 21 - Condições experimentais e resultados das sínteses do planejamento fatorial completo 2^4 delineado para as sínteses dos *quantum dots* de Ag_2Se estabilizados com MSA.

Síntese	Razão molar de MSA:Ag	Razão molar de Ag:Se	pH	Temperatura (°C)	Tempo de síntese* (min)	Intensidade de emissão (u. a.)	λ_{abs} (nm)	λ_{ems} (nm)	λ_{exc} (nm)
31.1	2:1	2:1	5,0	5	20	0	560	-	450
31.2	2:1	2:1	5,0	5	60	0	560	-	450
41.1	2:1	2:1	5,0	5	20	0	555	-	450
41.2	2:1	2:1	5,0	5	60	0	545	-	450
30.1	6:1	2:1	5,0	5	20	23	600	812	450
30.2	6:1	2:1	5,0	5	60	23	600	812	450
36.1	2:1	8:1	5,0	5	20	0	510	-	450
36.2	2:1	8:1	5,0	5	60	0	510	-	450
25.1	6:1	8:1	5,0	5	20	51	515	740	450
25.2	6:1	8:1	5,0	5	60	48	515	732	450
39.1	2:1	2:1	5,0	60	20	0	590	-	450
39.2	2:1	2:1	5,0	60	60	0	590	-	450
33.1	6:1	2:1	5,0	60	20	0	540	-	450
33.2	6:1	2:1	5,0	60	60	0	540	-	450
32.1	2:1	8:1	5,0	60	20	39	550	735	450
32.2	2:1	8:1	5,0	60	60	59	565	737	450
37.1	6:1	8:1	5,0	60	20	168	580	790	450
37.2	6:1	8:1	5,0	60	60	142	585	795	450
29.1	2:1	2:1	12,0	5	20	82	295	415	305
29.2	2:1	2:1	12,0	5	60	23	298	420	305
40.1	6:1	2:1	12,0	5	20	113	305	425	308
40.2	6:1	2:1	12,0	5	60	110	305	425	308
38.1	2:1	8:1	12,0	5	20	526	296	418	308
38.2	2:1	8:1	12,0	5	60	897	296	418	308
28.1	6:1	8:1	12,0	5	20	157	305	425	308
28.2	6:1	8:1	12,0	5	60	104	305	425	308
27.1	2:1	2:1	12,0	60	20	70	305	420	308
27.2	2:1	2:1	12,0	60	60	220	293	420	308
35.1	6:1	2:1	12,0	60	20	0	305	-	305
35.2	6:1	2:1	12,0	60	60	64	305	425	305
26.1	2:1	8:1	12,0	60	20	67	305	420	308
26.2	2:1	8:1	12,0	60	60	453	293	420	308
34.1	6:1	8:1	12,0	60	20	0	305	-	350
34.2	6:1	8:1	12,0	60	60	0	305	-	350
42.1	6:1	8:1	12,0	60	20	0	300	-	308
42.2	6:1	8:1	12,0	60	60	0	300	-	308

*Tempo em que as alíquotas foram retiradas da síntese.

Fonte: A autora.

Somente os efeitos das interações 1x2 e 1x3 não foram significativos, a 95% de confiança. O pH teve efeito significativamente maior que os demais fatores e interações, como já era esperado. O aumento do pH restringiu o crescimento dos nanocristais e causou a diminuição do comprimento de onda do primeiro máximo de absorção em média em 255 nm.

Tabela 22 - Estimativa dos efeitos principais e das interações dos fatores, para os resultados de comprimento de onda do primeiro máximo de absorção de *quantum dots* de Ag₂Se obtidos pelo planejamento fatorial completo 2⁴.

Fator	Efeito	Erro padrão x t	Limite de confiança inferior (-95%)	Limite de confiança superior (+95%)
Média	428,13	1,69	426,45	429,82
(1) Razão molar de MSA:Ag	6,50	3,34	3,16	9,84
(2) Razão molar de Ag:Se	-15,38	3,34	-18,72	-12,03
(3) pH	-255,25	3,34	-258,59	-251,91
(4) Temperatura	11,63	3,34	8,28	14,97
1x2	3,14	3,37	-0,23	6,52
1x3	-0,73	3,37	-4,11	2,64
1x4	-11,36	3,37	-14,73	-7,98
2x3	13,64	3,37	10,27	17,02
2x4	16,27	3,37	12,89	19,64
3x4	-11,86	3,37	-15,23	-8,48

Fonte: A autora.

Como os nanocristais obtidos têm propriedades ópticas muito diferentes entre si, dependendo do pH da síntese, além de novamente não ser possível estabelecer um único comprimento de onda de excitação para os dois grupos de QDs, o tratamento dos dados com intensidade de emissão como resposta foi feito separadamente para os resultados de acordo com o pH de síntese. Dessa forma, o efeito do pH não foi avaliado no planejamento experimental em discussão. Os efeitos, o erro padrão multiplicado pelo *t* de Student com 10 graus de liberdade e os limites de confiança estão apresentados na Tabela 23 para o pH 5,0 e na Tabela 24 para o pH 12,0.

Tabela 23 - Estimativa dos efeitos principais e das interações dos fatores, para os resultados de intensidade de emissão de *quantum dots* de Ag₂Se obtidos pelo planejamento fatorial completo 2⁴, com pH 5,0.

Fator	Efeito	Erro padrão x t	Limite de confiança inferior (-95%)	Limite de confiança superior (+95%)
Média	34,52	3,99	30,53	38,52
(1) Razão molar de MSA:Ag	44,64	7,99	36,65	52,63
(2) Razão molar de Ag:Se	57,57	7,99	49,58	65,56
(3) Temperatura	32,91	7,99	24,92	40,90
1x2	33,17	7,99	25,18	41,16
1x3	8,50	7,99	0,51	16,49
2x3	44,38	7,99	36,39	52,37
1x2x3	19,98	7,99	11,99	27,97

Fonte: A autora.

Todos os fatores e interações avaliados tiveram efeitos significativos, a 95% de confiança, sobre a intensidade de emissão dos QDs de Ag₂Se sintetizados em pH 5,0. O mesmo se pode afirmar sobre os nanocristais obtidos em pH 12,0, exceto as interações 1x3 e 1x2x3, que não foram significativas no intervalo de confiança avaliado.

Tabela 24 - Estimativa dos efeitos principais e das interações dos fatores, para os resultados de intensidade de emissão de *quantum dots* de Ag_2Se obtidos pelo planejamento fatorial completo 2^4 , com pH 12,0.

Fator	Efeito	Erro padrão x t	Limite de confiança inferior (-95%)	Limite de confiança superior (+95%)
Média	180,30	68,13	112,16	248,43
(1) Razão molar de MSA:Ag	-223,47	136,27	-359,73	-87,20
(2) Razão molar de Ag:Se	190,39	136,27	54,12	326,65
(3) Temperatura	-142,53	136,27	-278,80	-6,26
1x2	-196,69	136,27	-332,95	-60,42
1x3	37,18	136,27	-99,09	173,44
2x3	-148,85	136,27	-285,12	-12,58
1x2x3	123,38	136,27	-12,89	259,65

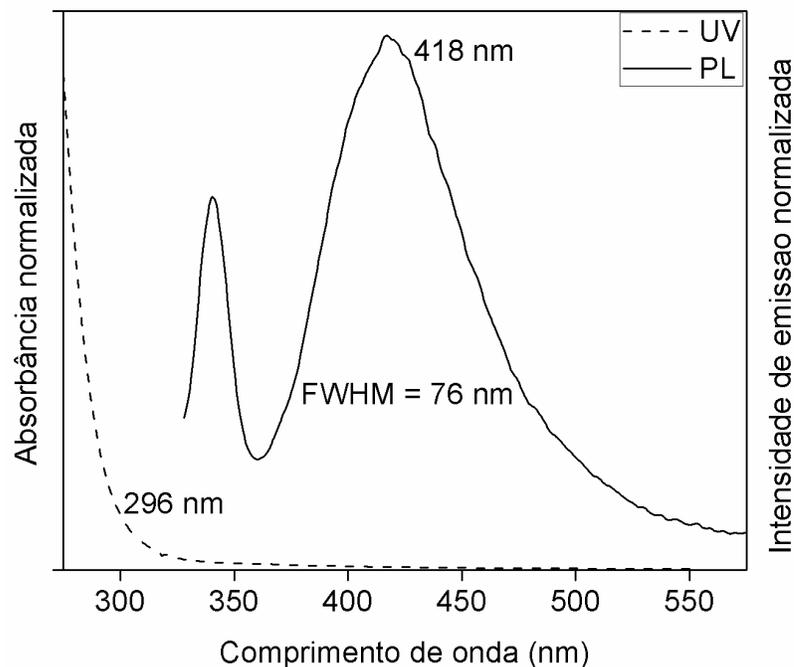
Fonte: A autora.

Os sinais dos efeitos de alguns fatores e interações foram diferentes de acordo com pH da síntese, o que indica que as propriedades ópticas dos nanocristais obtidos em pH 5,0 ou 12,0 são influenciados de formas diferentes pelos mesmos fatores. O aumento de temperatura e razão molar de MSA:Ag, por exemplo, em média provocam aumento na intensidade de emissão com pH 5,0 e diminuição com pH 12,0. Isso é mais uma evidência de que os tipos de nanocristais obtidos em pH 5,0 e 12,0 são bem diferentes.

Com pH 12,0, as condições experimentais que levaram à maior intensidade de emissão são razões molares de MSA:Ag e Ag:Se de 2:1 e 8:1, respectivamente, à temperatura de 5 °C. Essas condições correspondem às sínteses 38.1 e 38.2 (obtidas com tempo de síntese de 20 e 60 min, respectivamente), que originaram nanocristais de Ag_2Se com intensidade de emissão de 526 e 897 u. a., respectivamente. Os espectros de absorção e emissão da suspensão obtida na síntese 38.2 estão apresentados na Figura 33, onde a banda estreita de emissão em 340 nm pode ter sido ocasionada por artefatos.

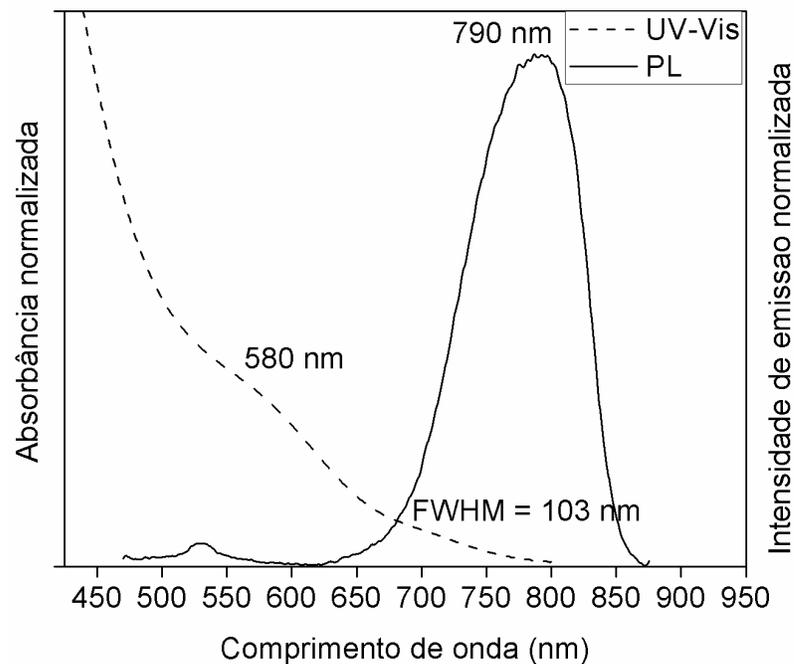
Os QDs de Ag_2Se sintetizados com pH 5,0, por sua vez, apresentaram máxima emissão de 168 u. a. e 142 u. a. com tempo de síntese de 20 e 60 min, respectivamente, com razões molares de MSA:Ag de 6:1 e Ag:Se de 8:1 e temperatura de 60 °C. Os espectros de absorção e de emissão dos QDs obtidos na síntese 37.1, que foi realizada sob as condições mencionadas com 20 min de síntese, estão apresentados na Figura 34.

Figura 33 - Espectros de absorção (UV) e emissão (PL) ($\lambda_{exc} = 308 \text{ nm}$) da suspensão de nanocristais de Ag_2Se estabilizados com MSA obtidos nas seguintes condições: razões molares de MSA:Ag 2:1 e Ag:Se 8:1, pH 12,0, temperatura de 5 °C e tempo de agitação de 60 min. A banda de emissão em 340 nm é atribuída a artefatos.



Fonte: A autora.

Figura 34 - Espectros de absorção (UV-Vis) e de emissão (PL) ($\lambda_{exc} = 450 \text{ nm}$) da suspensão de *quantum dots* de Ag_2Se estabilizados com MSA obtidos nas seguintes condições: razões molares de MSA:Ag 6:1 e Ag:Se 8:1, pH 5,0, temperatura de 60 °C e tempo de agitação de 20 min.



Fonte: A autora.

Embora a intensidade de emissão máxima dos nanocristais obtidos com pH 12,0 tenha sido maior do que a daqueles obtidos com pH 5,0, observa-se, pelos espectros de absorção e emissão, que o comportamento óptico dos QDs obtidos com pH 5,0 está mais próximo do esperado para QDs de Ag₂Se reportados na literatura [67,69,79]. Além disso, as partículas obtidas em pH 12,0, sejam MSCs ou USNs, não apresentam emissão na região NIR, além de que necessitam ser excitadas a 308 nm, o que pode excitar também a hemoglobina e proteínas, entre outras biomoléculas, e causar o aumento do sinal de fundo em aplicações biológicas desse material. Portanto, optou-se por investigar melhor o comportamento óptico dos QDs obtidos em pH mais próximo de 5,0.

Fixando-se a razão molar de Ag:Se em 8:1, com base nos melhores resultados em pH 5,0 do planejamento experimental anterior, a razão molar de MSA:Ag, o pH e a temperatura de síntese foram estudados no quarto planejamento fatorial, cujo domínio experimental foi centrado aproximadamente nas condições da síntese 37.1. As condições experimentais das sínteses, as intensidades de emissão e os comprimentos de onda do primeiro máximo de absorção e de máxima emissão dos QDs obtidos nesse planejamento estão apresentados na Tabela 25. Os espectros de emissão foram obtidos com excitação a 460 nm.

Tabela 25 - Condições experimentais e resultados das sínteses do planejamento fatorial completo 2³ delineado para as sínteses dos *quantum dots* de Ag₂Se estabilizados com MSA.

Síntese	Razão molar de MSA:Ag	pH	Temperatura (°C)	Tempo de síntese* (min)	Intensidade de emissão (u. a.)	λ_{abs} (nm)	λ_{ems} (nm)
43.1	5:1	5,0	40	20	21	580	793
43.2	5:1	5,0	40	60	22	577	763
51.1	7:1	5,0	40	20	71	567	805
51.2	7:1	5,0	40	60	72	567	811
44.1	5:1	7,0	40	20	0	692	-
44.2	5:1	7,0	40	60	0	692	-
46.1	7:1	7,0	40	20	0	550	-
46.2	7:1	7,0	40	60	0	550	-
49.1	6:1	6,0	60	20	17	564	723
49.2	6:1	6,0	60	60	11	573	730
53.1	5:1	5,0	80	20	47	590	815
53.2	5:1	5,0	80	60	44	590	825
45.1	7:1	5,0	80	20	87	578	789
45.2	7:1	5,0	80	60	69	575	809
47.1	5:1	7,0	80	20	0	694	-
47.2	5:1	7,0	80	60	0	712	-
48.1	7:1	7,0	80	20	0	805	-
48.2	7:1	7,0	80	60	0	805	-

*Tempo em que as alíquotas foram retiradas da síntese.

Fonte: A autora.

Embora não tenha sido um fator incluído inicialmente no planejamento, o tempo de síntese também teve seu efeito calculado, considerando-se como resposta a intensidade de emissão. Entretanto, o efeito principal do tempo de síntese e suas interações com outros fatores não foram estatisticamente significativas, a 95% de confiança. Os efeitos e interações dos demais fatores foram calculados e estão apresentados na Tabela 26, juntamente com o erro padrão multiplicado pelo t de Student com 9 graus de liberdade e os limites de confiança.

Tabela 26 - Estimativa dos efeitos lineares principais e das interações dos fatores, para os resultados de intensidade de emissão de *quantum dots* de Ag_2Se obtidos pelo planejamento fatorial completo 2^3 .

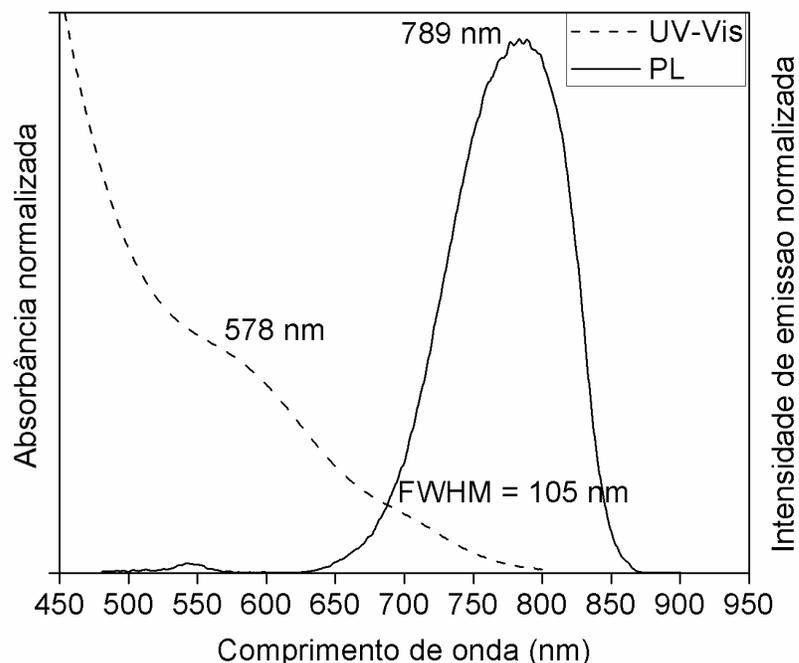
Fator	Efeito	Erro padrão x t	Limite de confiança inferior (-95%)	Limite de confiança superior (+95%)
Média	25,61	2,42	23,19	28,03
(1) Razão molar de MSA:Ag	20,63	5,13	15,49	25,76
(2) pH	-54,13	5,13	-59,26	-48,99
(3) Temperatura	7,63	5,13	2,49	12,76
1x2	-20,63	5,13	-25,76	-15,49
1x3	-4,38	5,13	-9,51	0,76
2x3	-7,62	5,13	-12,76	-2,49
1x2x3	4,38	5,13	-0,76	9,51

Fonte: A autora.

Os efeitos principais dos três fatores avaliados e as interações 1x2 e 2x3 foram estatisticamente significativos, a 95% de confiança. O efeito do pH se destacou em relação aos demais efeitos, seguido pelo efeito da razão molar de MSA:Ag. De acordo com as estimativas dos efeitos, as condições do planejamento fatorial 2^3 que levam ao aumento da intensidade de emissão são razão molar de MSA:Ag e temperatura em seus níveis superiores (7:1 e 80 °C, respectivamente) e pH em seu nível inferior (5,0). Essas condições correspondem àquelas das sínteses 45.1 e 45.2, cujas intensidades de emissão foram 87 e 69 u. a., respectivamente. Os espectros de absorção e de emissão dos QDs de Ag_2Se obtidos na síntese 45.1 estão apresentados na Figura 35.

Os perfis de absorção e emissão dos QDs de Ag_2Se obtidos na síntese 45.1 são muito semelhantes àqueles obtidos na síntese 37.1 do planejamento fatorial anterior. Porém a intensidade de emissão dos QDs da síntese 37.1 (168 u. a.) permanece sendo a maior de todos os planejamentos até então delineados para Ag_2Se nesta tese. Dessa forma, as seguintes condições foram estabelecidas como otimizadas para obter os QDs de Ag_2Se que serão caracterizados posteriormente: razões molares de MSA:Ag de 6:1 e Ag:Se de 8:1, pH 5,0, temperatura de 60 °C e agitação por 20 min.

Figura 35 - Espectros de absorção (UV-Vis) e emissão (PL) ($\lambda_{exc} = 460$ nm) da suspensão de *quantum dots* de Ag_2Se estabilizados com MSA obtidos nas seguintes condições: razões molares de MSA:Ag 7:1 e Ag:Se 8:1, pH 5,0, temperatura de 80 °C e tempo de agitação de 20 min.



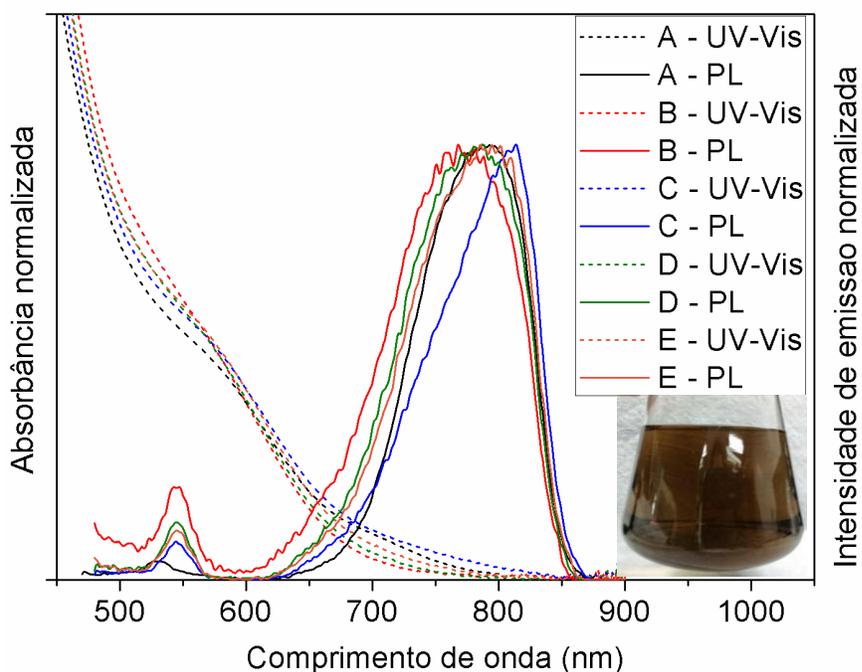
Fonte: A autora.

3.4.2 Caracterização óptica, estrutural e morfológica dos *quantum dots* de Ag_2Se estabilizados com MSA obtidos sob condições otimizadas

Cinco sínteses de QDs de Ag_2Se foram realizadas sob condições otimizadas a fim de verificar a reprodutibilidade da síntese. Os espectros normalizados de absorção e de emissão estão apresentados na Figura 36, onde as letras de A a E representam suspensões obtidas em sínteses distintas. Os valores de intensidade de emissão, FWHM da banda de emissão, comprimentos de onda do primeiro máximo de absorção e máxima emissão, obtidos para cada suspensão podem ser consultados no Apêndice D.

Os perfis de absorção das suspensões obtidas foram muito semelhantes, e o comprimento de onda médio do primeiro máximo de absorção, relacionado com o tamanho das partículas, foi 583 nm. O intervalo de confiança pequeno obtido (± 3 nm) é um indicativo de que as cinco sínteses resultaram a nanocristais de tamanhos médios muito semelhantes. A partir dos espectros de absorção, a energia do *band gap* direto desses nanocristais de Ag_2Se foi 2,58 eV, calculada a partir dos espectros de absorção pelo método gráfico de Tauc [57].

Figura 36 - Espectros de absorção (UV-Vis) e de emissão (PL) ($\lambda_{exc} = 460$ nm) de cinco suspensões de *quantum dots* de Ag_2Se estabilizados com MSA sintetizados sob as mesmas condições experimentais: razões molares de MSA:Ag 6:1 e Ag:Se 8:1, pH 5,0, temperatura de 60 °C e tempo de agitação de 20 min. A imagem inserida corresponde a uma fotografia da suspensão de *quantum dots* de Ag_2Se da síntese A irradiada com luz ambiente.



Fonte: A autora.

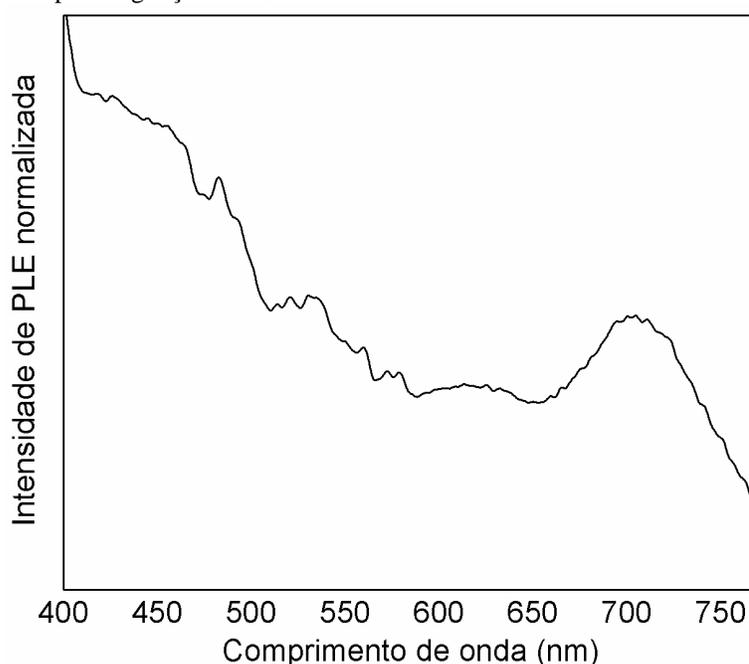
As bandas de emissão obtidas também foram semelhantes, exceto pela banda de emissão da suspensão C, que foi mais estreita. A intensidade de emissão obtida foi 109 u. a. (± 47 u. a.) no comprimento de onda de 789 nm (± 20 nm), com FWHM da banda de emissão de 109 nm (± 12 nm). Esses valores mencionados correspondem às médias \pm intervalos de confiança de 95% calculados pelos resultados das amostras das cinco sínteses.

Observa-se, ainda na Figura 36, que as bandas de emissão apresentaram várias proeminências, características de estados de energia de defeitos de superfície que aprisionam portadores de carga, resultando, principalmente, em relaxação não-radiativa [2,80,81]. O espectro de emissão da suspensão B foi a que mais apresentou tais proeminências, o que possivelmente fez com que esses QDs tivessem a menor intensidade de emissão e a maior FWHM em comparação às demais suspensões obtidas sob mesmas condições experimentais.

O espectro de PLE dos QDs de Ag_2Se da suspensão A, obtido com comprimento de onda de emissão de 790 nm, está apresentado na Figura 37. Pode-se verificar que esses QDs podem ser excitados com uma fonte com comprimento de onda de até aproximadamente 700 nm, região

espectral de energia suficientemente baixa que não induz a autofluorescência de tecidos vivos em possíveis aplicações biológicas [62].

Figura 37 - Espectro de excitação fotoluminescente ($\lambda_{\text{exc}} = 790 \text{ nm}$) de *quantum dots* de Ag_2Se estabilizados com MSA sintetizados sob as seguintes condições experimentais: razões molares de MSA:Ag 6:1 e Ag:Se 8:1, pH 5,0, temperatura de 60 °C e tempo de agitação de 20 min.

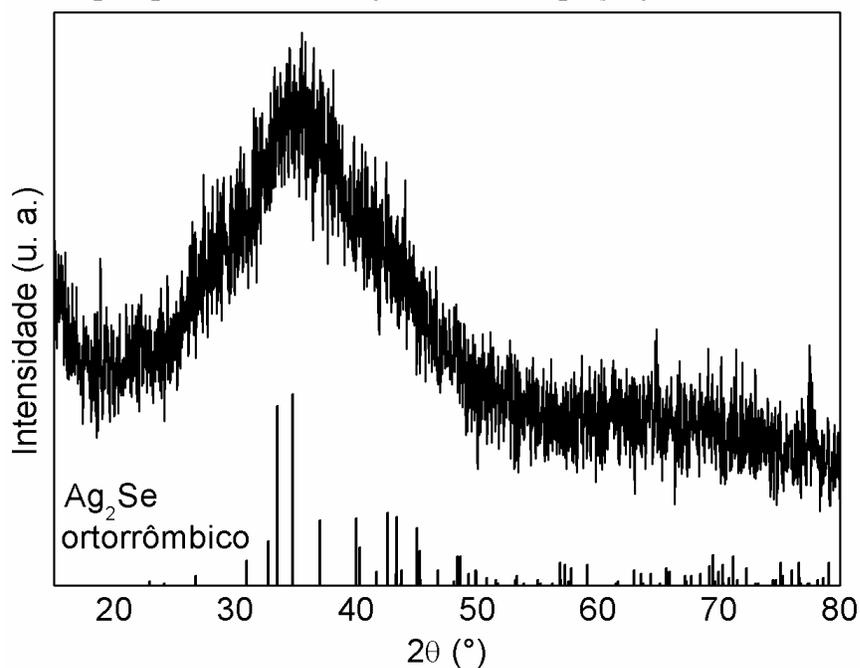


Fonte: A autora.

Os padrões de DRX da nanoestrutura de Ag_2Se (QDs das suspensões B, C, D e E) obtidos sob condições otimizadas, conforme apresentado na Figura 38, revelam a estrutura ortorrômbica dos nanocristais ($\beta\text{-Ag}_2\text{Se}$), que é geralmente a fase estável a temperaturas inferiores a 133 °C [82,83]. A banda larga em 2θ de 35° pode ser atribuída à sobreposição de picos nessa região, em concordância com os padrões de difração de naumanita a baixa temperatura (grupo espacial $P2_12_12_1$) [82]. A banda alargada pode ser devido ao tamanho pequeno das partículas e à baixa cristalinidade.

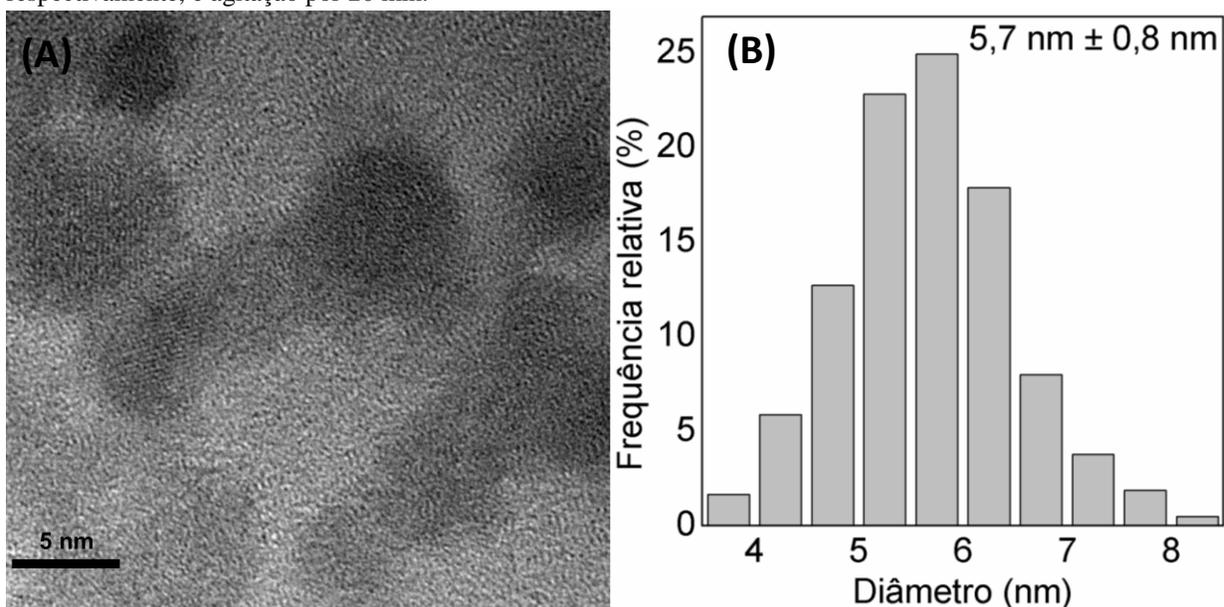
Imagens obtidas por HR-TEM (Figura 39-A) confirmam que as nanopartículas de Ag_2Se apresentaram forma esférica com diâmetro médio de $5,7 \text{ nm} \pm 0,8 \text{ nm}$ (Figura 39-B), semelhante ao tamanho reportado na literatura para QDs de Ag_2Se obtidos em meio aquoso [70]. O coeficiente de variação calculado foi de 14%, o que atesta a distribuição homogênea de tamanho dos nanocristais. O raio dos nanocristais de Ag_2Se (2,8 nm) é menor que o a_B para Ag_2Se (2,9 nm), o que confirma que os QDs obtidos estão em regime de confinamento quântico forte [84].

Figura 38 - Padrões de DRX de *quantum dots* de Ag_2Se estabilizados com MSA sintetizados a $60\text{ }^\circ\text{C}$ e pH 5,0, com razões molares de MSA:Ag e Ag:Se de 6:1 e 8:1, respectivamente, e agitação por 20 min.



Fonte: A autora.

Figura 39 - (A) Micrografia de HR-TEM e (B) distribuição de tamanho de partícula dos *quantum dots* de Ag_2Se estabilizados com MSA sintetizados a $60\text{ }^\circ\text{C}$ e pH 5,0, com razões molares de MSA:Ag e Ag:Se de 6:1 e 8:1, respectivamente, e agitação por 20 min.



Fonte: A autora.

3.5 CONCLUSÃO

Utilizando-se otimização multivariada, foi obtido um procedimento *one-pot* rápido e reprodutível para sintetizar QDs de Ag₂Se estabilizados com MSA, em meio aquoso e atmosfera ambiente. As condições experimentais que levaram à fluorescência otimizada foram razões molares de MSA:Ag de 6:1 e Ag:Se de 8:1, pH 5,0, temperatura de 60 °C e agitação por 20 min. Os QDs obtidos sob essas condições otimizadas apresentaram absorção em 583 nm e emissão no início da região NIR, em 789 nm, com FWHM da banda de emissão de 109 nm. A intensidade máxima de emissão obtida foi em média 109 u. a.

Os QDs de Ag₂Se estabilizados com MSA apresentaram estrutura cristalina ortorrômbica, confirmada pelos padrões de DRX, com forma esférica e tamanho médio de 5,7 nm observados por micrografias de HR-TEM. O tamanho das partículas confirma que os QDs de Ag₂Se obtidos estão em regime de confinamento quântico forte, e a energia do *band gap* calculada foi de 2,58 eV.

Não foi possível determinar o QY dos QDs obtidos sob condições otimizadas devido à indisponibilidade de um corante de referência com excitação e emissão na mesma região dos QDs de Ag₂Se sintetizados. Dessa forma, não foi possível comparar diretamente a fotoluminescência dos QDs obtidos com os resultados reportados na literatura. Contudo, o procedimento proposto nesta tese apresenta algumas vantagens em relação aos trabalhos publicados para obtenção de QDs de Ag₂Se em meio aquoso, por ser rápido e reprodutível e poder ser realizado em temperatura branda e atmosfera ambiente, diferentemente dos trabalhos de Gu *et al.* [67] e Che *et al.* [69], que requerem temperatura de 90 °C e atmosfera inerte de N₂. O procedimento de Tan *et al.* [70], que reporta os melhores resultados publicados até o momento, embora seja realizado em temperatura e atmosfera ambientes, não apresenta detalhes (como razões molares de MSA:Ag e Ag:Se e pH) que possibilitem a reprodução e compreensão do procedimento.

4 FATORAÇÃO DE DADOS DE ORDEM SUPERIOR DE FLUORESCÊNCIA PARA AVALIAR O PROCESSO DE CONJUGAÇÃO DE PROTEÍNAS A *QUANTUM DOTS*

4.1 INTRODUÇÃO

A superfície ativa dos QDs possibilita sua conjugação com uma variedade de biomoléculas como proteínas, peptídeos, DNA, etc., formando nanopartículas híbridas inorgânico-biológicas com as características ópticas excepcionais dos QDs e as funções bioquímicas das moléculas conjugadas. Esse processo é denominado bioconjugação [5,17].

A conjugação de proteínas a QDs pode ser efetuada por adsorção ou por ligação covalente. Embora a bioconjugação por adsorção seja um processo fácil e direto que não envolve agentes de acoplamento ou reações químicas, a bioconjugação por ligação covalente é a estratégia mais utilizada porque permite controlar efetivamente a orientação e a quantidade das biomoléculas conjugadas aos QDs [5].

Independentemente da estratégia de conjugação empregada, é importante caracterizar os bioconjugados obtidos a fim de garantir uma performance reprodutível e controlada na aplicação pretendida [17,85]. As técnicas de caracterização de bioconjugados, em sua maioria, se baseiam em técnicas aplicadas à caracterização de nanomateriais, e podem ser agrupadas em técnicas de separação, espalhamento, espectroscopia, microscopia e térmicas [85]. Dependendo do objetivo da aplicação, do nanomaterial e da biomolécula, algumas caracterizações podem ser mais importantes que outras e, portanto, não há consenso sobre as caracterizações essenciais a serem realizadas. Dessa forma, a caracterização completa requer a combinação de várias técnicas, e a validação definitiva do sucesso da bioconjugação certamente é a funcionalidade na aplicação desejada [85].

Muitas das técnicas de caracterização de bioconjugados, além de serem laboriosas e/ou onerosas, requerem que a amostra seja submetida a métodos de preparo previamente às análises, tais como a secagem, purificação ou suspensão em líquidos ultrapuros, os quais podem interferir nas propriedades dos bioconjugados e levar à interpretação errônea dos resultados [85]. Nesse contexto, ferramentas da quimiometria serão utilizadas, no presente trabalho, no tratamento de dados de matrizes de excitação-emissão de fluorescência (EEMs) de conjugados de proteínas e QDs para auxiliar na confirmação da ligação biomolécula-nanomaterial e acompanhar a conjugação com o tempo, dispensando métodos laboriosos de preparo de amostra e análise.

Embora ferramentas quimiométricas – especialmente métodos de ordem superior – não sejam frequentemente aplicadas no estudo de sistemas envolvendo QDs, há algumas publicações nesse sentido abrangendo controle de síntese, imageamento *in vivo*, microscopia de luminescência e nanossensores [86]. Contudo, até o momento, não há métodos baseados em dados de ordem superior de fluorescência para caracterizar bioconjugados de QDs.

A análise de EEMs é a forma mais comum de se obter dados de ordem superior a partir da fluorescência de QDs, e o tratamento desses dados com métodos de ordem superior pode proporcionar a “vantagem de segunda ordem”, isto é, a calibração de analitos mesmo na presença de compostos desconhecidos que não foram incluídos no conjunto de calibração [24].

Leitão, Gonçalves e da Silva utilizaram métodos de decomposição de dados de ordem superior baseados em PARAFAC para estudar o efeito do pH e da concentração de íons Hg^{2+} sobre EEMs de QDs de carbono funcionalizados com NH_2 -polietilenoglicol e *N*-acetilcisteína [87]. Gonçalves, Mendonça e da Silva sintetizaram e aplicaram QDs de CdTe estabilizados com glutatona como nanossensores para determinar íons Pb^{2+} em soluções aquosas [88]. O modelo PARAFAC foi utilizado para decompor as EEMs de QDs na presença de diferentes concentrações de Pb^{2+} [88].

Leitão, Tauler e da Silva estudaram o efeito da concentração de íons Hg^{2+} na supressão de fluorescência de nanocompósitos de QDs de carbono e o efeito da força iônica na EEM de nanocompósitos de QDs de CdS. Os autores utilizaram Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternantes (MCR-ALS, do inglês *Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares*) para decompor os dois conjuntos de EEMs dos QDs de carbono e CdS e concluíram que esses nanocompósitos de QDs apresentam potencial como nanossensores de Hg^{2+} e força iônica [89].

4.2 OBJETIVOS

O presente capítulo propõe a extração de informações subjacentes do processo de bioconjugação de proteínas a QDs a partir do tratamento de dados de ordem superior de fluorescência, a fim de auxiliar na confirmação da ligação biomolécula-nanomaterial e acompanhar a evolução temporal da conjugação. Os seguintes objetivos específicos são propostos:

- Avaliar métodos de pré-processamento e fatorar separadamente os dados das regiões espectrais de fluorescência das proteínas e dos QDs;
- Acoplar e fatorar os dados pré-processados das duas regiões espectrais;
- Comparar as informações extraídas a partir dos perfis dos fatores recuperados com os resultados obtidos por um método de caracterização disponível na literatura.

4.3 METODOLOGIA

4.3.1 Materiais

Todos os materiais foram usados como recebidos sem purificação adicional, e todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida em um sistema de deionização (resistividade de 18,2 M Ω a temperatura ambiente). Foram utilizados os seguintes reagentes: cloreto de cádmio (CdCl₂, 99,99% - Sigma-Aldrich Co./ EUA), telurito de sódio (Na₂TeO₃, 99% - Sigma-Aldrich Co./EUA), borohidreto de sódio (NaBH₄, 98% - Sigma-Aldrich Co./EUA) e ácido mercaptossuccínico – (MSA, 97% - Sigma-Aldrich Co./EUA), hidróxido de sódio (NaOH, 97% - Dinâmica Química Contemporânea Ltda/Brasil), sulfato de quinina (Vetec Química Fina Ltda/Brasil), cloreto de sódio (NaCl, >99,5% - Química Moderna Industria e Comércio Eireli/Brasil), cloreto de potássio (KCl, >99% - CRQ Produtos Químicos Eireli/Brasil), fosfato de sódio dibásico di-hidratado (Na₂HPO₄.2H₂O, >99% - Vetec Química Fina Ltda/Brasil), fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄, >99% - Vetec Química Fina Ltda/Brasil), cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, >98% - Honeywell Fluka™/EUA), 1-hidroxi-2,5-pirrolidinadiona – usualmente nomeada de N-hidroxissuccinimida – (NHS, 98% - Sigma-Aldrich Co./EUA), 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol (Tris base, >99% - HiMedia Laboratories Pvt. Ltd./Índia), anticorpo monoclonal Anti-A produzido em camundongos (Lorne Laboratories Ltd./Reino Unido).

4.3.2 Síntese e caracterização óptica dos *quantum dots* de CdTe

Soluções aquosas de CdCl₂ 0,005 mol L⁻¹ e de Na₂TeO₃ 0,02 mol L⁻¹ foram utilizadas como precursores de Cd e de Te, respectivamente, e o MSA foi empregado como agente estabilizante.

Os QDs de CdTe foram obtidos utilizando-se o procedimento descrito no subitem 2.3.2, com as seguintes condições experimentais: razões molares de MSA:Cd, Cd:Te e NaBH₄:Te de 6:1, 8:1 e 30:1, respectivamente, pH 5,1, temperatura de 100 °C e tempo de síntese de 7 h. A atmosfera do balão, contendo a solução MSA–Cd²⁺, foi saturada com gás nitrogênio por 15 min previamente à adição da solução de Na₂TeO₃ e durante a primeira hora da síntese. O procedimento de síntese de QDs de CdTe foi adaptado a partir do procedimento otimizado para síntese de QDs de CdSe descrito nesta tese e foi realizado no Laboratório Integrado de Nanoestruturas e Compostos de Coordenação do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco.

As medidas de absorção, emissão e excitação, com a amostra diluída na proporção de 1:17 em água, e o QY da suspensão de QDs de CdTe foram obtidos no quinto dia após a síntese, pelos procedimentos descritos no subitem 2.3.3. O diâmetro médio dos nanocristais foi estimado pela Equação 16 proposta por Yu *et al.* [90], em que λ corresponde ao comprimento de onda do primeiro máximo de absorção.

$$D = (9,8127 \times 10^{-7})\lambda^3 - (1,7147 \times 10^{-3})\lambda^2 + (1,0064)\lambda - (194,84) \quad \text{Equação 16}$$

A absortividade molar (em cm⁻¹ mol⁻¹ L) da suspensão de QDs de CdTe foi estimada pela Equação 17 [90], que se baseia no diâmetro das partículas (em nm) calculado pela Equação 16. Com a absortividade molar e a absorbância no comprimento de onda do primeiro máximo de absorção, foi calculada a concentração molar de QDs em suspensão pela lei de Lambert-Beer.

$$\varepsilon = 10043(D)^{2,12} \quad \text{Equação 17}$$

4.3.3 Preparo e análise das amostras e estruturação dos conjuntos de dados

As amostras foram preparadas nas dependências do Grupo de Quimiometria e Tecnologia Analítica do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade de Copenhague (Dinamarca), com a suspensão de QDs de CdTe (com pH 5,5, ajustado com uma solução concentrada de MSA uma semana antes do preparo das amostras), Anti-A concentrado e soluções de EDC (0,002 mol L⁻¹), NHS (0,01 mol L⁻¹) e Tris base (0,1 mol L⁻¹). Solução tampão fosfato-salino (PBS) 0,01 mol L⁻¹ com pH 7,4 foi utilizada como diluente para as soluções de EDC, NHS,

Tris base e MSA, e foi preparada em meio aquoso com a seguinte composição: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$), NaCl ($0,137 \text{ mol L}^{-1}$), KCl ($0,0027 \text{ mol L}^{-1}$) e KH_2PO_4 ($0,0018 \text{ mol L}^{-1}$). Após o preparo, a solução PBS foi conservada a 8°C e utilizada durante, no máximo, 2 meses.

A composição de cada amostra e a sequência de adição dos componentes estão esquematizadas na Figura 40. Os códigos iniciados com “QD” representam amostras que contêm QDs, enquanto os códigos iniciados com “CT” representam os controles negativos. As amostras com códigos terminados com o mesmo número têm quase a mesma composição, apenas substituindo os QDs por PBS nos controles negativos. Os números entre parênteses após os códigos das amostras representam a sequência registrada no conjunto de dados.

Figura 40 - Esquema do preparo das amostras: os retângulos sombreados com números ordinais representam a presença e a sequência de adição do respectivo componente.

Amostra	QD	PBS	EDC	NHS	Anti-A	Tris base
CT-1 (1)		1º				
CT-2 (2)		1º				2º
CT-3 (3)		1º	2º	3º		
CT-4 (4)		1º	2º	3º		4º
CT-5 (5)		1º			2º	
CT-6 (6)		1º	2º	3º	4º	
CT-7 (7)		1º	2º	3º	4º	5º
CT-8 (8)		1º	2º	3º	5º	4º
QD-1 (9)	1º	2º				
QD-2 (10)	1º	2º				3º
QD-3 (11)	1º		2º	3º		
QD-4 (12)	1º		2º	3º		4º
QD-5 (13)	1º	2º			3º	
QD-6 (14)	1º		2º	3º	4º	
QD-7 (15)	1º		2º	3º	4º	5º
QD-8 (16)	1º		2º	3º	5º	4º

Fonte: A autora.

As amostras abrangem as composições de todas as etapas do processo de conjugação de proteínas a QDs carboxilados tanto por adsorção quanto por ligação covalente em duas etapas. Os componentes foram adicionados nas sequências representadas por números ordinais na Figura 40, com agitação branda por 10 min entre cada adição e intervalo de repouso de 24 h antes da adição de Tris base nas respectivas amostras que o continham. Considerando-se um volume fixo da suspensão de QDs, os demais componentes foram adicionados nas seguintes proporções (v/v):

QD:EDC:NHS 2:1:1, QD:Anti-A 50:1 e QD:Tris base 10:1. Nas amostras que não continham QD, EDC e NHS, esses foram substituídos pelos seus respectivos volumes de PBS. Após o preparo, as amostras foram acondicionadas a 8 °C.

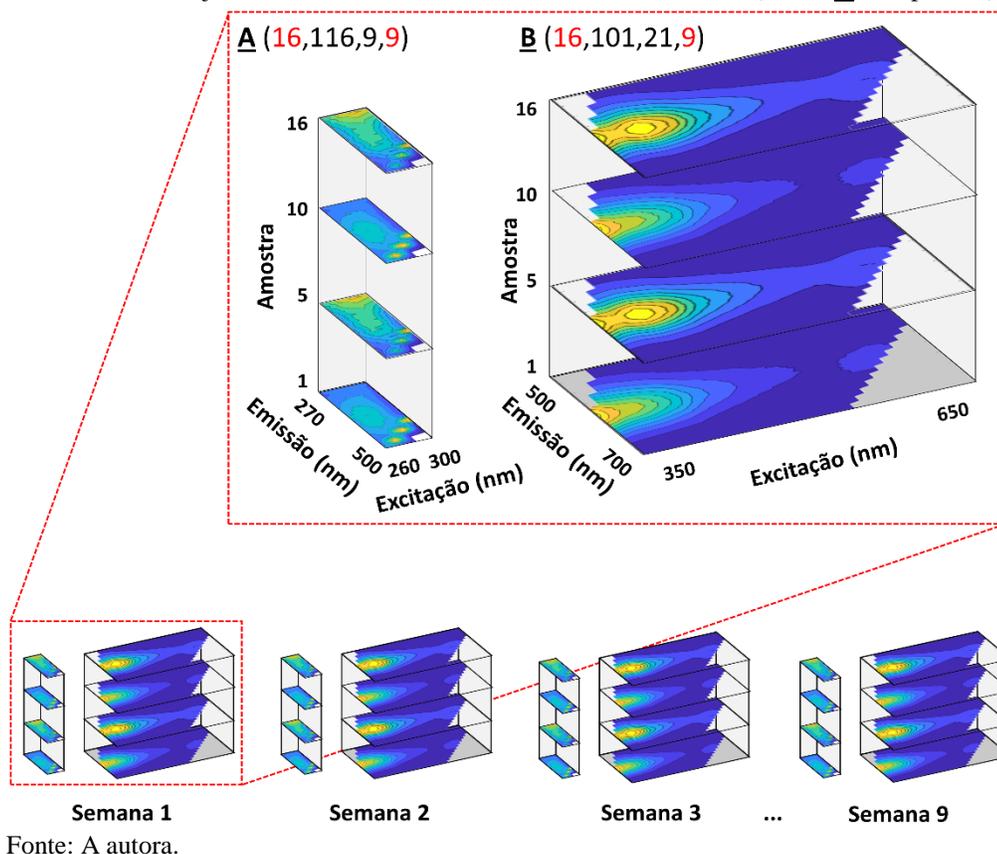
As 16 amostras foram diluídas na proporção de 1:9 em água, para um volume total de 1800 µL, no momento de cada análise. As EEMs foram obtidas utilizando-se um espectrômetro de fluorescência Edinburgh Instruments FS 920 (Reino Unido) do Grupo de Quimiometria e Tecnologia Analítica do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade de Copenhague (Dinamarca), com uma cubeta de quartzo apropriada com caminho óptico de 10 mm. Com base em testes exploratórios realizados previamente, alguns parâmetros operacionais – tempo de permanência em cada comprimento de onda, configurações do foco e largura das fendas de excitação e emissão – foram otimizados para maximizar o sinal analítico separadamente em duas regiões espectrais: a faixa inferior, onde se observa a fluorescência de proteínas, e a faixa superior, correspondente à região de fluorescência dos QDs de CdTe sintetizados.

As EEMs para a faixa inferior foram compostas pelos espectros de emissão coletados de 270 a 500 nm (com incrementos de 2 nm) após excitação de 260 a 300 nm (com incrementos de 5 nm). Para as EEMs da faixa superior, os espectros de emissão foram registrados de 500 a 700 nm (com incrementos de 2 nm) após excitação de 350 a 650 nm (com incrementos de 15 nm). As EEMs foram obtidas semanalmente a partir de 24 h após a conclusão do preparo das amostras, durante 9 semanas. Dessa forma, obteve-se um tensor com 4 modos para cada região espectral, com as dimensões $I \times J \times K \times L$ correspondentes, respectivamente, a amostras, comprimentos de onda de emissão (nm), comprimentos de onda de excitação (nm) e tempos (semana). A estrutura dos tensores das faixas inferior e superior está esquematizada na Figura 41.

4.3.4 Pré-processamento e tratamento de dados

Os dados foram pré-processados separadamente para cada região espectral para minimizar os efeitos dos espalhamentos Raman e Rayleigh nas EEMs, que são os principais problemas que afetam dados de fluorescência. Dentre os métodos ou estratégias que têm sido propostos na literatura [91], os seguintes foram testados: subtração do sinal do branco (solução PBS), inserção de NaN (do inglês *Not a Number*, representação de valores que não são reais ou números complexos matematicamente irrepresentáveis) e interpolação dos espectros.

Figura 41 - Estrutura dos conjuntos de dados de fluorescência das faixas inferior (tensor **A**) e superior (tensor **B**).

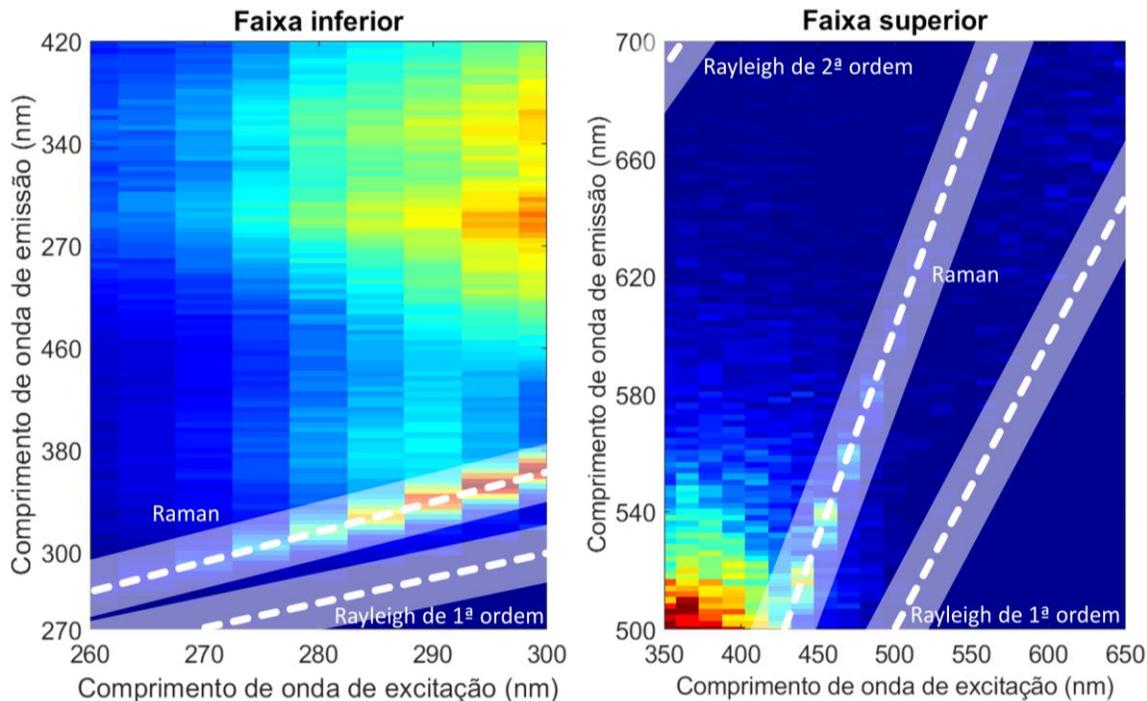


Tanto para inserção de valores ausentes quanto para interpolação, foi necessário definir a região onde os espalhamentos são esperados. O espalhamento elástico de luz, ou espalhamento Rayleigh, tem a mesma frequência da radiação excitante: o espalhamento de primeira ordem é esperado em $\lambda_{ems} = \lambda_{exc}$, e o de segunda ordem, em $\lambda_{ems} = 2\lambda_{exc}$. O espalhamento Raman correspondente às vibrações de estiramento da água, por sua vez, ocorre ao redor de 3500 cm^{-1} [92] e pode ser relacionado com os comprimentos de onda de excitação e de emissão (nm) pela Equação 18. As regiões dos espalhamentos nas EEMs estão representadas na Figura 42, para as duas faixas espectrais estudadas. As larguras das regiões dos espalhamentos foram variadas de 0 a 15 nm para Raman e de 0 a 20 nm para Rayleigh.

$$\lambda_{ems} = \left(\left(\frac{1}{\lambda_{exc}} \right) \times 10^7 - 3500 \right)^{-1} \times 10^7$$

Equação 18

Figura 42 - Esquema do espalhamento que ocorre nas EEMs das faixas inferior e superior.



Fonte: A autora.

Com a finalidade de selecionar o melhor pré-processamento para cada faixa espectral das EEMs, modelos PARAFAC com 2 a 5 componentes foram construídos com os dados pré-processados por cada método e para cada combinação de larguras das regiões dos espalhamentos. Em seguida, 20 modelos PARAFAC com 2 a 5 componentes foram obtidos para cada faixa espectral, usando os conjuntos de dados obtidos pelos pré-processamentos selecionados como melhores.

As estimativas iniciais dos pesos para cada modelo PARAFAC foram definidas com base no melhor ajuste de 10 execuções rápidas (limitadas a 80 iterações) do algoritmo ALS. Em seguida, cada modelo foi ajustado até que qualquer um dos seguintes critérios de parada fosse atingido: a) número de iterações do algoritmo maior que 20000; b) variação relativa da função de custo menor que $1,0 \times 10^{-6}$; c) variação absoluta da função de custo menor que $1,0 \times 10^{-12}$; d) tempo de cálculo superior a 3600 s. A restrição de não-negatividade foi imposta aos 4 modos.

Posteriormente, os dados pré-processados das duas faixas espectrais foram acoplados e fatorados utilizando-se o modelo ACMTF. O acoplamento dos tensores das faixas inferior ($\underline{\mathbf{A}}(16,116,9,9)$) e superior ($\underline{\mathbf{B}}(16,101,21,9)$) foi feito pelo modo das amostras (primeiro modo) e dos tempos (quarto modo), resultando no tensor $\underline{\mathbf{C}}(16,116,9,9,101,21)$, e foi imposta a restrição de

não-negatividade a todos os modos. 20 modelos PARAFAC com 3 a 5 componentes foram obtidos com o tensor $\underline{\mathbf{C}}$ utilizando-se o algoritmo de Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno com memória limitada para otimização restrita por limites (L-BFGS-B, do inglês *Limited-Memory Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno Method for Bound-Constrained Optimization*). As iterações do algoritmo foram limitadas a 5000 e o parâmetro de penalidade β foi definido como 0,001 para ambos os pesos σ e λ . Os demais parâmetros do algoritmo não foram modificados [31].

O número de componentes dos modelos PARAFAC foi escolhido com base na variância explicada pelo modelo, por indicações algorítmicas, pela análise *split-half* com o modo das amostras e pela inspeção visual dos perfis recuperados de cada componente. As amostras foram divididas em dois subconjuntos, representados abaixo, para a análise *split-half*:

- Subconjunto 1: amostras CT-1, CT-4, CT-6, CT-7, QD-2, QD-3, QD-5, QD-8;
- Subconjunto 2: amostras CT-2, CT-3, CT-5, CT-8, QD-1, QD-4, QD-6, QD-7.

O tratamento quimiométrico dos dados foi realizado utilizando-se códigos escritos pela autora com o *software* MATLAB[®] R2018b (MathWorks, EUA). As funções “flucut” (usada para o pré-processamento) e “PARAFAC” foram obtidas do PLS_Toolbox (Eigenvector Research Inc., EUA), e a função “acmtf_opt_v2” do CMTF_Toolbox foi gentilmente cedida por E. Acar [31,93].

As informações extraídas a partir dos fatores recuperados por PARAFAC foram comparadas com os resultados obtidos por um método óptico de caracterização de bioconjugados disponível na literatura [17]. Esse método se baseia na detecção da fluorescência de QDs de amostras contendo os bioconjugados e na ausência de sinal em amostras que não contêm os bioconjugados. Mais detalhes sobre esse método, que será utilizado como referência para validar a interpretação dos resultados da metodologia proposta, podem ser encontrados em Carvalho *et al.* [17].

As análises pelo método de referência foram realizadas em semanas alternadas a partir de 24 h após a conclusão do preparo das amostras. Cada amostra foi analisada em triplicata (com 50 μL da amostra em cada poço), utilizando-se microplacas em poliestireno para fluorescência com 96 poços de meia área. Após a adição das amostras aos poços, a microplaca foi embalada com Parafilm M[®] e incubada a 37 °C por 2 h. Em seguida, a microplaca foi lavada três vezes com 100 μL de PBS por poço e analisada com um leitor de microplacas multimodo Molecular Devices SpectraMax M5e (EUA) do Grupo de Bioquímica Vegetal do Departamento de Ciências Vegetais e Ambientais da Universidade de Copenhague (Dinamarca). As leituras foram feitas no modo de

fluorescência, em duplicata, com excitação em 350 nm e medição da intensidade de emissão em 605 nm. Os resultados de emissão para cada amostra foram calculados pela média da duplicata de leituras e da triplicata de poços.

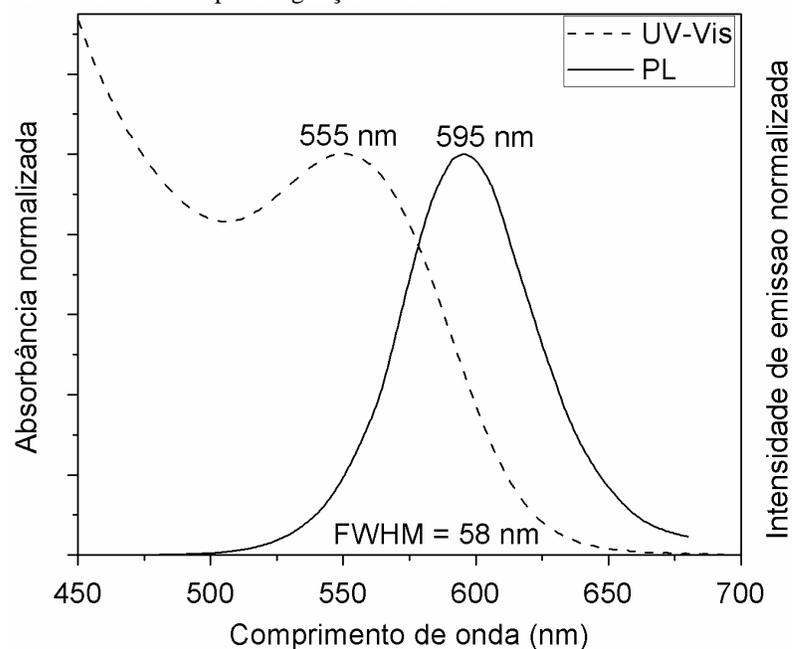
A fluorescência relativa das amostras QD-5, QD-6, QD-7 e QD-8 (as únicas amostras que contêm concomitantemente QDs e Anti-A e, portanto, as únicas em que se espera obter bioconjugados) foi calculada pela Equação 19 [17], em que “FL bioconjugado” corresponde ao sinal da amostra contendo os bioconjugados e “FL controle” é a média do sinal das amostras que não contêm bioconjugados, isto é, todas as amostras exceto QD-5, QD-6, QD-7 e QD-8.

$$\text{Fluorescência relativa (\%)} = \frac{FL \text{ bioconjugado} - FL \text{ controle}}{FL \text{ controle}} \quad \text{Equação 19}$$

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os QDs de CdTe estabilizados com MSA foram obtidos utilizando-se as melhores condições de síntese apresentadas no capítulo 2 desta tese, com algumas modificações baseadas na experiência do nosso grupo de pesquisa. Os espectros de absorção e emissão dos QDs sintetizados estão apresentados na Figura 43, e o espectro de excitação pode ser encontrado no Apêndice E.

Figura 43 - Espectros de absorção (UV-Vis) e de emissão (PL) ($\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$) da suspensão de *quantum dots* de CdTe estabilizados com MSA obtidos nas seguintes condições: razão molar de MPA:Cd 6:1, razão molar de Cd:Te 8:1, pH 5,1, temperatura de 100 °C e tempo de agitação de 7 h.

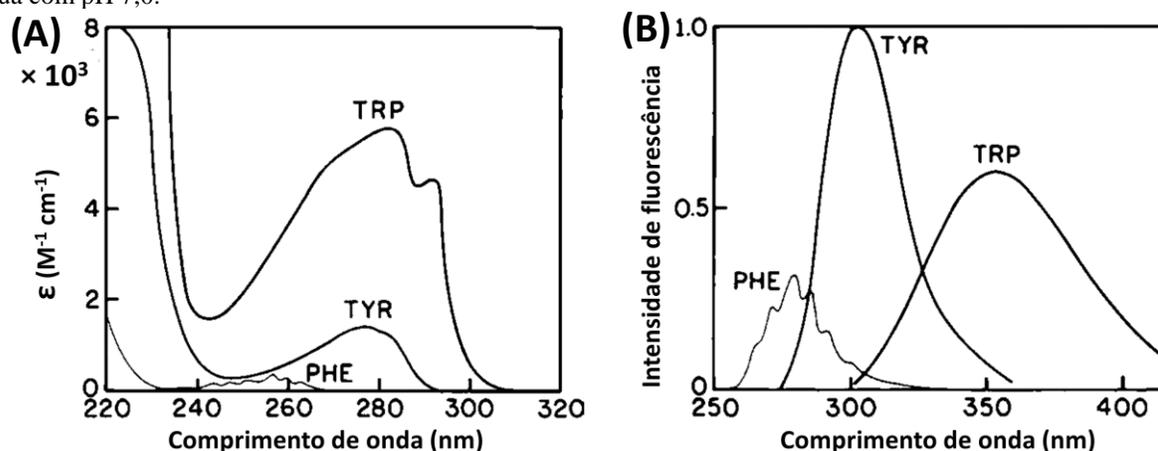


Os QDs de CdTe apresentaram primeiro máximo de absorção em 555 nm e máxima emissão em 595 nm, com FWHM de 58 nm. O QY dos QDs foi de 22,3%, com uma estimativa de tamanho médio das partículas de 3,3 nm. Esses resultados são equivalentes ao comportamento óptico e ao tamanho experimental encontrados em trabalhos da literatura sobre QDs de CdTe estabilizados com MSA, obtidos sob condições de síntese semelhantes às que foram empregadas no presente trabalho [14,54]. A absorvidade molar calculada para os QDs foi de $125684 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, e a concentração estimada de partículas em suspensão foi de $1,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

4.4.1 Pré-processamento e fatoração dos dados da região espectral inferior

A região espectral inferior das EEMs corresponde aos intervalos de comprimento de onda onde as proteínas podem ser excitadas e emitem. A fluorescência intrínseca de proteínas é devida, geralmente, à presença de três aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina e triptofano [7]. Os espectros de absorção e emissão desses aminoácidos estão apresentados na Figura 44.

Figura 44 - Espectros de (A) absorção e (B) emissão de fenilalanina (PHE), tirosina (TYR) e triptofano (TRP) em água com pH 7,0.



Fonte: Adaptado de Lakowicz.

O triptofano é o fluoróforo intrínseco mais predominante em proteínas. Esse aminoácido possui QY de 13%, mas é muito sensível ao ambiente e pode ter sua fluorescência facilmente suprimida por transições conformacionais, ligações químicas, colisões ou desnaturação. A tirosina, com QY de 14%, também tem fluorescência frequentemente suprimida devido às interações com cadeias de peptídeos ou transferência de energia para o triptofano. A fenilalanina, por sua vez, tem o menor QY (2%) dentre os três aminoácidos responsáveis pela fluorescência de proteínas [7].

O anticorpo Anti-A, que também é uma proteína, é um anticorpo IgM que foi empregado no presente trabalho devido à sua quantidade razoavelmente disponível no nosso grupo de pesquisa. Entretanto, quaisquer outras proteínas poderiam ter sido utilizadas na metodologia proposta, visto que os três fluoróforos responsáveis pelo sinal observado nas EEMs obtidas são comuns à maioria das proteínas (incluindo anticorpos).

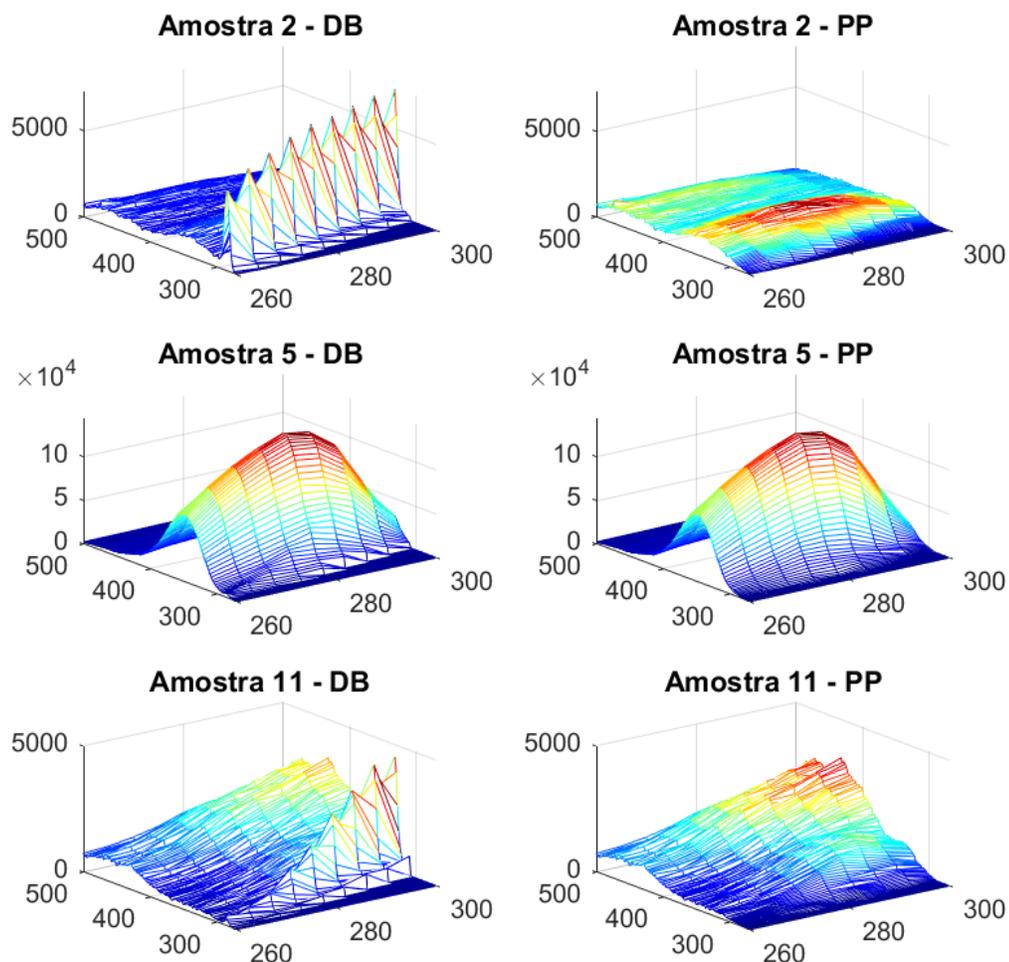
As EEMs obtidas semanalmente para a região espectral das proteínas foram estruturadas em um tensor de quarta ordem com dimensões $16 \times 116 \times 9 \times 9$. Os dados de fluorescência foram visivelmente afetados pelos espalhamentos Raman e Rayleigh, mesmo que um filtro instrumental tenha sido utilizado para minimizar os espalhamentos Rayleigh durante a aquisição dos dados de fluorescência. Os dados brutos das EEMs obtidas na semana 9 para algumas amostras estão representadas na Figura 45, onde pode-se observar que algumas amostras foram mais afetadas pelos espalhamentos que outras.

Os espalhamentos Raman e Rayleigh não apresentam comportamento trilinear pois a forma, posição e intensidade dos picos mudam com o comprimento de onda de excitação e solvente utilizado, entre outros fatores [91]. Surge daí a importância de pré-processar os dados a fim de minimizar os efeitos dos espalhamentos e evitar dificuldades matemáticas na fatoração, visto que a trilinearidade é um pré-requisito para a decomposição de dados pelo modelo PARAFAC.

A subtração do sinal do branco (amostra 1) nas demais amostras não foi eficiente na remoção do espalhamento pois, de acordo com a composição das amostras, a intensidade dos picos variou bastante. A inserção de valores ausentes nas regiões dos espalhamentos também não foi apropriada pois, dependendo da largura das regiões, esse pré-processamento resultou em até quase 20% de NaN nos dados. Embora PARAFAC manipule os valores ausentes naturalmente a partir da estimativa iterativa pelo algoritmo ALS, a presença de muitos NaN na mesma região pode levar à instabilidade e convergência extremamente lenta [91].

Dentre os métodos de pré-processamento testados, a interpolação foi a que apresentou melhores resultados. As regiões dos espalhamentos Rayleigh de primeira ordem e Raman foram definidas com larguras de 12 e 10 nm, respectivamente. Na Figura 45, é possível comparar as EEMs de algumas amostras antes e após esse pré-processamento, o qual foi estabelecido como melhor estratégia e utilizado para minimizar os efeitos dos espalhamentos nos dados da região espectral inferior.

Figura 45 - Dados brutos (DB) e pré-processados (PP) de EEMs da região espectral inferior de algumas amostras representativas do conjunto de dados.



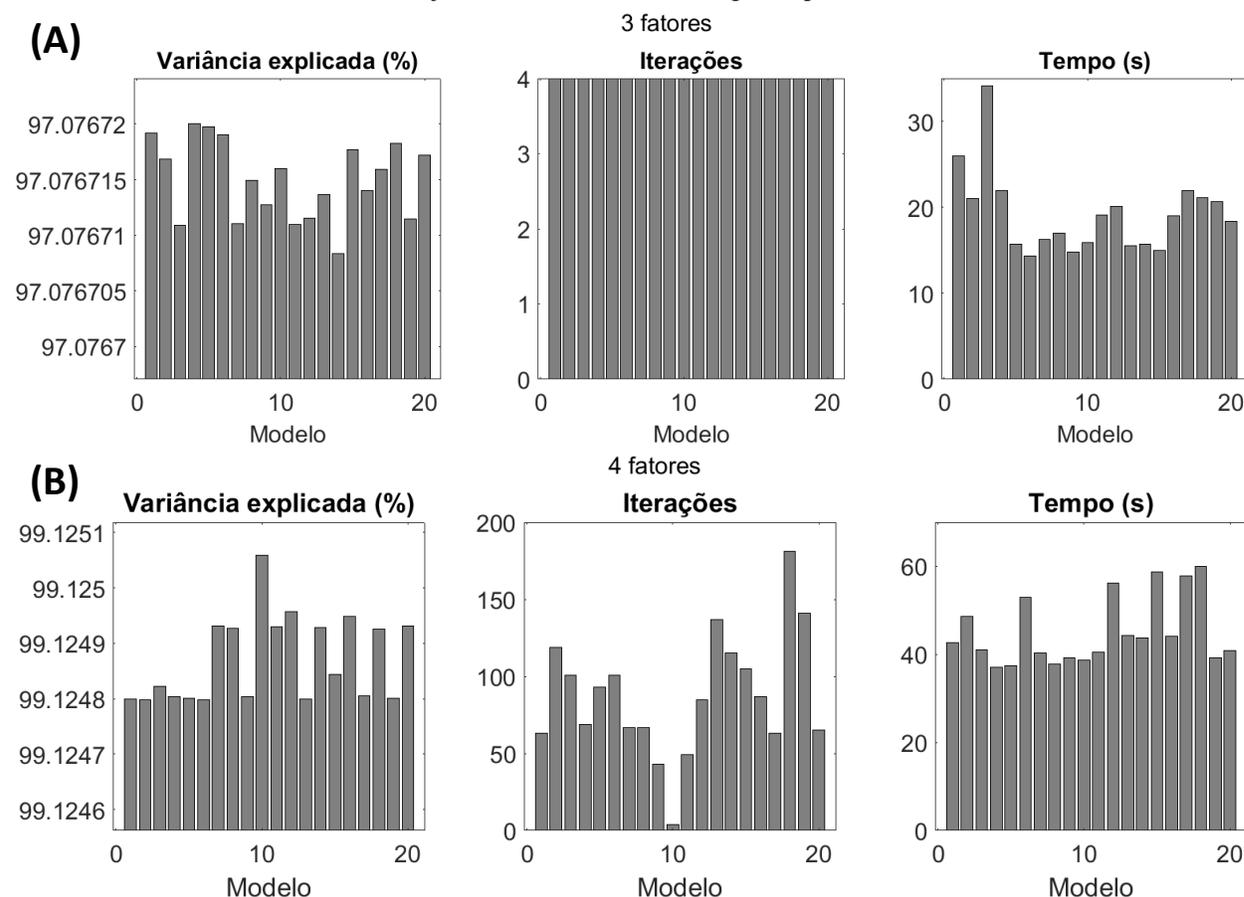
Fonte: A autora.

Os dados pré-processados foram utilizados na obtenção de modelos PARAFAC com até 5 componentes. A escolha do número de componentes do modelo é uma etapa crucial para se obter soluções únicas que expliquem o máximo possível da variância dos dados. Embora não haja critérios absolutos para isso, é mais fácil identificar o sobreajuste que o subajuste no PARAFAC [24,25]. Portanto, a estratégia mais adotada consiste em identificar qual é o maior número de componentes que proporcionem modelos PARAFAC bem avaliados segundo os critérios definidos no subitem 1.2.3.2 desta tese.

Os modelos PARAFAC com 2 componentes tiveram CORCONDIA de 99%, mas a variância explicada foi de apenas 91,4%. Os modelos com 3 ou mais componentes apresentaram valores negativos de CORCONDIA e, portanto, essa ferramenta não foi utilizada para validar a escolha do número de componentes. Os modelos com 3 e 4 componentes explicaram,

respectivamente, 97,1% e 99,1% da variância dos dados. Contudo, após a análise completa dos resultados obtidos, os modelos com 3 componentes foram mais adequados para os dados da faixa espectral inferior. Para validar essa escolha e demonstrar que 4 componentes levaram ao sobreajuste dos modelos, os resultados obtidos para os modelos com 3 e 4 componentes serão comparados quanto aos critérios estabelecidos. A variância explicada e indicações algorítmicas estão apresentadas na Figura 46.

Figura 46 - Gráficos de barras da variância explicada, número de iterações e tempo de convergência dos modelos PARAFAC com (A) 3 e (B) 4 fatores, ajustados com os dados da região espectral inferior.



Fonte: A autora.

Todos os 20 modelos com 3 componentes convergiram em tempos semelhantes com apenas 4 iterações. Esses modelos podem ser agrupados de acordo com suas respectivas variâncias explicadas. Para um mesmo número de componentes, apenas aqueles modelos que explicarem a maior variância podem ser considerados os “modelos verdadeiros” porque são os que atingiram o mínimo global da função de custo. Os demais modelos convergiram atingindo um ponto de mínimo

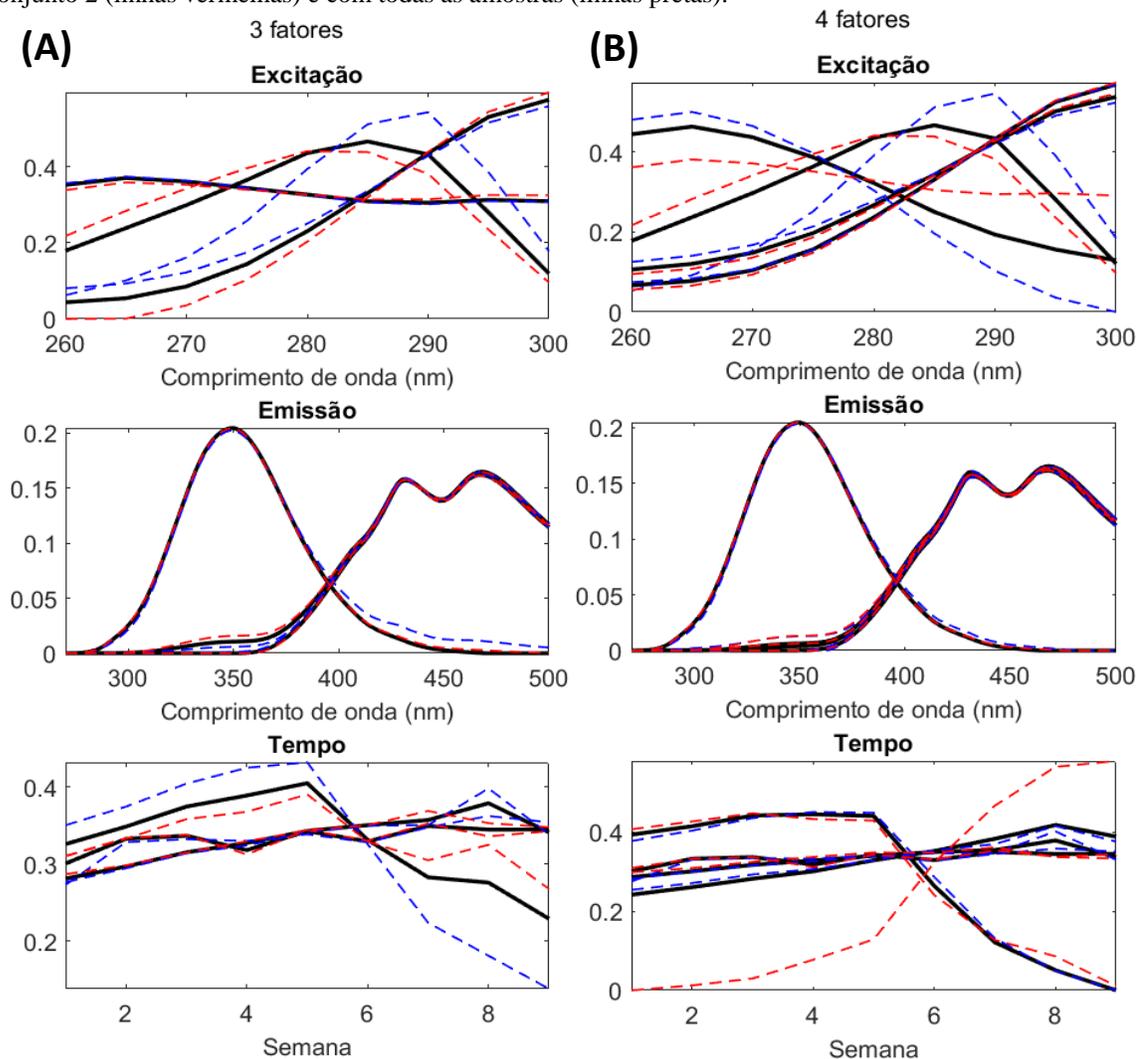
local e, portanto, não devem ser utilizados. Os modelos 1, 4, 5 e 6 tiveram variância explicada maior que os demais, e a diferença entre a variância desses 4 modelos não é relevante pois é menor que a variação relativa admitida para a função de custo. O modelo 4 foi selecionado para obter os resultados a seguir, mas qualquer um desses 4 modelos (1, 4, 5 ou 6) poderia ter sido escolhido.

Dentre os modelos com 4 componentes, o modelo 10 foi selecionado pois apresentou a maior variância explicada e foi o único modelo que atingiu o ponto mínimo global da função de custo. Contudo, o número de iterações necessárias para a convergência dos modelos com 4 componentes variou muito, o que pode ser um indicativo de instabilidade no algoritmo e dificuldade para encontrar soluções singulares para os 4 fatores. Além disso, durante o cálculo de alguns desses modelos com 4 componentes, o algoritmo ALS alertou que os dados eram singulares ou quase singulares, o que indica que o número de componentes escolhido era maior que o número de componentes que podiam ser extraídos a partir do conjunto de dados.

Os resultados da análise *split-half*, obtidos com os modelos PARAFAC com 3 e 4 componentes, estão representados na Figura 47. Os perfis de todos os componentes obtidos pelo modelo global, ajustado com todas as amostras, estão representados pelas linhas pretas. O ideal seria que os perfis obtidos com os subconjuntos de amostras (representados pelas linhas vermelhas e azuis) fossem iguais aos perfis do modelo global. Contudo, ainda que o número de componentes escolhido para o modelo seja o ideal, o comportamento ideal na análise *split-half* está condicionado também à presença dos mesmos compostos químicos em ambos os subconjuntos de amostras. No presente trabalho, as 16 amostras foram planejadas para ter composições diferentes abrangendo todas as possíveis etapas do processo de conjugação. Portanto, os subconjuntos 1 e 2 não contêm exatamente os mesmos compostos, ainda que as amostras tenham sido selecionadas manualmente para minimizar diferenças nas composições dos subconjuntos.

Pela comparação dos resultados das análises *split-half* para os modelos com 3 e 4 fatores, pode-se verificar que houve mais sobreposição dos perfis obtidos com os subconjuntos para o modelo com 3 fatores. Houve grande disparidade entre os perfis no modo do tempo para os modelos com 3 e 4 fatores, mas tal disparidade é mais significativa com 4 fatores.

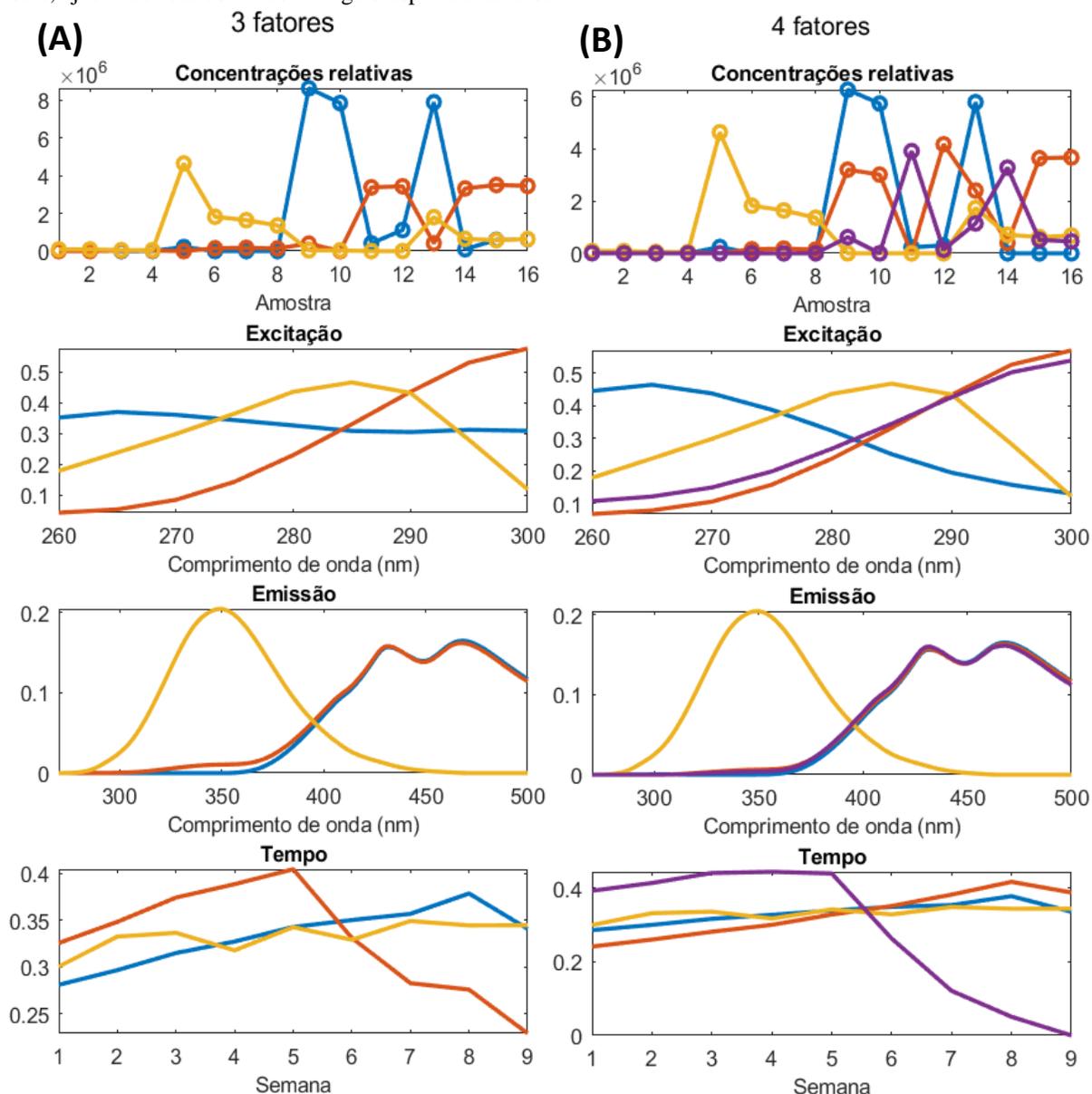
Figura 47 - Análise *split-half* de modelos PARAFAC com (A) 3 e (B) 4 fatores, ajustados com os dados da região espectral inferior: perfis obtidos pelos modelos ajustados com as amostras do subconjunto 1 (linhas azuis) e do subconjunto 2 (linhas vermelhas) e com todas as amostras (linhas pretas).



Fonte: A autora.

Os perfis recuperados pelos modelos PARAFAC com 3 e 4 componentes, obtidos com todas as amostras, estão representados na Figura 48 com cores distintas para cada componente. A solução do PARAFAC não é cumulativa como em outros métodos de fatoração, ou seja, os perfis recuperados por um modelo PARAFAC com $F + 1$ fatores não são iguais aos perfis de um modelo com F fatores mais um fator adicional [24,25]. Portanto, as cores utilizadas para representar os perfis obtidos pelos modelos com 3 e 4 fatores são arbitrárias e não têm nenhuma relação entre si.

Figura 48 - Concentrações relativas e perfis recuperados pelo melhor modelo PARAFAC obtido com (A) 3 e (B) 4 fatores, ajustados com os dados da região espectral inferior.



Fonte: A autora.

Uma outra evidência de que o número de componentes do modelo PARAFAC é maior que o necessário é a degenerescência de 2 fatores, isto é, quando os pesos de 2 componentes têm alta correlação positiva em uns modos e negativa em outros. Soluções degeneradas são caracterizadas por 2 componentes apresentando pesos com formas aproximadamente iguais ou simétricas em todos os modos. Dessa forma, a contribuição somada dos 2 fatores degenerados para o modelo é próxima de zero [28]. Esse comportamento pode ser observado nos 2 fatores representados pelas linhas roxas e vermelhas (Figura 48-B). Os perfis recuperados pelo modelo PARAFAC com 3

fatores não serão discutidos neste subitem. Porém, as comparações apresentadas permitem concluir que 3 é o número ideal de componentes para os dados da faixa espectral inferior.

4.4.2 Pré-processamento e fatoração dos dados da região espectral superior

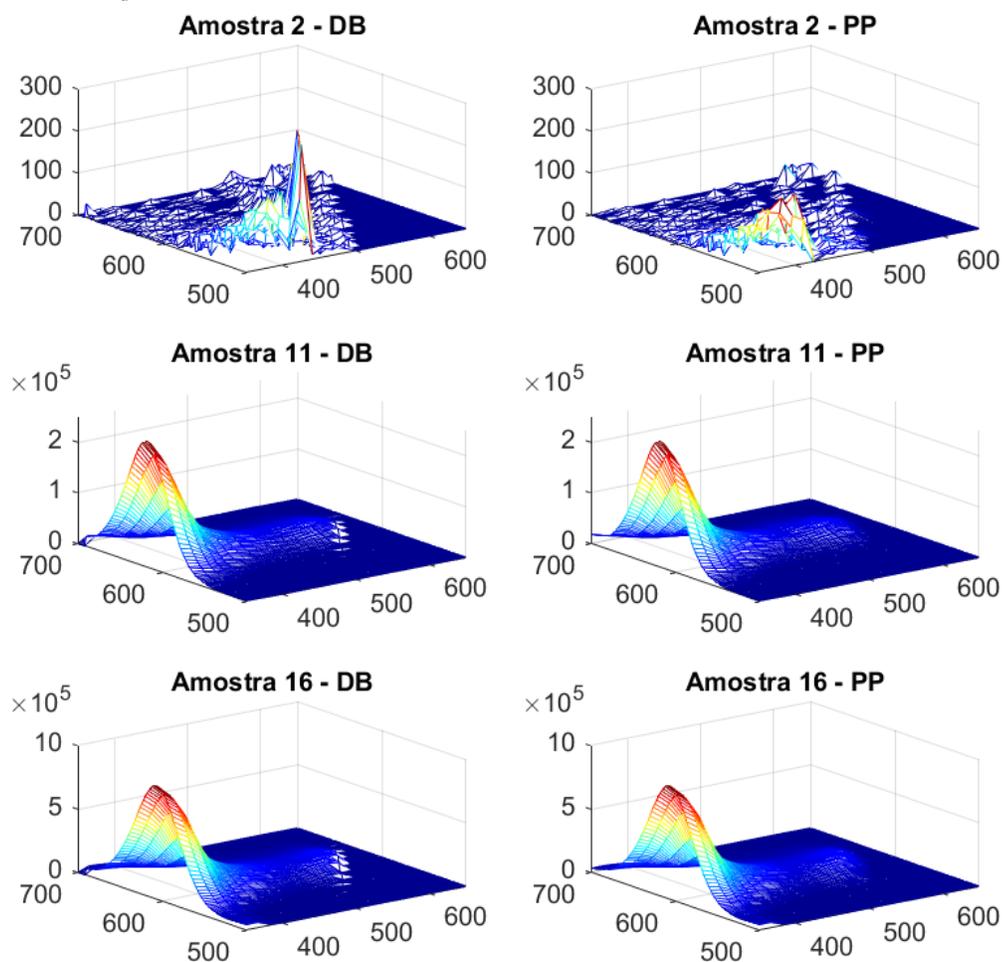
A região espectral superior das EEMs foi definida com base nos espectros de absorção, emissão (Figura 43) e excitação (Apêndice D) dos QDs de CdTe. Nessa região, não se espera observar a emissão de Anti-A, conforme pode-se verificar nos espectros dos fluoróforos intrínsecos de proteínas (Figura 44). Dessa forma, a fluorescência na região superior é devida, principalmente, aos QDs.

As EEMs da região superior foram estruturadas em um tensor de quarta ordem com dimensões $16 \times 101 \times 21 \times 9$. Os dados brutos das EEMs de algumas amostras, obtidas na semana 9, estão representados na Figura 49, onde é possível observar os espalhamentos Raman e Rayleigh aproximadamente nas mesmas regiões esquematizadas na Figura 42.

A subtração de sinal do branco e a inserção de valores ausentes (que acarretou em 15% de NaN na região espectral definida a seguir) não foram as melhores estratégias de pré-processamento para minimizar os espalhamentos na região espectral superior. Portanto, a interpolação dos espectros foi estabelecida novamente como o melhor pré-processamento, e as regiões dos espalhamentos Rayleigh (de primeira e segunda ordens) e Raman foram definidas com larguras de 15 nm. As EEMs pré-processadas de algumas amostras podem ser visualizadas na Figura 49.

Os modelos PARAFAC obtidos a partir dos dados pré-processados da região espectral superior apresentaram valores negativos de CORCONDIA, apesar de os modelos com 2 e 3 componentes explicarem 99,6% e 99,8% da variância dos dados, respectivamente. Esse aumento na variância explicada com a adição de um componente ao modelo foi irrisório. Portanto, com base também nos demais critérios estabelecidos para validar a escolha do número de componentes, a fatoração dos dados em 2 componentes mostrou-se mais adequada que em 3 componentes. A variância explicada e as indicações algorítmicas dos modelos PARAFAC com 2 e 3 componentes estão apresentadas na Figura 50.

Figura 49 - Dados brutos (DB) e pré-processados (PP) de EEMs da região espectral superior de algumas amostras representativas do conjunto de dados.

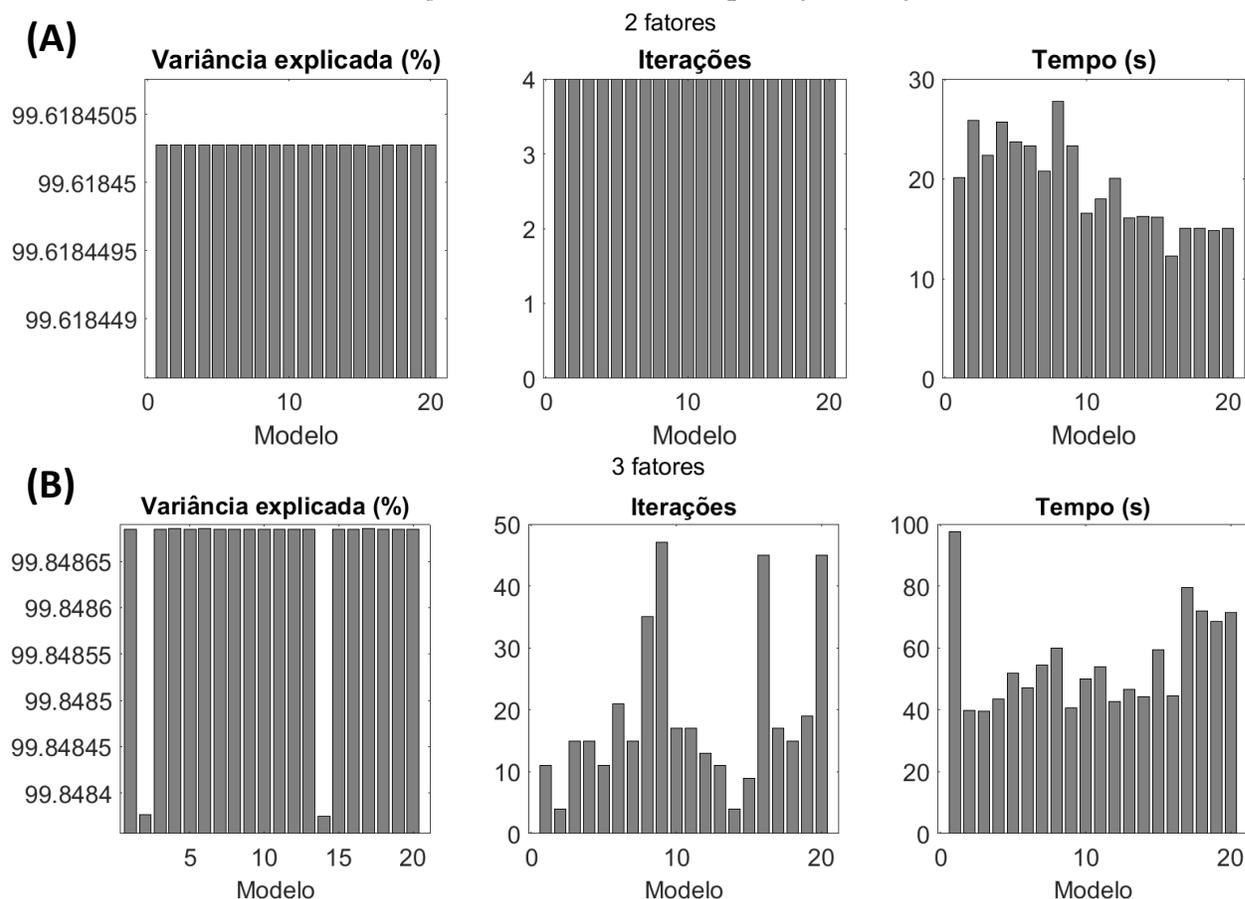


Fonte: A autora.

Os 20 modelos obtidos com 2 componentes atingiram a mesma variância explicada com apenas 4 iterações do algoritmo. Dessa forma, todos os modelos convergiram ao ponto de mínimo global da função de custo. Apesar do modelo 18 ter sido selecionado para obter os perfis que serão apresentados a seguir, qualquer um dos 20 modelos proporcionaria resultados semelhantes.

Os modelos PARAFAC com 3 componentes também alcançaram a mesma variância explicada, com exceção dos modelos 2 e 14, que certamente convergiram em um ponto de mínimo local. Contudo, o número de iterações necessárias variou consideravelmente, o que indica que o algoritmo ALS enfrentou graus de dificuldade de convergência diferentes para cada modelo. Além disso, o algoritmo alertou que os dados eram singulares ou quase singulares. O modelo 4 foi utilizado para obter os resultados a seguir.

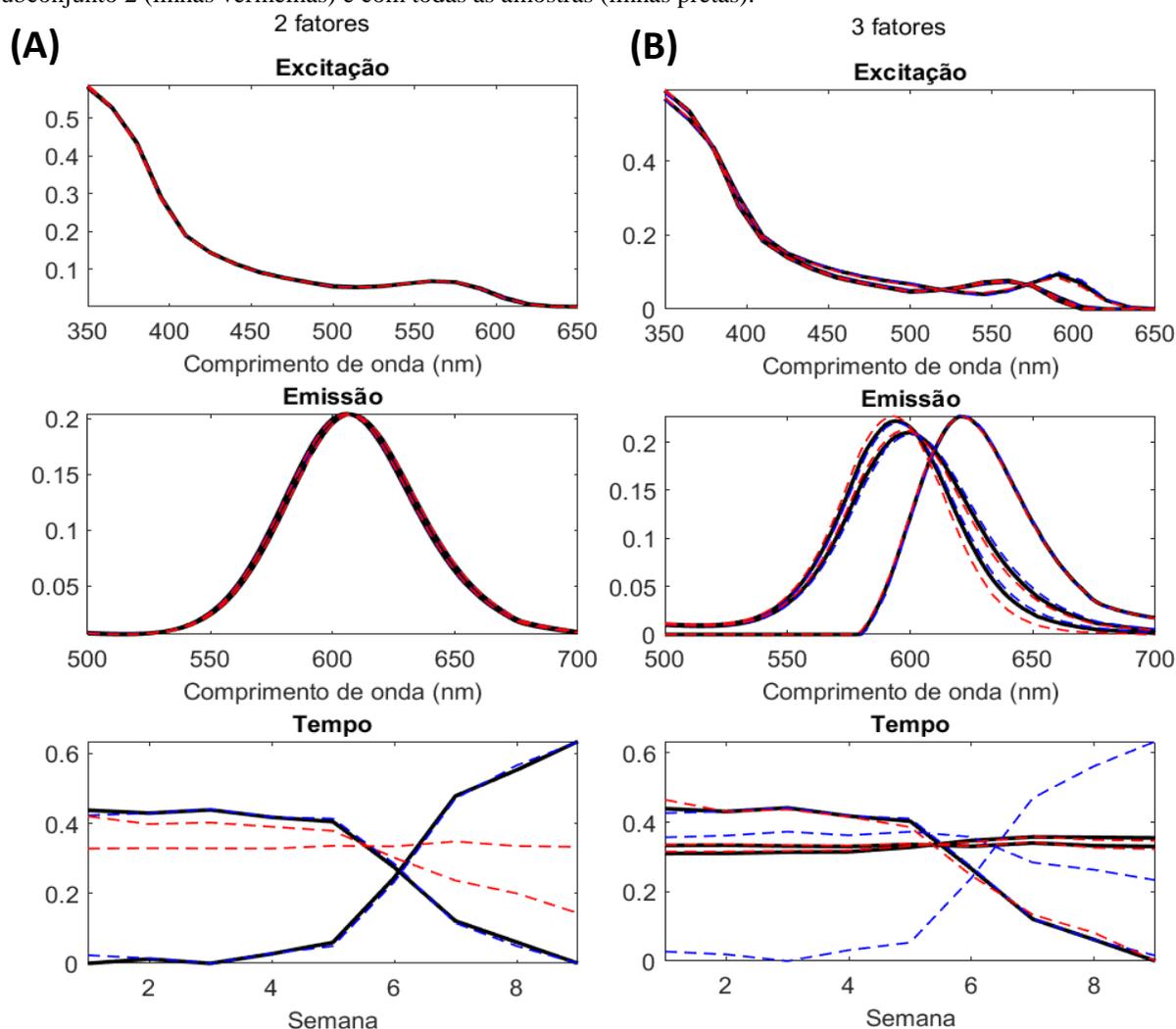
Figura 50 - Gráficos de barras da variância explicada, número de iterações e tempo de convergência dos modelos PARAFAC com (A) 2 e (B) 3 fatores, ajustados com os dados da região espectral superior.



Fonte: A autora.

Os resultados das análises *split-half* estão apresentados na Figura 51 para os modelos selecionados com 2 e 3 componentes. Os pesos nos modos de excitação e emissão foram muito semelhantes para os modelos PARAFAC com 2 e 3 componentes, obtidos com os dois subconjuntos e com todas as amostras. Entretanto, no modo do tempo, os perfis obtidos com um dos subconjuntos apresentaram grandes disparidades em comparação com os perfis do modelo global. Isso ocorreu com os modelos com 2 e 3 fatores, o que pode ter sido causado pela presença de compostos químicos diferentes nos subconjuntos de amostras. Portanto, não foi possível apontar o melhor número de componentes para o modelo a partir das análises *split-half*.

Figura 51 - Análise *split-half* de modelos PARAFAC com (A) 2 e (B) 3 fatores, ajustados com os dados da região espectral superior: perfis obtidos pelos modelos ajustados com as amostras do subconjunto 1 (linhas azuis) e do subconjunto 2 (linhas vermelhas) e com todas as amostras (linhas pretas).



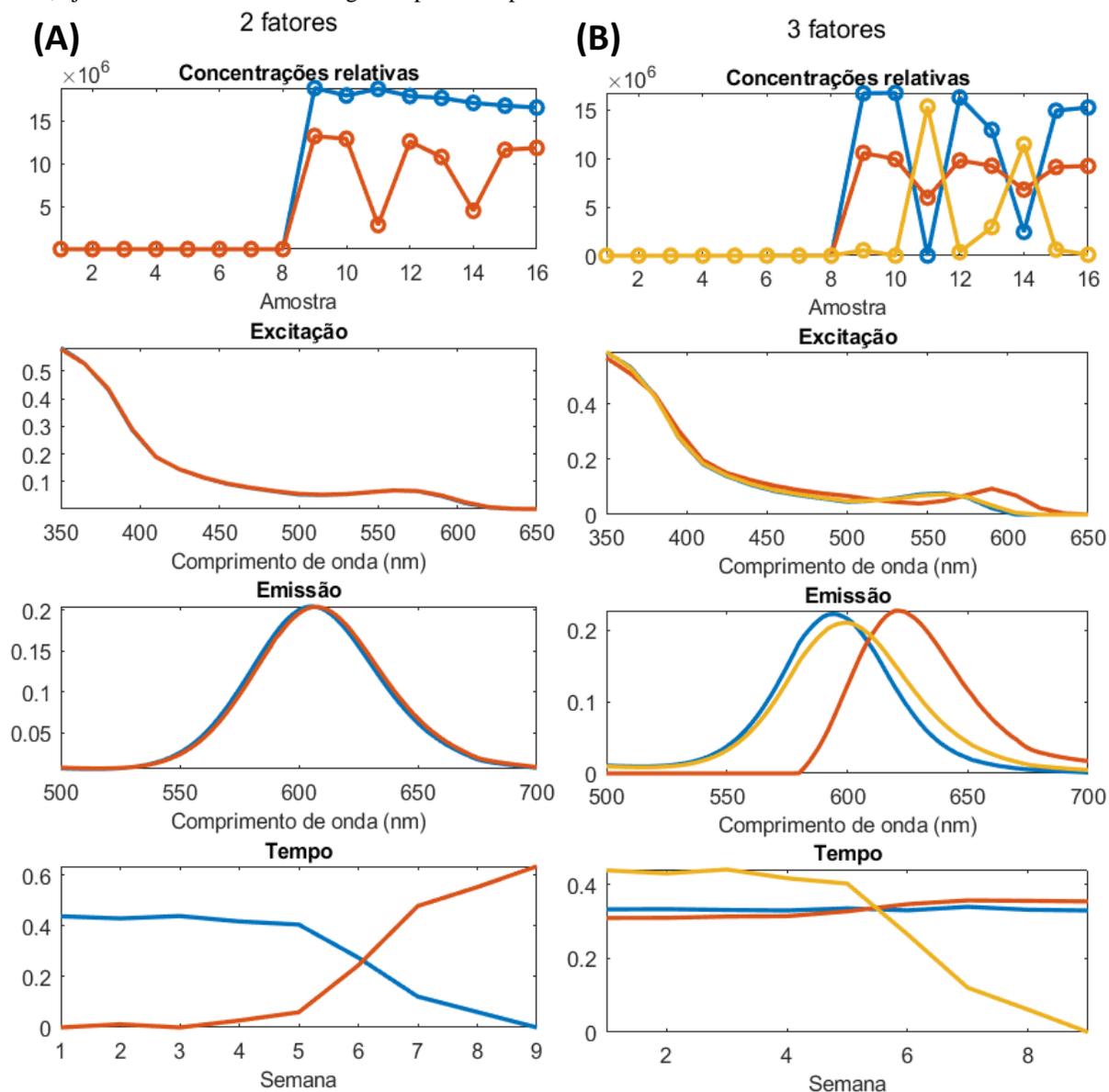
Fonte: A autora.

Os perfis recuperados pelos modelos globais com 2 e 3 componentes estão representados na Figura 52, com cores distintas para cada componente. Pode-se verificar, na Figura 52-B, indicativos de degenerescência dos 2 fatores representados pelas linhas azuis e amarelas. Além disso, nos perfis recuperados pelo modelo PARAFAC com 3 fatores, pode-se observar que o espectro de emissão do componente representado pela linha vermelha tem intensidade zero de 500 a 580 nm, onde a intensidade começa a aumentar abruptamente. Esse perfil espectral é anormal.

Embora os perfis recuperados pelo modelo com 2 componentes estejam altamente correlacionados nos modos de excitação, emissão e tempo, não há degenerescência porque as concentrações relativas não estão correlacionadas e, portanto, as contribuições desses 2

componentes para o modelo não se anulam. Dessa forma, pode-se concluir que 2 é o número mais adequado de componentes para decompor os dados da região espectral superior.

Figura 52 - Concentrações relativas e perfis recuperados pelo melhor modelo PARAFAC obtido com (A) 2 e (B) 3 fatores, ajustados com os dados da região espectral superior.



Fonte: A autora.

4.4.3 Fatoração conjunta dos dados das regiões espectrais inferior e superior

O número de componentes mais adequado foi diferente para as regiões espectrais inferior e superior. Na região inferior, foram recuperados os perfis de 3 componentes, dos quais um é

devido, provavelmente, ao triptofano e os outros estão relacionados aos QDs. Na região superior, não é possível observar o sinal dos fluoróforos das proteínas. Logo, era esperado que o número de componentes recuperados na região espectral superior fosse menor que o número de componentes da região inferior. Entretanto, como foram utilizadas as mesmas amostras para obter os conjuntos de dados das regiões inferior e superior, espera-se que o acoplamento desses dados proporcione complementariedade de informações nos modos compartilhados.

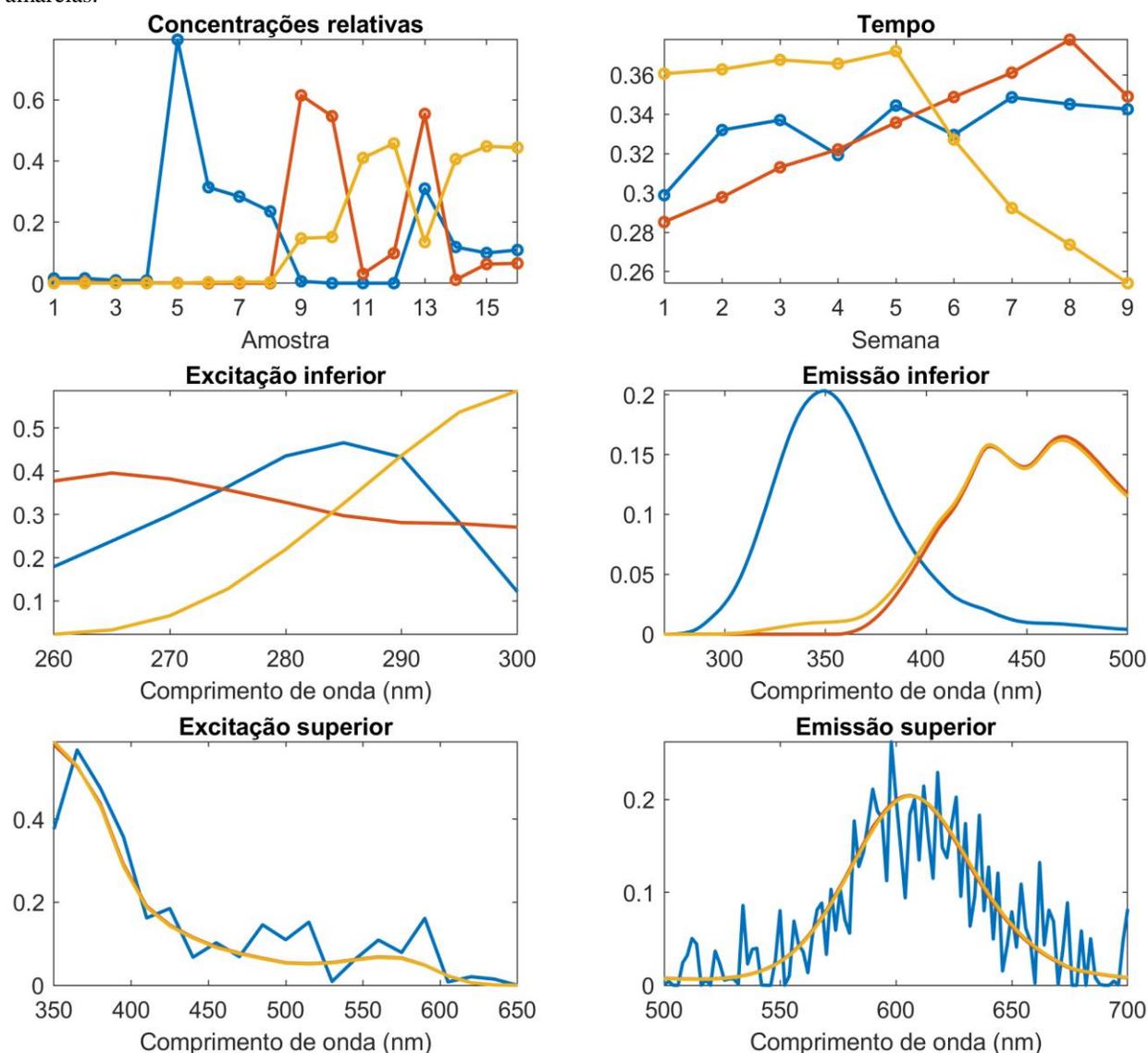
A fatoração dos dados acoplados apresentou melhores resultados com 3 fatores, e os perfis recuperados estão representados na Figura 53. Os perfis de excitação e emissão obtidos pela fatoração conjunta foram muito similares aos perfis obtidos pela fatoração dos dados das duas faixas espectrais separadamente. Contudo, os modos das amostras e do tempo, que foram compartilhados pelos dois tensores, apresentaram perfis um pouco diferentes dos obtidos com os dados separados. Isso indica que a fatoração conjunta possibilitou aprimorar as concentrações relativas e os perfis do tempo.

Os vetores de pesos σ e λ obtidos pelo ACMTF para os 3 componentes estão representados abaixo. Esses pesos estão relacionados à contribuição de cada fator para cada conjunto de dados e indicam que há um componente que não é compartilhado, cujo sinal analítico está presente apenas nos dados da faixa inferior porque seu peso λ nos dados da faixa superior é zero. Esse componente corresponde ao fator A (representado pelas linhas azuis). O fato de os perfis desse fator terem sido ruidosos nos modos de excitação e emissão da faixa superior é irrelevante, visto que o produto desses espectros pelo peso λ do fator A resulta em contribuição nula para o modelo.

- Tensor da faixa inferior: $\sigma = [0,32042 \quad 0,71874 \quad 0,41959]$;
- Tensor da faixa superior: $\lambda = [0 \quad 0,48361 \quad 0,70526]$.

O fator A teve excitação e emissão máximas em 285 e 350 nm, respectivamente, o que é compatível com os espectros do triptofano (Figura 44) e corrobora a atribuição do fator A a esse aminoácido. Observa-se no gráfico dos escores da Figura 53 que esse fator está presente nas amostras 5 a 8 e 13 a 16, que são as amostras do conjunto de dados que contêm Anti-A.

Figura 53 - Concentrações relativas e perfis recuperados pelo melhor modelo PARAFAC ajustado com os dados das regiões espectrais inferior e superior acoplados. Fator A: linhas azuis; Fator B: linhas vermelhas; Fator C: linhas amarelas.



Fonte: A autora.

A concentração relativa do fator A diminuiu de acordo com a sequência de amostras a seguir:

$$5 \gg 13 > 6 > 7 > 8 \gg 14 > 16 > 15$$

O aumento de complexidade da composição química das amostras que contêm Anti-A, isto é, o aumento de compostos que alteram o ambiente químico em torno de Anti-A, ocorreu na seguinte sequência:

$$5 < 13 < 6 < 7 \approx 8 < 14 < 15 \approx 16$$

Mesmo que a quantidade adicionada de Anti-A tenha sido a mesma nessas amostras, observa-se a tendência de diminuição da concentração relativa do fator A com o aumento do número de compostos químicos nas amostras. Isso se deve ao fato de que o triptofano é muito sensível ao ambiente químico e, provavelmente, teve sua fluorescência suprimida pela presença dos agentes de acoplamento e/ou Tris base adicionados nas amostras 6 a 8 e 14 a 16. Quanto mais compostos interagindo com o triptofano, maior é a supressão de fluorescência.

Os fatores B e C, representados na Figura 53 pelas linhas vermelhas e amarelas, respectivamente, não estão presentes nas amostras 1 a 8, que correspondem aos controles negativos que não contêm QDs. Logo, pode-se inferir que os fatores B e C estão relacionados aos QDs. Embora a região espectral inferior tenha sido delimitada com foco na fluorescência de proteínas, o sinal de fluorescência dos QDs também está presente nessa região, o que justifica a presença dos fatores B e C nos modos de excitação e emissão da região espectral inferior.

As bandas de emissão na região espectral inferior relacionadas aos QDs, que apresentaram picos em 430 e 470 nm, podem ser atribuídas a pequenas populações de QDs com tamanho médio menor que os QDs com emissão máxima em 605 nm, visível na região espectral superior. Como a suspensão de QDs foi homogeneizada antes do preparo das amostras, as concentrações de partículas de populações de tamanhos diferentes são aproximadamente iguais nas amostras 9 a 16. Sendo assim, não foi possível separar matematicamente o sinal dos QDs com tamanhos diferentes e, portanto, os perfis dos fatores B e C não estão relacionados ao tamanho das partículas, mas sim a outras características que serão discutidas a seguir.

O fator B está presente em elevadas concentrações relativas nas amostras 9, 10 e 13, que são as únicas amostras que contêm QDs e não contêm os agentes de acoplamento (EDC e NHS). O fator C, por sua vez, tem altas concentrações relativas nas amostras 11, 12, 14, 15 e 16, que contêm QDs e os agentes de acoplamento. EDC ativa os grupos carboxilato na superfície dos QDs, enquanto NHS forma ésteres intermediários com os grupos carboxilato e desativa o excesso de EDC [18]. Além disso, a elevada razão superfície/volume faz com que os QDs sejam bastante sensíveis a processos ocorrendo em sua superfície. Dessa forma, os agentes de acoplamento, presentes em concentrações maiores que a concentração estimada de QDs, causam modificações na superfície das partículas e afetam a fluorescência dos QDs.

Altas concentrações relativas do fator C podem ser associadas aos QDs com superfície ativada, condição necessária para a bioconjugação por ligação covalente, enquanto altas

concentrações relativas do fator B estão associadas aos QDs cuja superfície não foi modificada por agentes de acoplamento e, portanto, só realizam bioconjugação por adsorção. Os perfis dos fatores B e C nos modos de excitação na região espectral superior e emissão em ambas as regiões estão altamente correlacionados e sobrepostos. Assim, a decomposição dos sinais referentes aos QDs (com superfície ativada ou não) só foi possível porque os perfis desses fatores nos demais modos foram diferentes.

Os sinais de fluorescência das 16 amostras obtidos pelo método de referência estão representados no gráfico de barras da Figura 54, e a tabela com as intensidades de emissão pode ser consultada no Apêndice F. As proteínas têm afinidade pelo poliestireno que compõe as microplacas. Os QDs livres, por sua vez, não possuem essa afinidade. Dessa forma, após a lavagem da microplaca com PBS, somente proteínas ficam ligadas aos poços, e os QDs que não estiverem ligados a proteínas são removidos. A intensidade de emissão na região de fluorescência dos QDs é medida no fundo do poço. Se houver conjugação das proteínas aos QDs, os conjugados ficam ligados ao poço pelas proteínas e os QDs que estão conjugados, os quais não serão removidos com a lavagem, são responsáveis pelo sinal de fluorescência medido [17].

A bioconjugação era esperada somente nas amostras 13 a 16, pois são as únicas que contêm QDs e Anti-A. Por essa razão, as demais amostras foram utilizadas como controle na Equação 19. Verifica-se, na Figura 54, que apenas as amostras 13 a 16 apresentaram intensidade de emissão elevada, e as demais amostras tiveram sinal próximo de zero.

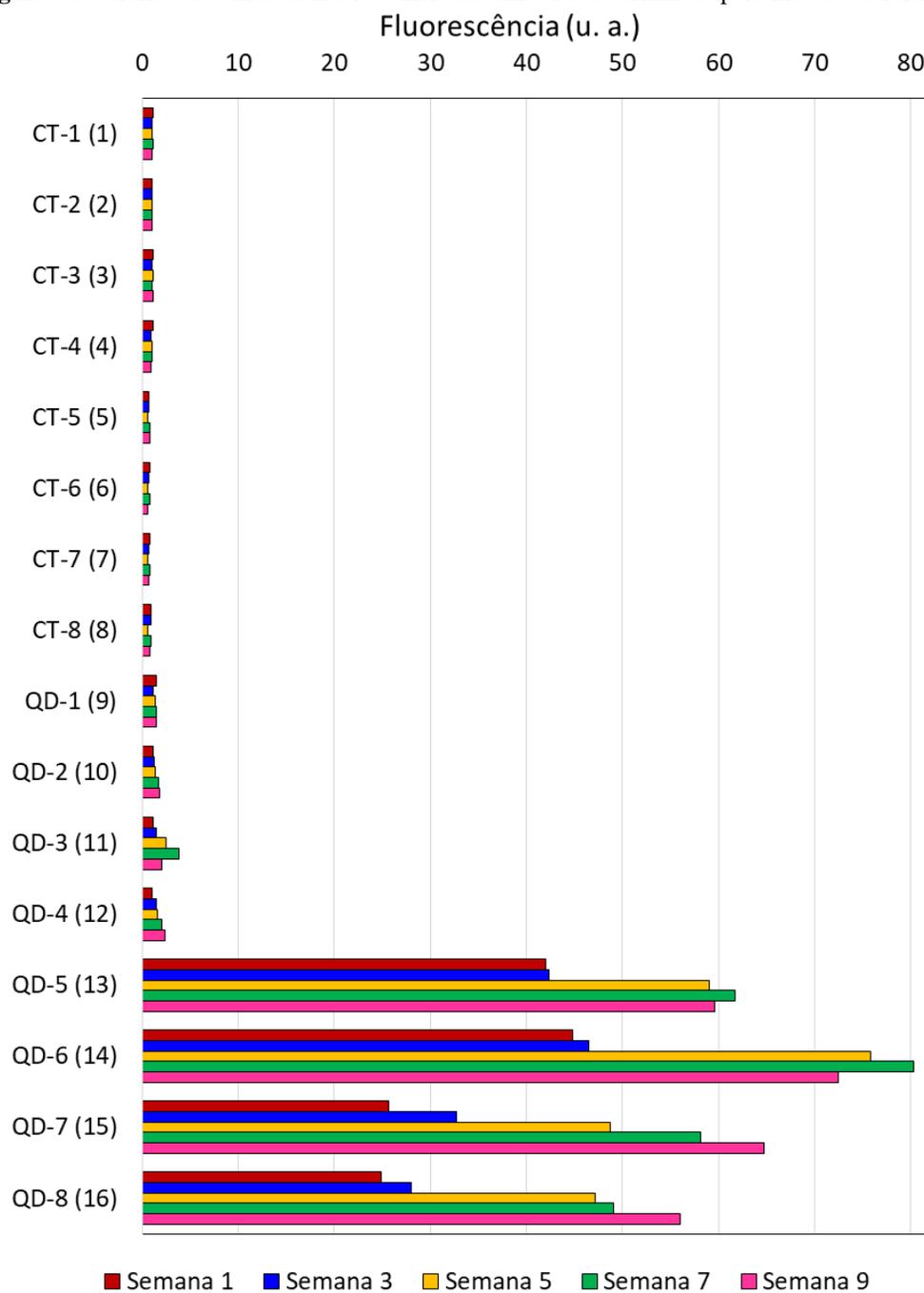
A amostra 13, que não contém os agentes de acoplamento, foi a única em que houve bioconjugação por adsorção, conforme esperado já que essa amostra tem alta concentração relativa do fator B (indicativo de QDs predispostos à conjugação por adsorção) na presença do fator A (atribuído ao triptofano indicativo da presença de proteína).

A amostra 13 teve fluorescência crescente ao longo do tempo, pelo método de referência, atingindo valor máximo na semana 7. Essa tendência também foi observada no perfil do fator B no modo do tempo, com valor máximo na semana 8. Entretanto, como as análises pelo método de referência só foram realizadas em semanas alternadas, a análise na semana 8 não foi realizada.

As amostras 14 a 16, que tiveram altas concentrações relativas do fator C (relativo aos QDs com superfície ativada para conjugação por ligação covalente) na presença do fator A, tiveram elevada fluorescência pelo método de referência, atingindo valor máximo na semana 7 para a

amostra 14 e na semana 9 para as amostras 15 e 16. Assim, confirmou-se que houve bioconjugação de Anti-A aos QDs por ligação covalente nessas 3 amostras.

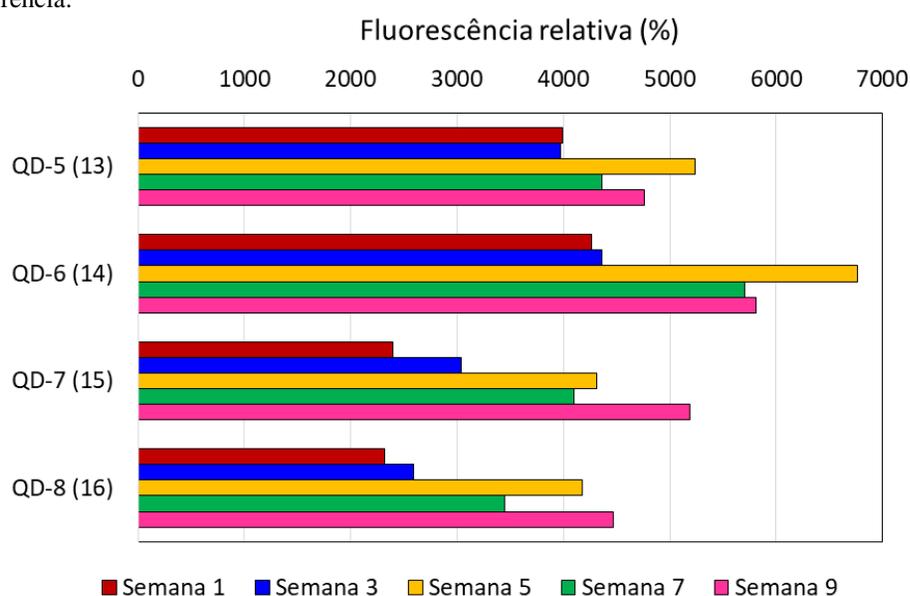
Figura 54 - Gráfico de barras da fluorescência das amostras determinada pelo método de referência.



Fonte: A autora.

As fluorescências relativas das amostras 13 a 16 estão representadas na Figura 55, e os valores detalhados podem ser consultados no Apêndice G. Um aumento de no mínimo 100% na fluorescência das amostras contendo bioconjugados, em comparação com os controles, pode ser considerado um bom indicativo de conjugação satisfatória, de acordo com o método de referência. Por fim, vale ressaltar que, desde a primeira semana, as 4 amostras já apresentaram bioconjugação satisfatória.

Figura 55 - Gráfico de barras da fluorescência relativa das amostras contendo bioconjugados, determinada pelo método de referência.



Fonte: A autora.

4.5 CONCLUSÃO

Os dados de ordem superior de fluorescência foram obtidos por EEMs de duas regiões espectrais, resultando em dois tensores de quarta ordem. A interpolação de dados foi o método de pré-processamento que apresentou melhores resultados na minimização dos efeitos dos espalhamentos Rayleigh e Raman, nos dados de ambas as regiões espectrais.

Na região espectral interior, foi possível observar o sinal referente às proteínas e aos QDs, enquanto na região espectral superior, somente o sinal dos QDs foi observado. Conseqüentemente, diferentes quantidades de componentes foram obtidas pelos modelos PARAFAC construídos para cada uma das duas regiões espectrais. Os dados da região inferior foram decompostos em 3 componentes, e os dados da região superior, em apenas 2 componentes. Contudo, o acoplamento

dos dois tensores e a fatoração conjunta dos dados pelo método ACMTF possibilitou aprimorar os perfis obtidos nos modos compartilhados, que foram as concentrações relativas e os tempos.

A interação de Anti-A com os QDs não pôde ser diretamente detectada por fluorescência. Contudo, a partir da metodologia proposta, é possível detectar as modificações na emissão dos QDs causadas por processos que ocorrem na superfície dos nanocristais em decorrência de interações com proteínas ou outras moléculas. Assim, a decomposição dos dados de ordem superior de fluorescência possibilitou extrair características qualitativas subjacentes do processo de conjugação de proteínas a QDs.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Nesta tese, ferramentas de otimização multivariada e análise de ordem superior foram aplicadas com êxito em estudos envolvendo QDs. Técnicas de planejamento experimental foram empregadas no estudo das condições de síntese de QDs de CdSe e Ag₂Se e conduziram ao aprimoramento de propriedades ópticas desses nanossistemas. Apesar de não ser frequente na área de síntese de nanomateriais, o uso de estratégias de otimização multivariada proporcionou resultados reprodutíveis com confiabilidade estatística, a partir de uma quantidade reduzida de sínteses em comparação com outras estratégias de otimização. Métodos de fusão e fatoração de dados de ordem superior, por sua vez, se mostraram eficientes na extração de características implícitas da conjugação de proteínas a QDs. Além disso, evidenciou-se que a exploração de dados ordem superior de fluorescência tem potencial no auxílio da extração de informações acerca de processos químicos envolvendo QDs. Algumas perspectivas futuras sobre os tópicos abordados no presente trabalho são apontadas a seguir.

5.1 OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE *QUANTUM DOTS* DE CdSe

Os QDs de CdSe obtidos em condições otimizadas necessitam, idealmente, de redução da FWHM da banda de emissão para que possam ser empregados, de modo eficaz em termos de resposta óptica, nos mais diversos tipos de (bio)aplicações. Para isso, poderão ser testadas estratégias de passivação de superfície e conseqüente redução de defeitos, como o revestimento dos nanocristais de CdSe com uma camada de outro semicondutor.

5.2 OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE *QUANTUM DOTS* DE Ag₂Se

A otimização da síntese dos QDs de Ag₂Se estabilizados com MSA requer, ainda, que fatores como razão molar de Ag:Se e tempo de síntese sejam estudados mais detalhadamente. Além disso, a FWHM da banda de emissão precisa ser reduzida com vistas a possíveis aplicações e, para isso, estratégias de passivação de superfície podem ser avaliadas.

Os QDs de Ag₂Se estabilizados com MPA precisam de estudos mais aprofundados sobre suas condições de síntese e de uma caracterização estrutural completa. Tais estudos já estão em andamento em trabalhos que vêm sendo realizados pelo nosso grupo de pesquisa.

5.3 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE CONJUGAÇÃO DE PROTEÍNAS A *QUANTUM DOTS*

A partir da metodologia de aquisição e pré-processamento dos dados proposta, novos estudos podem ser conduzidos para propor uma metodologia (semi-)quantitativa para caracterizar a formação dos bioconjugados. Para isso, pode-se tentar correlacionar os pesos, obtidos por PARAFAC ou outros métodos de decomposição trilinear, com respostas obtidas por métodos quantitativos de caracterização da conjugação de proteínas a QDs.

REFERÊNCIAS

1. PEREIRA, M. G. C. et al. Quantum Dots. In: SANCHEZ-DOMINGUEZ, M.; RODRIGUEZ-ABREU, C. **Nanocolloids: A Meeting Point for Scientists and Technologists**. 1st. ed. [S.l.]: Elsevier, 2016. Cap. 4, p. 536.
2. KOOLE, R. et al. Size Effects on Semiconductor Nanoparticles. In: DONEGÁ, C. M. **Nanoparticles: Workhorses of Nanoscience**. 1st. ed. [S.l.]: Springer, 2014. Cap. 2, p. 299.
3. XU, Y.; HUANG, Y.; ZHANG, B. Rational design of semiconductor-based photocatalysts for advanced photocatalytic hydrogen production: the case of cadmium chalcogenides. **Inorganic Chemistry Frontiers**, 3, 2016. 591-615.
4. VIEGAS, I. M. A. et al. Multivariate optimization of optical properties of CdSe quantum dots obtained by a facile one-pot aqueous synthesis. **Inorganic Chemistry Frontiers**, 6, 2019. 1350-1360.
5. JING, L. et al. Aqueous Based Semiconductor Nanocrystals. **Chemical Reviews**, 116, 2016. 10623-10730.
6. ATKINS, P.; DE PAULA, J. **Físico-química: fundamentos**. 5a. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2014. 600 p.
7. LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd. ed. New York: Springer, 2006. 954 p.
8. ALMEIDA, A. J. et al. Charge Trapping Defects in CdSe Nanocrystal Quantum Dots. **The Journal of Physical Chemistry C**, 120, 2016. 13763-13770.
9. WATKINS, G. D. Intrinsic defects in II-VI semiconductors. **Journal of Crystal Growth**, 159, 1996. 338-344.
10. SANTOS, B. S.; FARIAS, P. M. A.; FONTES, A. Semiconductor Quantum Dots for Biological Applications. In: HENINI, M. **Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures for Novel Devices in Photonics and Electronics**. Amsterdam: Elsevier, 2008. Cap. 26, p. 773-798.
11. DABBOUSI, B. O. et al. (CdSe)ZnS Core-Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites. **J. Phys. Chem. B**, 101, 1997. 9463-9475.
12. GUI, R. et al. Recent advances in synthetic methods and applications of colloidal silver chalcogenide quantum dots. **Coordination Chemistry Reviews**, 296, 2015. 91-124.
13. XU, S.; CUI, J.; WANG, L. Recent developments of low-toxicity NIR II quantum dots for sensing and bioimaging. **Trends in Analytical Chemistry**, 80, 2016. 149-155.

14. NAVARRETE, E. et al. Chemometric approach to study the influence of synthesis parameters on the size of CdTe quantum dots obtained from aqueous solutions. **Arabian Journal of Chemistry**, 12, 2019. 5103-5110.
15. RIBEIRO, D. S. M. et al. Synthesis of distinctly thiol-capped CdTe quantum dots under microwave heating: multivariate optimization and characterization. **Journal of Materials Science**, 52, 2017. 3208-3224.
16. TOCCO, A. D. et al. Synthesis of stable CdS nanocrystals using experimental design: optimization of the emission. **New Journal of Chemistry**, 43, 2019. 12836-12845.
17. CARVALHO, K. H. G. et al. Fluorescence Plate Reader for Quantum Dot-Protein Bioconjugation Analysis. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 14, 2014. 3320-3327.
18. HERMANSON, G. T. **Bioconjugate Techniques**. 2nd. ed. [S.l.]: Elsevier, 2008. 1323 p.
19. FERREIRA, S. L. C. **Introdução às técnicas de planejamento de experimentos**. 1a. ed. Salvador: Vento Leste, 2015. 190 p.
20. DE BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4a. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414 p.
21. VIEGAS, I. M. A.; PEREIRA, G. A. L.; PEREIRA, C. F. Multivariate Optimization: A Powerful Tool for the Systematic Control of Quantum Dots Properties. In: FONTES, A.; SANTOS, B. S. **Quantum Dots. Applications in Biology**. 3rd. ed. New York: Humana, v. 2135, 2020. Cap. 1.
22. FERREIRA, S. L. C. et al. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review. **Talanta**, 63, 2004. 1061-1067.
23. TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, 29, 2006. 338-350.
24. SMILDE, A.; BRO, R.; GELADI, P. **Multi-way analysis with applications in the chemical sciences**. Chichester: John Wiley & Sons, 2004.
25. SENA, M.; TREVISAN, M. G.; POPPI, R. J. PARAFAC: uma ferramenta quimiométrica para tratamento de dados multidimensionais. Aplicações na determinação direta de fármacos em plasma humano por espectrofluorimetria. **Química Nova**, 28, 2005. 910-920.
26. HARSHMAN, R. A. Foundations of the PARAFAC procedure: Models and conditions for an "explanatory" multimodal factor analysis. **UCLA Working Papers in Phonetics**, 16, 1970. 1-84.

27. CARROLL, J. D.; CHANG, J. J. Analysis of individual differences in multidimensional scaling via an N-way generalization of "Eckart-Young" decomposition. **Psychometrika**, 35, 1970. 283-319.
28. BRO, R. PARAFAC. Tutorial and applications. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 38, 1997. 149-171.
29. MURPHY, K. R. et al. Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. PARAFAC. **Analytical Methods**, 5, 2013. 6557-6566.
30. BRO, R.; KIERS, H. A. L. A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models. **Journal of Chemometrics**, 17, 2003. 274-286.
31. ACAR, E. et al. Structure-revealing data fusion. **BMC Bioinformatics**, 15, 2014. 239.
32. CASTANEDO, F. A Review of Data Fusion Techniques. **The Scientific World Journal**, 2013, 2013.
33. ACAR, E. et al. Coupled matrix factorization with sparse factors to identify potential biomarkers in metabolomics. **International Journal of Knowledge Discovery in Bioinformatics**, 3, 2012. 22-43.
34. CHO, J. et al. Highly efficient Blue-Emitting CdSe-derived Core/Shell Gradient Alloy Quantum Dots with Improved Photoluminescent Quantum Yield and Enhanced Photostability. **Langmuir**, 33, 2017. 3711-3719.
35. ROY, D. et al. Spectral and Temporal Optical Behavior of Blue-, Green-, Orange-, and Red-Emitting CdSe-Based Core/Gradient Alloy Shell/Shell Quantum Dots: Ensemble and Single-Particle Investigation Results. **The Journal of Physical Chemistry C**, 120, 2016. 3483-3491.
36. WANG, Y. et al. Simple synthesis of luminescent CdSe quantum dots from ascorbic acid and selenium dioxide. **Luminescence**, 30, 2015. 1375-1379.
37. DONG, M. et al. Synthesis of highly luminescent mercaptosuccinic acid-coated CdSe nanocrystals under atmospheric conditions. **Luminescence**, 29, 2014. 818-823.
38. LAN, Y. et al. Aqueous synthesis of highly luminescent CdSe quantum dots with narrow spectra using hydrazine hydrate reduction selenium. **Micro & Nano Letters**, 9, 2014. 202-205.
39. ROGACH, A. L. et al. Synthesis and characterization of a size series of extremely small thiol-stabilized CdSe nanocrystals. **The Journal of Physical Chemistry B**, 103, 1999. 3065-3069.
40. KALASAD, M. N.; RABINAL, M. K.; MULIMANI, B. G. Ambient synthesis and characterization of high-quality CdSe quantum dots by an aqueous route. **Langmuir**, v. 25, p. 12729-12735, 2009.

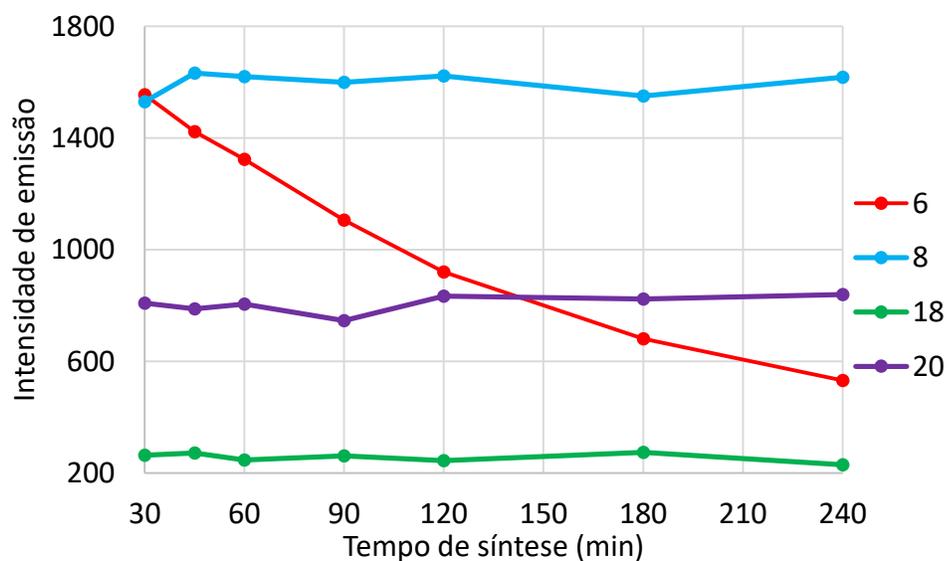
41. SIMÕES, E. F. C.; LEITÃO, J. M. M.; DA SILVA, J. C. G. E. NO Fluorescence Quantification by Chitosan CdSe Quantum Dots Nanocomposites. **Journal of fluorescence**, 24, 2014. 639-648.
42. SANTOS, C. I. L. et al. Synthesis, Optical Characterization, and Size Distribution Determination by Curve Resolution Methods of Water-Soluble CdSe Quantum Dots. **Materials Research**, v. 19, p. 1407-1416, 2016.
43. SONG, L.; DUAN, J.; ZHAN, J. Aqueous Synthesis of Highly Luminescent Amorphous CdSe Quantum Dots at Low Temperature. **Chemistry Letters**, 39, 2010. 942-943.
44. WANG, Y. et al. One-Pot Synthesis of CdSe Quantum Dots Using Selenium Dioxide as a Selenium Source in Aqueous Solution. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, 32, 2011. 2316-2318.
45. ETXEBERRIA, H. et al. Effect of different aqueous synthesis parameters on the size of CdSe nanocrystals. **Journal of Materials Science**, 47, 2012. 7167-7174.
46. HODLUR, R. M.; RABINAL, M. K. A new selenium precursor for the aqueous synthesis of luminescent CdSe quantum dots. **Chemical Engineering Journal**, 244, 2014. 82-88.
47. QIAN, S. Y. et al. Aqueous Synthesis of Luminescent CdSe Quantum Dots from Selenium Tetrachloride. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, 35, 2014. 1601-1602.
48. KAUR, G.; TRIPATHI, S. K. Size tuning of MAA capped CdSe and CdSe/CdS quantum dots and their stability in different pH environments. **Materials Chemistry and Physics**, 143, 2014. 514-523.
49. BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, 76, 2008. 965-977.
50. HE, Y. et al. Microwave-Assisted Synthesis of Water-Dispersed CdTe Nanocrystals with High Luminescent Efficiency and Narrow Size Distribution. **Chemistry of Materials**, 19, 2007. 359-365.
51. SWAYAMBUNATHAN, V. et al. Thiol Surface Complexation on Growing CdS Clusters. **Journal of the American Chemical Society**, 112, 1990. 3831-3837.
52. BRANDT, U.; DETERS, A.; STEINBÜCHEL, A. A jack-of-all-trades: 2-mercaptosuccinic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 99, 2015. 4545-4557.
53. LENZ, G. R.; MARTELL, A. E. Metal Chelates of Mercaptosuccinic and α,α' -Dimercaptosuccinic Acids. **Inorganic Chemistry**, 4, 1965. 378-384.
54. YING, E. et al. Synthesis and Bio-Imaging Application of Highly Luminescent Mercaptosuccinic Acid-Coated CdTe Nanocrystals. **PloS one**, 3, 2008. e2222.

55. KRÓLIKOWSKA, A.; BUKOWSKA, J. Self-assembled monolayers of mercaptosuccinic acid on silver and gold surfaces designed for protein binding. Part I: structure of the monolayer. **Journal of Raman Spectroscopy**, 38, 2007. 936-942.
56. ZEKARIAS, M. T.; RAO, G. N. Evaluation of protonation constants of mercaptosuccinic acid in aqueous solutions of propylene glycol and dioxan. **Journal of the Chilean Chemical Society**, 57, 2012. 1054-1057.
57. SOLTANI, N. et al. Visible Light-Induced Degradation of Methylene Blue in the Presence of Photocatalytic ZnS and CdS Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, 13, 2012. 12242-12258.
58. BÁNYAI, L.; KOCH, S. W. **World Scientific Series on Atomic, Molecular and Optical Physics: Semiconductor Quantum Dots**. Singapura: World Scientific, v. 2o, 1993. 256 p.
59. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7a. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.
60. BRUCHEZ JR., M. et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. **Science**, 281, 1998. 2013-2016.
61. CHAN, W. C. W.; NIE, S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. **Science**, 281, 1998. 2016-2018.
62. MARTINIĆ, I.; ELISEEVA, S. V.; PETOUD, S. Near-infrared emitting probes for biological imaging: Organic fluorophores, quantum dots, fluorescent proteins, lanthanide(III) complexes and nanomaterials. **Journal of Luminescence**, 189, 2017. 19-43.
63. KOBAYASHI, H. et al. New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging. **Chemical Reviews**, 110, 2010. 2620-2640.
64. PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 14, 2003. 198-219.
65. DELEKAR, S. D. et al. Synthesis and characterization of Cd₀. 7Pb₀. 3Se thin films for photoelectrochemical solar cell. **Solar Energy**, 84, 2010. 394-400.
66. DU, Y. et al. Near-infrared photoluminescent Ag₂S quantum dots from a single source precursor. **Journal of the American Chemical Society**, 132, 2010. 1470-1471.
67. GU, Y. P. et al. Ultrasmall near-infrared Ag₂Se quantum dots with tunable fluorescence for in vivo imaging. **Journal of the American Chemical Society**, 134, 2012. 79-82.
68. WANG, C. et al. Aqueous Synthesis of Nontoxic Ag₂Se/ZnSe Quantum Dots Designing as Fluorescence Sensors for Detection of Ag (I) and Cu (II) Ions. **Journal of Fluorescence**, 25, 2015. 41-48.
69. CHE, D. et al. Aqueous synthesis of high bright Ag₂SeZnSe quantum dots with tunable near-infrared emission. **Journal of Alloys and Compounds**, 678, 2016. 51-56.

70. TAN, L. et al. Aqueous synthesis of multidentate-polymer-capping Ag₂Se quantum dots with bright photoluminescence tunable in a second near-infrared biological window. **ACS Applied Materials & Interfaces**, 6, 2014. 6217-6222.
71. LESNICHAYA, M. V. et al. Synthesis of water-soluble silver selenide quantum dots luminescing within the transparency window of biological tissues. **Russian Journal of General Chemistry**, 88, 2018. 284-287.
72. LENZ, G. R.; MARTELL, A. E. Metal Chelates of Some Sulfur-containing Amino Acids. **Biochemistry**, 3, 1964. 745-750.
73. MCBRIDE, J. R. et al. On ultrasmall nanocrystals. **Chemical Physics Letters**, 498, 2010. 1-9.
74. ITOH, M. et al. Comprehensive study of sodium, copper, and silver clusters over a wide range of sizes $2 \leq N \leq 75$. **The Journal of Chemical Physics**, 131, 2009. 174510.
75. HARRELL, S. M.; MCBRIDE, J. R.; ROSENTHAL, S. J. Synthesis of ultrasmall and magic-sized CdSe nanocrystals. **Chemistry of Materials**, 25, 2013. 1199-1210.
76. KUDERA, S. et al. Sequential Growth of Magic-Size CdSe Nanocrystals. **Advanced Materials**, 19, 2007. 548-552.
77. EVANS, C. M. et al. Ultrabright PbSe magic-sized clusters. **Nano Letters**, 8, 2008. 2896-2899.
78. NINGTHOUJAM, R. S.; GAUTAM, A.; PADMA, N. Oleylamine as a reducing agent in syntheses of magic-size clusters and monodisperse quantum dots: optical and photoconductivity studies. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 19, 2017. 2294-2303.
79. HOCAOGLU, I. et al. Development of highly luminescent and cytocompatible near-IR-emitting aqueous Ag₂S quantum dots. **Journal of Materials Chemistry**, 22, 2012. 14674-14681.
80. JI, C. et al. Temperature-dependent photoluminescence of Ag₂Se quantum dots. **The Journal of Physical Chemistry C**, 119, 2015. 13841-13846.
81. CAO, Q. et al. Crystal defect-mediated band-gap engineering: a new strategy for tuning the optical properties of Ag₂Se quantum dots toward enhanced hydrogen evolution performance. **Journal of Materials Chemistry A**, 3, 2015. 20051-20055.
82. BILLETTER, H.; RUSCHEWITZ, U. Structural phase transitions in Ag₂Se (naumannite). **Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie**, 634, 2008. 241-246.
83. WANG, J. et al. Tetragonal–orthorhombic–cubic phase transitions in Ag₂Se nanocrystals. **Chemistry of Materials**, 26, 2014. 5647-5653.
84. SAHU, A. et al. Quantum confinement in silver selenide semiconductor nanocrystals. **Chemical Communications**, 48, 2012. 5458-5460.

85. SAPSFORD, K. E. et al. Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques. **Analytical Chemistry**, 83, 2011. 4453-4488.
86. MONAKHOVA, Y. B.; GORYACHEVA, I. Y. Chemometric analysis of luminescent quantum dots systems: long way to go but first steps taken. **Trends in Analytical Chemistry**, 82, 2016. 164-174.
87. LEITÃO, J. M. M.; GONÇALVES, H.; DA SILVA, J. C. G. E. Parallel factor analysis of EEM of the fluorescence of carbon dots nanoparticles. **Journal of Chemometrics**, 24, 2010. 655-664.
88. GONÇALVES, H.; MENDONÇA, C.; DA SILVA, J. C. G. E. PARAFAC analysis of the quenching of EEM of fluorescence of glutathione capped CdTe quantum dots by Pb(II). **Journal of Fluorescence**, 19, 2009. 141-149.
89. LEITÃO, J. M. M.; TAULER, R.; DA SILVA, J. C. G. E. Chemometric analysis of excitation emission matrices of fluorescent nanocomposites. **Journal of Fluorescence**, 21, 2011. 1987-1996.
90. YU, W. W. et al. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. **Chemistry of Materials**, 15, 2003. 2854-2860.
91. BAHRAM, M. et al. Handling of Rayleigh and Raman scatter for PARAFAC modeling of fluorescence data using interpolation. **Journal of Chemometrics**, 20, 2006. 99-105.
92. DE FARIA, D. L. A.; SANTOS, L. G. C.; GONÇALVES, N. S. Uma Demonstração Sobre o Espalhamento Inelástico de Luz: Repetindo o Experimento de Raman. **Química Nova**, 20, 1997. 319-323.
93. ACAR, E. et al. Structure-revealing data fusion model with applications in metabolomics. **Proceedings of 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society**, 2013. 6023-6026.

APÊNDICE A – VARIAÇÃO DA INTENSIDADE DE EMISSÃO ($\lambda_{exc} = 400$ nm) COM O TEMPO DE SÍNTESE, PARA AS SUSPENSÕES DE *QUANTUM DOTS* DE CdSe COM AS MAIORES INTENSIDADES DE EMISSÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^4



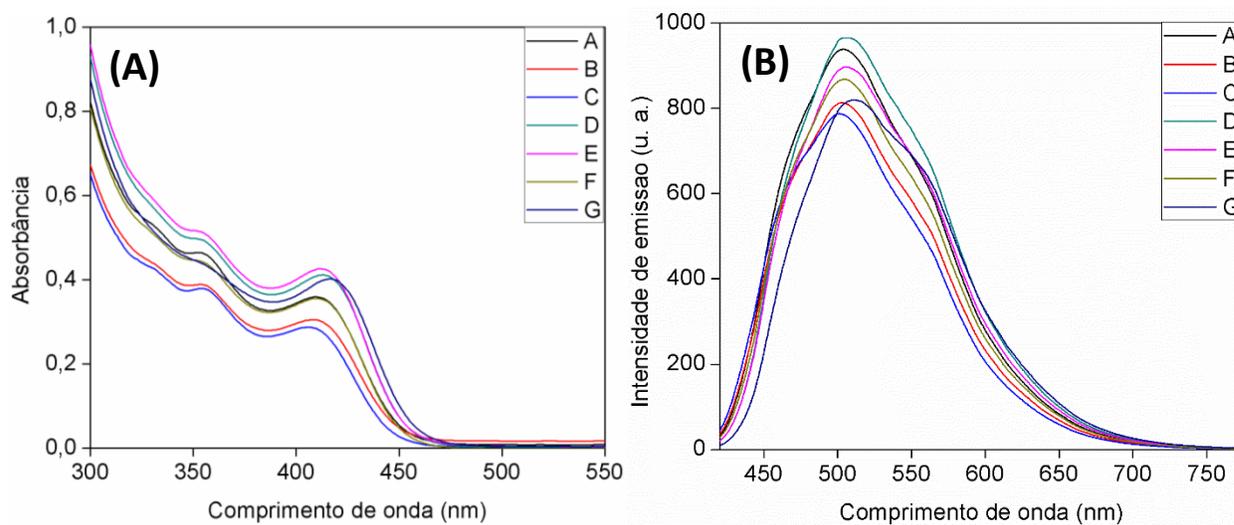
Fonte: A autora.

**APÊNDICE B – CARACTERÍSTICAS ÓPTICAS DE *QUANTUM DOTS* DE CdSe
SINTETIZADOS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA ÁREA DE
PLATÔ DAS SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA FIGURA 16**

Amostra	Razão molar de MSA: Cd	Razão molar de Cd: Se	pH	Temperatura (°C)	Intensidade de emissão (u. a.)	λ_{abs} (nm)	λ_{ems} (nm)	FWHM (nm)
A	6:1	8:1	5,0	30	2725	413	504	125
B	6:1	8:1	5,0	30	2745	411	503	125
C	6:1	8:1	5,0	30	2789	410	501	125
D	8:1	6:1	5,0	30	2518	415	507	125
E	8:1	6:1	5,0	30	2241	413	506	126
F	8:1	6:1	5,0	30	2550	414	505	124
G	10:1	4:1	5,0	30	2265	418	511	126

Fonte: A autora.

**APÊNDICE C – ESPECTROS DE (A) ABSORÇÃO E DE (B) EMISSÃO ($\lambda_{exc} = 400$ nm)
DE SUSPENSÕES DE *QUANTUM DOTS* DE CdSe SINTETIZADOS SOB AS
CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS ESPECIFICADAS NO APÊNDICE B E TEMPO DE
AGITAÇÃO DE 60 MIN**



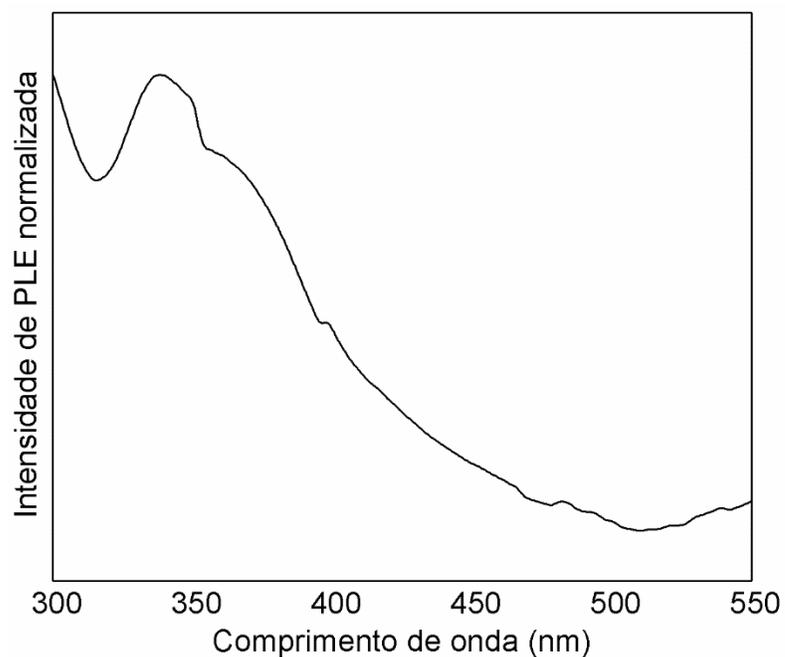
Fonte: A autora.

APÊNDICE D – CARACTERÍSTICAS ÓPTICAS DE *QUANTUM DOTS* DE Ag₂Se ESTABILIZADOS COM MSA SINTETIZADOS SOB CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS OTIMIZADAS: RAZÕES MOLARES DE MSA:Ag 6:1 E Ag:Se 8:1, pH 5,0, TEMPERATURA DE 60 °C E TEMPO DE AGITAÇÃO DE 20 MIN

Amostra	Intensidade de emissão (u. a.)	λ_{abs} (nm)	λ_{ems} (nm)	FWHM (nm)
A	168	580	790	103
B	66	582	768	122
C	113	585	813	96
D	93	582	788	113
E	103	586	785	113

Fonte: A autora.

**APÊNDICE E – ESPECTRO DE EXCITAÇÃO FOTOLUMINESCENTE ($\lambda_{\text{ems}} = 595 \text{ nm}$)
DE *QUANTUM DOTS* DE CdTe ESTABILIZADOS COM MSA OBTIDOS NAS
SEGUINTE CONDIÇÕES: RAZÃO MOLAR DE MSA: Cd DE 6:1, RAZÃO MOLAR DE
Cd:Te DE 8:1, pH 5,1, TEMPERATURA DE 100 °C E AGITAÇÃO POR 7 h**



Fonte: A autora.

**APÊNDICE F – FLUORESCÊNCIA DAS AMOSTRAS DETERMINADA PELO
MÉTODO DE REFERÊNCIA**

Amostra	Fluorescência (u. a.)				
	Semana 1	Semana 3	Semana 5	Semana 7	Semana 9
CT-1 (1)	1,17	1,00	1,05	1,08	1,02
CT-2 (2)	1,03	1,05	1,05	1,03	1,06
CT-3 (3)	1,10	1,03	1,08	1,07	1,10
CT-4 (4)	1,08	0,90	1,03	1,01	0,95
CT-5 (5)	0,70	0,72	0,60	0,79	0,76
CT-6 (6)	0,77	0,74	0,56	0,74	0,57
CT-7 (7)	0,77	0,74	0,58	0,83	0,66
CT-8 (8)	0,92	0,94	0,57	0,94	0,81
QD-1 (9)	1,43	1,19	1,33	1,50	1,51
QD-2 (10)	1,16	1,23	1,30	1,67	1,86
QD-3 (11)	1,13	1,47	2,49	3,87	1,99
QD-4 (12)	1,06	1,49	1,61	2,08	2,41
QD-5 (13)	42,00	42,37	58,98	61,75	59,54
QD-6 (14)	44,86	46,47	75,84	80,28	72,41
QD-7 (15)	25,62	32,71	48,76	58,09	64,78
QD-8 (16)	24,84	28,01	47,20	49,08	55,97

Fonte: A autora.

**APÊNDICE G – FLUORESCÊNCIA RELATIVA DAS AMOSTRAS CONTENDO
BIOCONJUGADOS, DETERMINADA PELO MÉTODO DE REFERÊNCIA**

Amostra	Fluorescência relativa (%)				
	Semana 1	Semana 3	Semana 5	Semana 7	Semana 9
QD-5 (13)	3990	3971	5242	4363	4762
QD-6 (14)	4268	4365	6769	5703	5813
QD-7 (15)	2394	3043	4317	4099	5190
QD-8 (16)	2318	2591	4175	3448	4471

Fonte: A autora.