



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANTÔNIO ALVERNES CARNEIRO CRUZ

PONTOS QUÂNTICOS DE CARBONO COMO UMA PLATAFORMA EMERGENTE
PARA A DETECÇÃO DE PROTEÍNAS

FORTALEZA

2016

ANTÔNIO ALVERNES CARNEIRO CRUZ

PONTOS QUÂNTICOS DE CARBONO COMO UMA PLATAFORMA EMERGENTE
PARA A DETECÇÃO DE PROTEÍNAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Química. Área de concentração: Físico Química.

Orientador: Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida.
Coorientador: Prof. Dr. Odair Pastor Ferreira.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C96p Cruz, Antônio Alvernes Carneiro.
Pontos quânticos de carbono como uma plataforma emergente para a detecção de proteínas / Antônio Alvernes Carneiro Cruz. – 2016.
50 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida.
Coorientação: Prof. Dr. Odair Pastor Ferreira.
1. Odair Pastor Ferreira. 2. Proteínas. 3. CQDs. 4. Fluorescência. I. Título.

CDD 572

ANTÔNIO ALVERNES CARNEIRO CRUZ

PONTOS QUÂNTICOS DE CARBONO COMO UMA PLATAFORMA EMERGENTE
PARA A DETECÇÃO DE PROTEÍNAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Química. Área de concentração: Físico Química.

Aprovada em: 25/02/2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fechine (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Odair Pastor Ferreira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Francisco de Araujo Cruz e Francisca Lucelina Carneiro Cruz, que sempre estiveram presentes e trabalharam muito para garantir uma boa educação para mim e meus irmãos.

Aos meus irmãos, Francisca Tatianne Carneiro Cruz e Antônio Eriko Carneiro Cruz, por serem grandes irmãos e amigos. A minha Tia Maria Lurdes Carneiro por todo seu apoio.

A todos os meus amigos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À FUNCAP, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa, e ao Departamento de Pós-Graduação em Química pela disponibilização da vaga para que eu pudesse concluir a pós-graduação.

Ao professor e também amigo Pierre Basílio Almeida Fechine, por toda paciência para a orientação durante o tempo do mestrado e pela enorme contribuição para a minha formação profissional e pessoal.

A todos os integrantes do laboratório GQMAT da Universidade Federal do Ceará pelo grande apoio e pela amizade.

Aos amigos que fiz durante toda a pós-graduação, pois estes contribuíram diretamente para a minha formação profissional e cidadã.

Agradeço a todas as pessoas que ajudaram, direta ou indiretamente, para a minha formação acadêmica e pessoal.

Aos professores participantes da banca examinadora, Prof^o Dr. Eduardo E Prof^o Dr. Odair, pelo tempo e pelas valiosas colaborações e sugestões.

A Nayane Amorim, Raquel Abreu, Helainne Alilad, Arthur Grangeiro, Viviane Ribeiro, Kelton Wadson, Alan Ibiapina, Edwilkens, Jorge Luiz, Alexandre Lima E Carolina Marques, amigos verdadeiros que sempre me incentivaram a seguir em frente, por suas reflexões, críticas e sugestões.

A Edina Ribeiro pelo companheirismo desde o início da minha graduação e sempre. Especialmente ao Rafael Freire e à professora Selma Mazzetto, pois talvez não existam palavras suficientes e significativas que me permitam agradecer com justiça e com o devido merecimento. A ajuda e o apoio de vocês foram para mim de valor inestimável e tudo o que me resta é expressar através da limitação de meras palavras e com elas prestar-lhes esta humilde, mas sincera homenagem. Muito obrigado.

"A educação tem raízes amargas, mas os seus frutos são doces."

Aristóteles

RESUMO

Uma nova estratégia para a detecção e identificação de proteínas foi estudada utilizando pontos quânticos de carbono (*CQDs* do inglês *Carbon quantum dots*). Esses foram preparados pelo método de *top-down* por meio de síntese de baixo custo por carbonização incompleta. Os *CQDs* preparados apresentaram hibridização sp^2 , uniformidade em tamanho e forte atividade fluorescente. Este material foi utilizado como elementos de sensoriamento para criar uma matriz de sensores fluorescentes. Foi preparado um sistema contendo a solução precursora da nanopartícula, adicionados de alíquotas das soluções de sais metálicos, com concentração final da solução de $30 \mu\text{M}$ do Cu^{2+} e Ni^{2+} e concentração final de $20 \mu\text{M}$ para o Fe^{3+} . Na presença de proteínas o sistema *CQDs-M* (Metal= Fe^{3+} , Cu^{2+} e Ni^{2+}) teve fluorescência alterada, produzindo padrões de respostas de fluorescência distintos para cada amostra. Essa alteração foi acompanhada por meio de análise linear discriminante (LDA), onde quatro proteínas (BSA, Hb, Mb e Cit C) em concentração de 50 nM foram discriminadas com sucesso. Esse trabalho demonstra que uma matriz de detecção de proteínas, baseada em sistemas de nanopartículas de carbono-metal, tem elevado potencial para aplicações em diagnóstico médico.

Palavras-chave: Nanosensor. Proteínas. *CQDs*. Fluorescência.

ABSTRACT

A new strategy for the detection and identification of proteins was studied using carbon quantum dots. These were prepared by the *top-down* method by means of low-cost synthesis by incomplete carbonization. The prepared *CQDs* showed sp^2 hybridization, uniformity in size and strong fluorescent activity. This material was used as sensing elements to create an array of fluorescent sensors. A system containing the precursor solution of the nanoparticle was prepared by adding aliquots of solutions of metal salts with final concentration solution of $30\mu\text{M}$ Cu^{2+} and Ni^{2+} concentration of $20\mu\text{M}$ for Fe^{3+} . In the presence of proteins the *CQDs-M* system (Metal= Fe^{3+} , Cu^{2+} and Ni^{2+}) had altered fluorescence, producing distinct fluorescence response patterns for each sample. This alteration was followed by linear discriminant analysis (LDA), where four proteins (BSA, Hb, Mb and Cit C) in a concentration of 50 nM were successfully discriminated. This work demonstrates that a protein detection matrix based on carbon-metal nanoparticle systems has high potential for medical diagnostic applications.

Keywords: Nanosensor. Proteins. CQDs. Fluorescence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Representação do grafeno.....	15
Figura 2	– Esquema de um biosensor.....	16
Figura 3	– A síntese de CQDs em solvente PEG200N via irradiação a laser.....	18
Figura 4	– A síntese por microondas de CQDs.....	19
Figura 5	– Hemoglobina humana.....	21
Figura 6	– Mioglobina humana.....	22
Figura 7	– Albumina do soro bovino (BSA).....	23
Figura 8	– Citocromo C.....	24
Figura 9	– A ilustração esquemática de determinação Hb usando CQDs como sonda fluorescente de excitação	25
Figura 10	– Esquema de síntese dos CQDs a partir da Carbonização do AC a 200°C	28
Figura 11	– Espectro de absorção dos CQDs. Fotografias (inset) de uma suspensão aquosa de CQDs sob a irradiação de luz visível (esquerda) e (direita) irradiação UV a 365 nm.....	33
Figura 12	– Os espectros de fluorescência dos CQDs em diferentes comprimentos de onda de excitação.....	34
Figura 13	– Espectro de Fluorescência de deslocamento de emissão dos CQDs.	35
Figura 14	– Espectro vibracional na região do Infravermelho (FTIR) dos CQDs....	36
Figura 15	– Espectro ramam do CQDs.....	38
Figura 16	– (a) Imagens topográficas e de fase da amostra de CQDs. (b) Gráfico de tamanho dos CQDs medidos.....	39
Figura 17	– Resposta de fluorescência dos CQD contra vários cátions metálicos a 50 µM. A intensidade de fluorescência foi investigada a 450 nm usando um comprimento de onda de excitação de 325 nm e	41

normalizada usando I/I_0 , onde I_0 e I denotam a intensidade antes e depois da adição de íons metálicos, respectivamente. Cada valor médio e desvio padrão foram calculados com base em três repetições.

- Figura 18 – Titulação de fluorescência realizada à temperatura ambiente para íons metálicos Cu^{2+} , Ni^{2+} e Fe^{3+} . A intensidade de fluorescência foi investigada a 450 nm utilizando um comprimento de onda de excitação de 325 nm e normalizada usando I/I_0 , onde I_0 e I denotam a intensidade antes e depois da adição de íons metálicos, respectivamente. Cada valor médio e desvio padrão foram calculados com base em três repetições. O destaque em cada gráfico denota a concentração escolhida para compor os conjuntos CQDs - Mn^{2+} 43
- Figura 19 – Tempo de supressão interação conjunto CQDs- M^{2+} e proteína..... 44
- Figura 20 – Esquema do método nose/tongue..... 45
- Figura 21 – Padrões de resposta da fluorescência ($\Delta I = I / I_0$) das nanopartículas de CQDs com 3 íons metálicos (Bioreceptor-transdutor) em relação a quatro proteínas (todos em 50nM): BSA, Mb, Hb, Cit C..... 46
- Figura 22 – Padrões de resposta de fluorescência dos CQDs com cinco metais contra 4 proteínas (todos a 50nM): citocromo C (CTC), hemoglobina (Hb), albumina de soro bovino (BSA), e mioglobina (Mb)..... 47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.2	Sensores	15
1.3	Pontos quânticos de carbono (cqds)	16
1.4	Preparação de nanopartículas de carbono	17
1.4.1	<i>Ablação química</i>	17
1.4.2	<i>Ablação por laser</i>	18
1.4.3	<i>Irradiação por microondas</i>	18
1.4.4	<i>Síntese Hidrotermal ou tratamento solvotérmico</i>	19
1.4.5	<i>Pirólise</i>	20
1.5	Biomoléculas	20
1.5.1	<i>Hemoglobina (Hb)</i>	21
1.5.2	<i>Mioglobina (Mb)</i>	22
1.5.3	<i>Albumina do Soro Bovino (BSA)</i>	23
1.5.4	<i>Citocromo c (Cit C)</i>	24
1.6	Aplicação de cqds como biosensores	25
2	OBJETIVOS	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	Reagentes utilizados	27
3.1.2	<i>Soluções</i>	27
3.1.3	<i>Síntese de CQDs</i>	27
3.1.4	<i>Purificação da Amostra</i>	28
3.2	Técnicas de caracterizações	28
3.2.1	<i>Determinações das propriedades ópticas</i>	28
3.2.1.1	<i>Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível (UV-vis)</i>	28

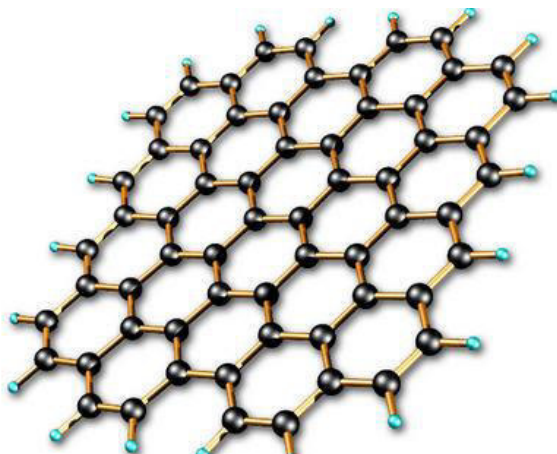
3.2.1.2	<i>Espectroscopia de fluorescência</i>	29
3.2.2	Caracterização estrutural	29
3.2.2.1	<i>Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho (FTIR)</i>	29
3.2.2.2	<i>Espectroscopia Raman</i>	29
3.2.3	Características morfológicas	30
3.2.3.1	<i>Microscopia de força atômica (AFM)</i>	30
3.2.4	Interação do CQDs com cátions metálicos	30
3.2.4.1	<i>Ensaio de emissão de fotoluminescência</i>	30
3.2.4.2	<i>Titulação do sistema de sensoriamento (CDs-M⁺)</i>	30
3.2.5	Estudo de estratégia para sensoriamento de proteínas	31
3.2.5.1	<i>Estratégia de sensoriamento de proteínas</i>	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
4.1	Caracterização das propriedades ópticas	33
4.1.1	<i>Espectroscopia de Absorção no UV-vis e de Fluorescência</i>	33
4.2	Caracterização estrutural	36
4.2.1	<i>Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho (FTIR)</i>	36
4.2.2	<i>Espectroscopia Ramam</i>	38
4.3	Características morfológicas	39
4.3.1	<i>Microscopia de força atômica (AFM)</i>	39
4.4	Receptores à base de íon metálico	40
4.4.1	<i>Escolha e otimização de proporções</i>	40
5	SELETIVIDADE DE PROTEÍNAS	45
6	CONCLUSÃO	48
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	49
	REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

Os nanomateriais são estruturas com tamanho entre 1-100nm pelo menos em uma das direções, com propriedades ópticas, elétricas, magnéticas e catalíticas (Li *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012). Dentre esses materiais destacamos as estruturas formadas por átomos de carbonos como: os fulerenos, os nanotubos e o grafeno. Todos fazem parte da família dos alótropos de carbono e o que os diferenciam é a maneira como os átomos estão organizados.

Dentre eles podemos destacar o grafeno formado por um plano de átomos de carbono que se arranjam entre si na forma de hexágonos, conforme representado na Figura 1, semelhantes a um favo de mel. É o material que, possui a mais alta resistência mecânica conhecida, sendo utilizado como um reforço para a obtenção de materiais resistentes à quebra. É um excelente condutor de eletricidade, não aquecendo facilmente, e por isso pode ser utilizado em dispositivos eletrônicos.

Figura 1- Representação do Grafeno.



Fonte: <https://meiobit.com/69984/grafeno-silicio/> acesso em 30 de novembro de 2015.

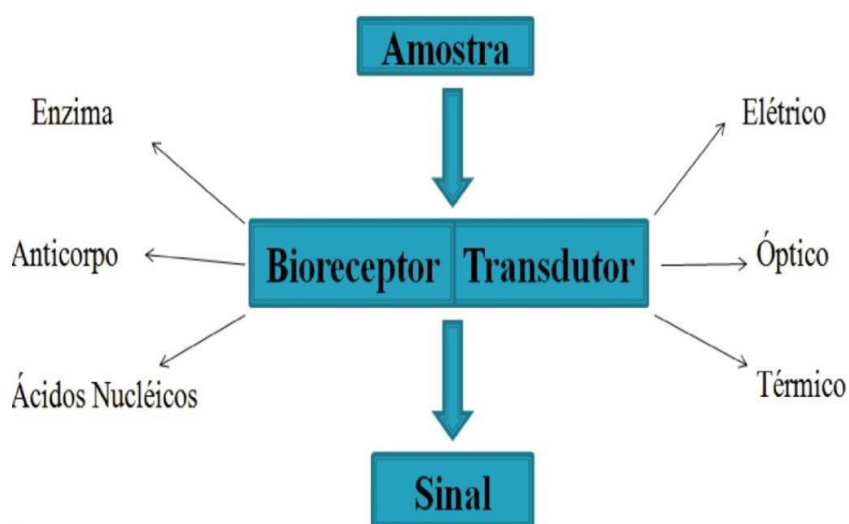
1.2 Sensores

Os nanomateriais podem ser utilizados em diversas áreas como: Medicina, Física, Química, assim, destacamos o uso desses nanomateriais para o

desenvolvimento de tecnologias de detecção: os biosensores. (Liu *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2011).

O biosensor é um dispositivo composto de um transdutor e um elemento biológico (bioelemento) que pode ser uma enzima, um anticorpo, ou um ácido nucléico. Durante seu funcionamento, conforme figura 2, o bioelemento interage com o analito e a resposta biológica é convertida em um sinal, que poder ser elétrico, óptico ou térmico pelo transdutor.

Figura 2- Esquema de um Biosensor.



Fonte: Autor

1.3 Pontos quânticos de carbono (CQDs)

Com o desenvolvimento e descobertas recentes de novos materiais destacamos as nanopartículas de carbono, uma nova classe, com tamanhos abaixo de 10 nm. Foram obtida pela primeira vez por Xu *et al* em 2004 (Xu *et al.*, 2004) e sua principal característica é a emissão dependente do comprimento de onda de excitação. Além disso, podem ser preparados por uma enorme variedade de rotas sintéticas simples, rápidas e baratas.

Em sua estrutura, dependendo do material de partida, possui a presença de grupamentos como: carboxila(-COOH), amina (-NH₂), carbonila(-C=O) e hidroxila(-OH), que conferem excelente capacidade de dispersão em água e fotoestabilidade, possuem também baixa toxicidade e a boa permeabilidade celular(Sun e Lei, 2017).

Diante dessas propriedades, os *CQDs* são excelentes materiais substitutos dos pontos quânticos inorgânicos (QDs), cuja composição está baseada em metais tóxicos como selênio (Se) e cádmio (Cd) (Ding *et al.*, 2013; Lim, Shen e Gao, 2014; Machado *et al.*, 2015). Suas estruturas confinam os elétrons nas três dimensões, comportam-se como átomos artificiais, que resultam em uma forte quantização dos níveis de energia. São utilizados em muitas aplicações, tais como fotocatalisador, diodos emissores de luz (LEDs) e sensores de bioensaios, que envolvem principalmente a detecção de proteínas e ácidos nucleicos(Bag *et al.*, 2015).

1.4 Preparação de Nanopartículas de Carbono

Os parâmetros de síntese, como temperatura, tempo, solvente, podem alterar as propriedades dos *CQDs*. Com esse intuito várias rotas sintéticas têm sido exploradas para sintetizá-los, dentre elas destacamos:

1.4.1 Ablação química

Nesta rota sintética são utilizados ácidos considerados fortes com alto poder oxidativo para carbonizar moléculas orgânicas em materiais carbonáceos. Para esta síntese relatamos o trabalho de Peng e Travas-Sejdić, que desidrataram carboidratos com ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado (Peng e Travas-sejdic, 2009). Outro trabalho relevante foi apresentado por Shen, Liming *et al* que sintetizaram *CQDs* desidratando polietilenimina (PEI) com ácido nítrico (HNO₃) concentrado (Shen *et al.*, 2013).

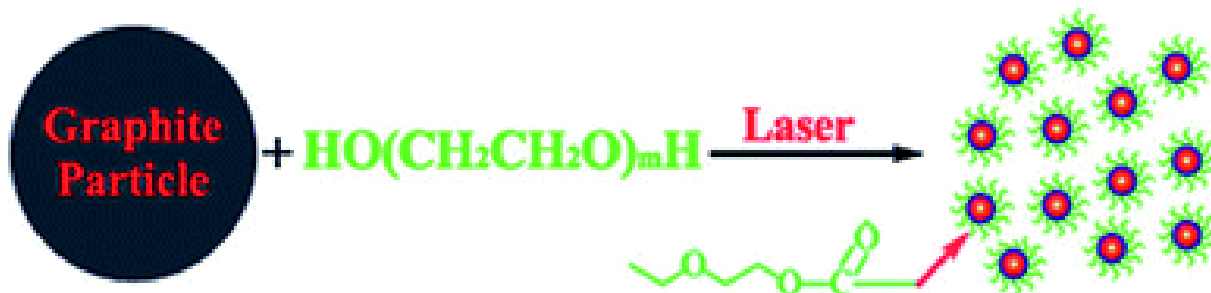
1.4.2 Ablação por laser

Esse tipo de síntese foi destacado no trabalho publicado por *Hu, sheng-liang et al.*, segundo seus relatos, materiais de carbonos suspensos em solventes orgânicos, por exemplo, hidrato de diamina, dietanolamina, e PEG200N (*Hu et al.*, 2009) foram irradiados com *laser* e o produto da reação apresentou excelente luminescência, ilustrado na Figura 3.

Figura 3- A síntese de CQDs em solvente PEG200N via irradiação laser.

Fonte: Hu, sheng-liang et al. Schematic map of the one-step synthesis of luminescent CNPs in PEG_{200N} solvent (*Hu et al.*, 2009).

O mesmo método foi abordado por *Li et al.*, que dispersaram

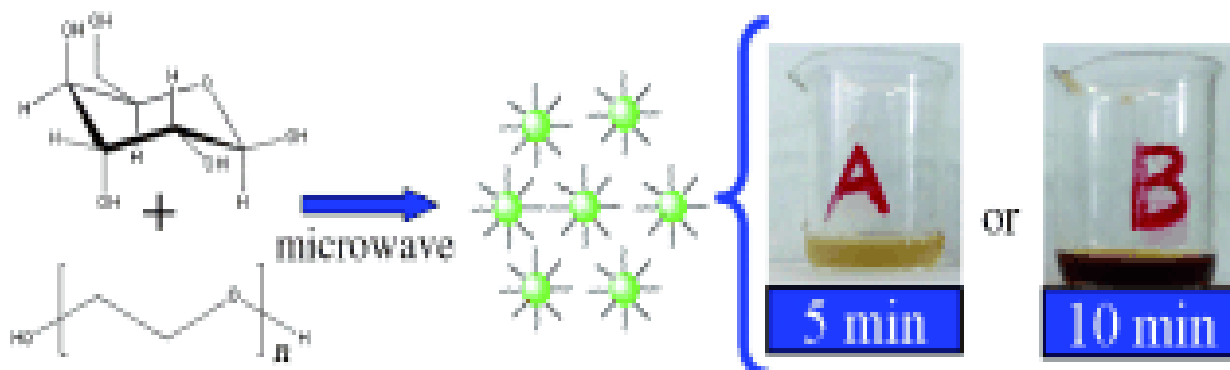


nanomateriais de carbono em etanol, acetona ou água (*Li et al.*, 2011), em seguida sonicaram e, posteriormente, irradiaram a *laser*.

1.4.3 Irradiação por microondas

A literatura relata uma rota sintética de *CQDs* por irradiação no micro-ondas. É um método rápido, fácil e de baixo custo. *Y. Liu* e colaboradores (*Liu*, 2013) produziram *CQDs* irradiando sacarose e dietilenoglicol (DEG) no micro-ondas, conforme figura 4. Os *CQDs* produzidos apresentaram forte emissão na região do verde, excelente solubilidade em água, e exibiram baixa citotoxicidade.

Figura 4- A síntese por microondas de CQDs.



Fonte: S. N. BAKER AND G. A. BAKER, "Luminescent carbon nanodots: Emergent nanolights(Baker e Baker, 2010).

Outro trabalho relevante foi publicado por *Liu et al.* que promoveram a pirólise do ácido cítrico com várias moléculas de amina (Links, 2012) *no micro-ondas*. O material resultante tinha alta luminescência, especialmente para moléculas de aminas primárias, que desempenharam dupla função: precursores e agentes passivadores.

1.4.4 Síntese Hidrotérmica ou tratamento solvotérmico

A Carbonização hidrotérmica ou carbonização solvotérmica é uma rota de baixo custo e não tóxica, podendo produzir novos materiais à base de carbono a partir de vários precursores. No trabalho desenvolvido por *Sahu et al.*, os CQDs foram preparados por tratamento hidrotérmico do sumo de laranja, produzindo materiais fotoluminescentes com um rendimento quântico de 26% (*Sahu et al.*, 2012), tamanhos entre 1,5-4,5 nm e aplicados em bioimagem.

1.4.5 Pirólise

Para aplicações particulares é importante controlar os tamanhos dos *CQDs* com propriedades uniformes. Muitas abordagens têm sido propostas durante a preparação ou pós-tratamento. Na maior parte dos casos, produtos foram sintetizados, purificados por meio de tratamentos de filtração, diálise, centrifugação, cromatografia em coluna e gel de eletroforese para o controle do tamanho.

No caso de Zhu et al., sintetizaram *CQDs* hidrofílicos impregnando ácido cítrico em nanoreatores de sílica mesoporosa (Zong *et al.*, 2011). O material foi submetido à pirólise e à remoção da sílica foi feita por diálise. A amostra obtida apresentou fotoestabilidade, baixa toxicidade, luminescência, e propriedade *up-conversion*.

Diante do apresentado e considerando os aspectos de preocupações com a saúde, impactos ambientais e biológicos levaram os pesquisadores a dar maior atenção aos pontos quânticos de carbono (*CQDs*) em relação aos pontos quânticos inorgânicos (*QDs*). Visto que os *CQDs* oferecem grande vantagem por causa da baixa toxicidade, síntese fácil e materiais de partida com baixo custo.

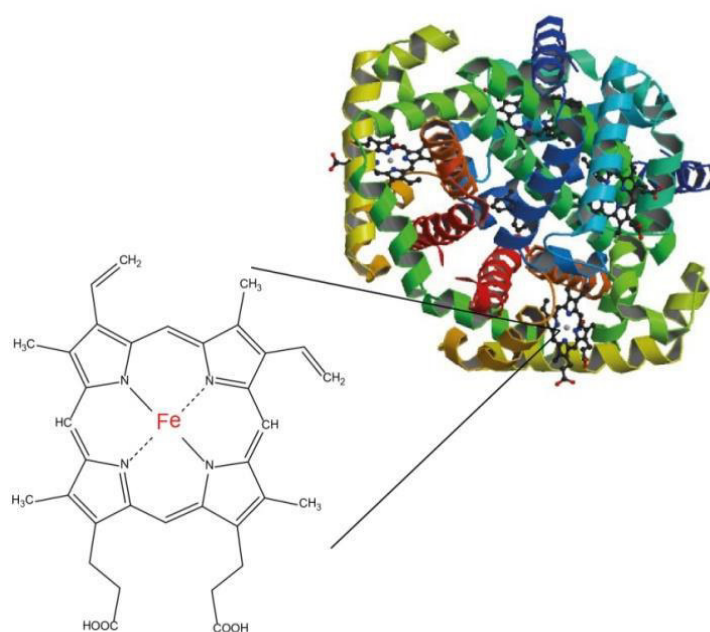
1.5 Biomoléculas

As proteínas são biomacromoléculas envolvidas em praticamente em todos os eventos biológicos. As suas funções fisiológicas, inclui reconhecimento molecular, as atividades enzimáticas, transporte iônico e a transdução de sinal podem ser destacadas para exemplificar a importância dessas biomoléculas. Neste tópico abordaremos as principais características das proteínas estudadas em nosso trabalho.

1.5.1 Hemoglobina (Hb)

A hemoglobina é uma metaloproteína, figura 5, de massa molecular de 64,5 kDa, que compreende quatro cadeias polipeptídicas. Cada cadeia está ligada a um grupo heme e esses possuem um íon ferro no seu centro, que formam seis ligações coordenadas: quatro com átomos de nitrogênio do grupo planar da porfirina, uma a um átomo de nitrogênio da proteína e outra a uma molécula de oxigênio permitindo o transporte de oxigênio pelo sistema circulatório (Chatterjee e Kumar, 2014). Sua quantidade está associada a diversas doenças clínicas como a leucemia, anemia e doenças no coração (Huang *et al.*, 2015).

Figura 5- Hemoglobina Humana.

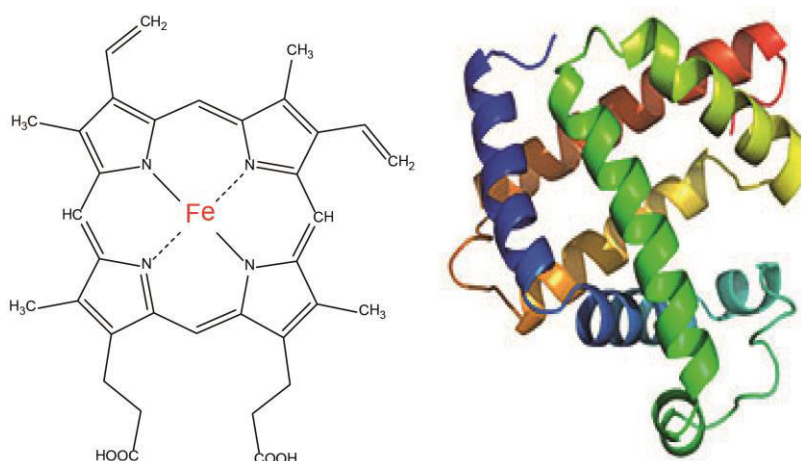


Fonte: Figura desenhada com o software Pymol a partir do número de identificação 4N8T no protein data bank.

1.5.2 Mioglobina (Mb)

A mioglobina (Mb) é uma proteína globular formada por uma cadeia de 154 aminoácidos, figura 6, com um peso molecular de 16,7 Kda. É uma das proteínas mais simples que armazena oxigênio molecular (O_2) (Chatterjee e Kumar, 2014), sendo a principal armazenadora intracelular de oxigênio nos músculos. Entretanto, não realiza o transporte do oxigênio, papel realizado pela hemoglobina, à qual se assemelha estruturalmente. A mioglobina não tem efeito cooperativo quando se liga ao oxigênio, por ser monomérica, isto é, formada por uma única subunidade.

Figura 6- Mioglobina Humana.



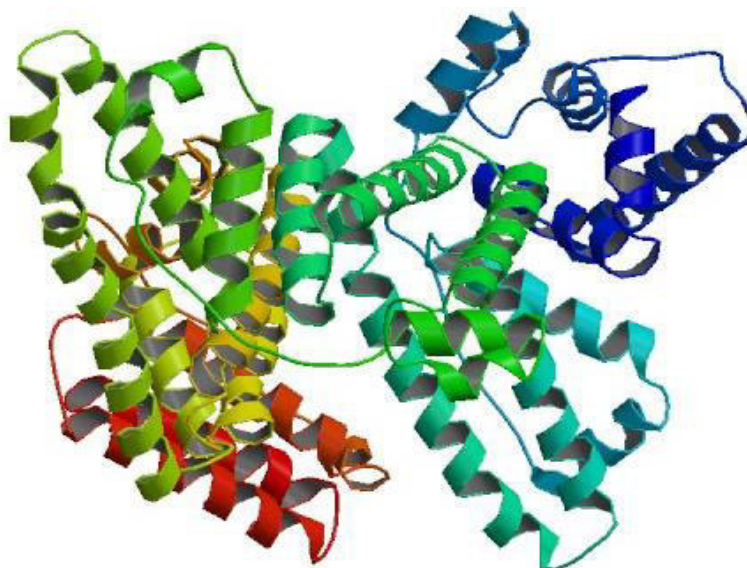
Fonte: Figura desenhada com o software Pymol a partir do número de identificação 3VM9 no protein data bank.

Embora uma proteína especificamente muscular tenha sido amplamente sugerida como um dos melhores marcadores para o diagnóstico precoce do infarto agudo do miocárdio (AMI), geralmente, a Mb está presente em concentrações muito baixas (0,48-5,9 nM) no soro de indivíduos saudáveis. Quando tecidos musculares são danificados, a Mb é liberada rapidamente para a circulação e a sua concentração no soro é expressivamente elevada a 4,8 μ M (Wang, Q. *et al.*, 2015).

1.5.3 Albumina do Soro Bovino (BSA)

A albumina de soro bovino (BSA), figura 7, é uma proteína transportadora multifuncional. Acredita-se que ela possa ser uma transportadora ou reservatório de óxido nítrico e desta forma possa estar relacionada com importantes processos fisiológicos ainda não compreendidos, envolvendo o NO (Paulo e Libardi, 2010). Representa cerca de 10% do total de proteínas do soro de leite bovino, sua cadeia de aminoácidos é composta de 583 unidades, totalizando a massa molecular de 66,4 KDa. A estrutura secundária é caracterizada por um alto conteúdo de α -helice (~51%) e quase nenhuma estrutura β .

Figura 7- Albumina do soro bovino (BSA).



Fonte: Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. (1E78)

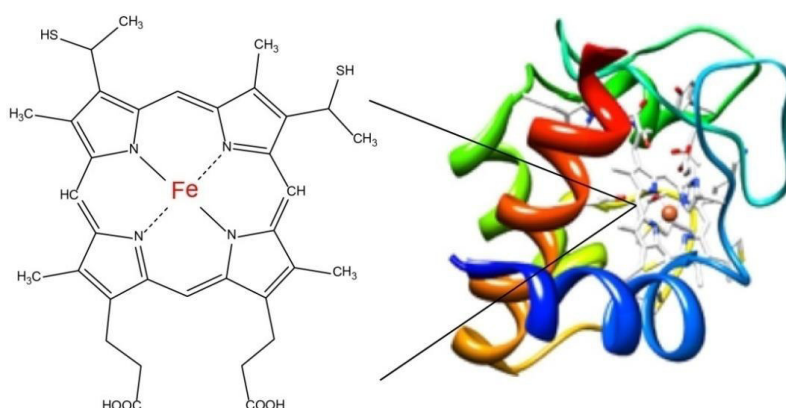
A BSA tem grande afinidade por ácidos graxos, hematina, bilirrubina e por pequenos compostos aromáticos negativamente carregados. Forma ligações covalentes com fosfato piridoxil, cisteína, glutatona e vários metais, como: Cobre, Níquel, Mercúrio, Prata e Ouro.

1.5.4 Citocromo c (*Cit c*)

A deficiência de *Cit c* pode desencadear atrasos psicomotores e doenças neurodegenerativas. Possui massa molecular ~13 kDa e 105 aminoácidos longos. Compõe a cadeia respiratória mitocondrial, sendo importado como uma apoenzima para a mitocôndria, onde é então convertida para a sua forma madura pela adição de um grupo heme.

No grupo heme prostético (Figura 8) o átomo de ferro funciona como transportador de elétrons, variando entre os estados de oxidação +2 e +3. Na cadeia de transporte de elétrons existem três tipos de citocromos: *a*, *b* e *c*, que diferem quanto ao grupo heme e à sua forma de ligação à cadeia protéica (Tognaccini *et al.*, 2016).

Figura 8- Citocromo C.



Fonte: Estrutura obtida com o software Pymol a partir do número de identificação 5EXQ no protein data bank²⁴.

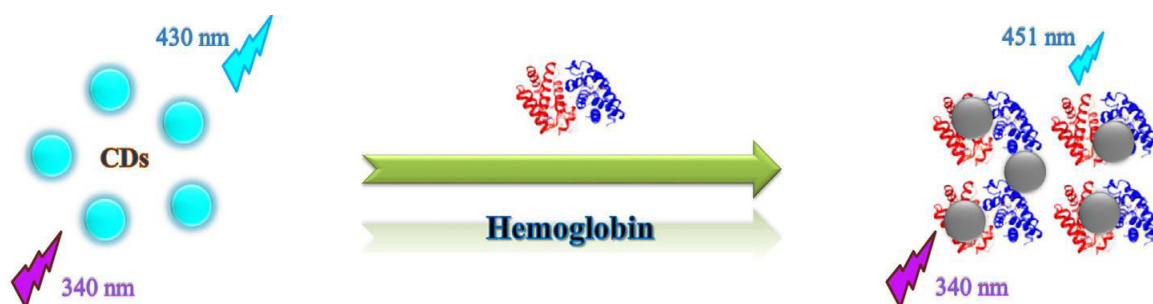
O *Cit c* é uma proteína de múltiplas funções, tendo importante papel já bem definido na cadeia respiratória e no processo apoptótico. É também empregado como um importante marcador no estudo taxonômico das espécies atuando como carreador de elétrons na cadeia respiratória de todos os organismos aeróbicos, procarióticos e eucarióticos. Parece apresentar também um papel antioxidante de conversão de íon superóxido em oxigênio molecular.

1.6 Aplicação de CQDs como biosensores

Por seus grupos funcionais presentes em sua superfície, os *CQDs* possuem afinidades distintas para diferentes íons, que resultam em diferentes seletividades. Por exemplo, *Zhao et al* conseguiram detectar íons Hg^{2+} utilizando *CQDs* (*Zhai et al.*, 2014). Em outro trabalho, *Wang et al* conseguiu detectar Fe^{3+} com limite de detecção de $0,32 \mu\text{M}$ (*Achtung e lii*, 2013).

Recentemente, *Shan Huang et al* desenvolveram um método simples e sensível de detecção fluorescente para a *Hb* usando *CQDs* como sonda fluorescente (Figura 9). Neste estudo, foi possível detectar *Hb* em concentrações próximas a $0,12 \text{ nm}$. O método apresentado foi aplicado para a detecção da proteína em amostras sintéticas de urina humana e amostras de sangue humano (*Huang et al.*, 2015).

Figura 9- A ilustração esquemática de determinação *Hb* usando *CQDs* como sonda fluorescente de excitação.



Fonte: HUANG, SHAN ET AL. A carbon dots based fluorescent probe for selective and sensitive detection of hemoglobin³²

Sendo assim, os *CQDs* tem um enorme potencial para desenvolver sensores no intuito de identificar outros analitos, por exemplo, as proteínas. Seus métodos de identificação são constituídas de técnicas consideradas de alto valor, é o caso do ensaio imuno absorvente ligado a enzima (ELISA), outras não adaptáveis para análise rápidas de rotina, como a espectroscopia de massa, e algumas por serem tóxicas, como o alta-resolução de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE).

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais:

- Obter *CQDs* com as propriedades fotoluminescentes visando sua utilização como biosensores de proteínas.

Objetivos específicos:

- Sintetizar *CQDs* através da decomposição térmica do ácido cítrico;
- Avaliar o comportamento da interação íon metálico-nanopartícula de carbono e como os íons metálicos podem interferir nas propriedades ópticas dos *CQDs*;
- Avaliar a interação receptor (íon metálico-nanopartícula) - analito (proteínas);
- Propor uma estratégia de identificação de proteínas por Análise Linear Discriminante (LDA);
- Identificar as proteínas: Albumina de Soro Bovino (BSA), Hemoglobina (Hb), Mioglobina (Mb) e Citocromo C (Cit C) por Análise Linear Discriminante (LDA).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes utilizados

Todos os reagentes: ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), nitrato de alumínio nonaidratado ($Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$), nitrato de níquel(II) hexaidratado ($Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$), sulfato de magnésio monoidratado ($MgSO_4 \cdot XH_2O$), cloreto de cálcio diidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), sulfato de mangânes monoidratado ($MnSO_4 \cdot H_2O$), sulfato de cobre(II) pentaidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), sulfato de zinco heptaidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), cloreto de potássio (KCl) e cloreto de ferro(III) hexaidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) foram adquiridos da marca **VETEC**. As proteínas Hemoglobina (Hb) com 99% grau de pureza, Citocromo c (Cit c) com 95% grau de pureza, Mioglobina (Mb) com 99% grau de pureza, BSA com 99% de pureza foram adquiridas da marca **SIGMA ALDRICH**. Todos os reagentes não passaram por qualquer tratamento prévio visando sua purificação.

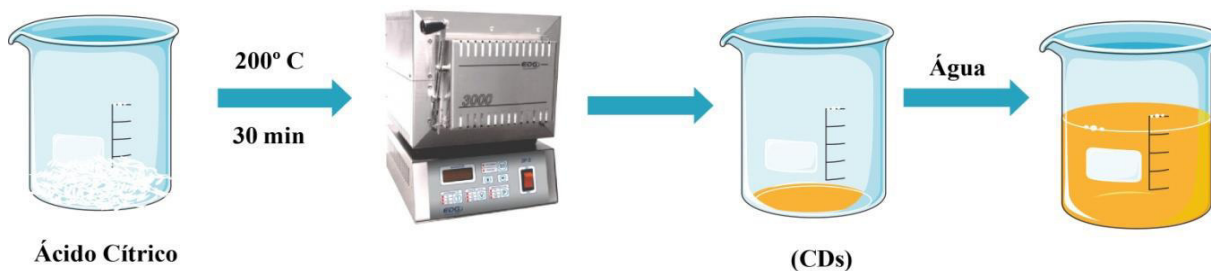
3.1.2 Soluções

As soluções utilizadas nas sínteses foram preparadas a partir da dissolução de seus respectivos precursores em água ultrapura obtida por sistema Milli-Q modelo Milli-Q Academic A10 System-2. A água produzida apresentou resistividade 18.2 Ω .

3.1.3 Síntese de CQDs

As nanopartículas de *CQDs* foram sintetizadas seguindo o trabalho realizado por *Wang et al.* (*Wang, S. et al., 2015*) por decomposição térmica do ácido cítrico (AC). Em um procedimento típico, primeiramente, 500 mg do ácido foi adicionado ao béquer de 10 mL. Em seguida, o referido recipiente foi conduzida à mufla ajustada na temperatura de 200 ° C por um período de 30 minutos. Após essa etapa, o produto da reação foi completamente solubilizado em água Milli-Q, conforme ilustrado na figura 10.

Figura 10- Esquema de síntese dos *CQDs* a partir da Carbonização do AC a 200°C.



Fonte: Autor.

3.1.3 Purificação da Amostra

As nanopartículas foram purificadas por meio de diálise. A amostra foi colocada dentro da membrana Spectra/Por® 6 RC Tubing MWCO 1kD, em seguida, imersa em um recipiente contendo água ultrapura sob lenta agitação e, durante o procedimento, no período de 24h, substituiu-se a água ultra-pura do recipiente repetidas vezes.

3.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÕES

3.2.1 Determinações das propriedades ópticas

3.2.1.1 Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível (UV-vis)

As análises foram realizadas em um espectrofotômetro *Agilent Technologies*, modelo Cary 60. Os espectros foram obtidos usando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. As amostras foram diluídas em água ultrapura. Os espectros foram coletados na faixa de 250- 650 nm à temperatura ambiente.

3.2.1.2 Espectroscopia de fluorescência

Estas medidas foram realizadas utilizando o Fluorímetro QM-40 (PTI) e 2 mL da amostra em cubeta de quartzo. O espectro de emissão foi obtido através de excitações (λ_{exc}) entre 325nm - 395nm com fenda de abertura de 1 nm de excitação.

3.2.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

3.2.2.1 Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho (FTIR)

Os espectros foram obtidos em um equipamento *Bruker*, modelo Vertex 70 V. Para a realização das medidas, as amostras foram liofilizadas e previamente diluídas em KBr seco e pastilhados. Os espectros foram coletados na faixa de 400 – 4000 cm^{-1} .

3.2.2.2 Espectroscopia Raman

Os espectros foram obtidos em um equipamento *Horiba*, modelo *Labram Jobin Yvon*. Para a realização das medidas, as amostras foram depositadas em lamínula e levadas a um equipamento de *spin coating* para formar finos filmes. Os espectros foram coletados na faixa de 1000 – 2000 cm^{-1} usando um *laser* de excitação de 633 nm.

3.2.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

3.2.3.1 Microscopia de força atômica (AFM)

As amostras de *CQDs* foram analisadas em um microscópio de força atômica, marca *Asylum Research*, do tipo MFP-3D AFM, onde foram feitas imagens topográficas de fase e de atrito (*friction*). Para as medidas, as amostras foram preparadas, com o auxílio de um *spin coating*. Foram feitos mapas de volume de força (FV), de $3,31\mu\text{m} \times 3,31\mu\text{m}$. Cada um deles foi produzido na frequência de varredura de 1Hz. O cantilever utilizado em todas as medidas de FV, assim como nas imagens topográficas e de *friction*, possui constante de mola nominal de 0,57 N/m. As imagens topográficas foram realizadas no modo contato, com tamanho lateral de $3,31\ \mu\text{m}$ e taxa de varredura de 1 Hz.

3.2.4 INTERAÇÃO DO CQDS COM CÁTIOS METÁLICOS

3.2.4.1 Ensaio de emissão de fotoluminescência

Dispersões contendo *CQDs* à 20 mg/mL foram preparadas por diluição da solução-mãe com concentração conhecida e aferida a partir de uma curva de calibração previamente realizada. Em seguida, na cubeta de quartzo, foram adicionados 2 mL da dispersão preparada e adicionadas alíquotas de $20\mu\text{L}$ das soluções de sais metálicos (Al^{3+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , K^+ e Fe^{3+}) formando uma solução final de concentração de $50\ \mu\text{M}$. A emissão foi medida utilizando $\lambda_{\text{exc}} = 325\ \text{nm}$, com fenda de abertura de 1nm.

3.2.4.2 Titulação do sistema de sensoriamento (*CDs-M⁺*)

Construiu-se uma curva de máxima intensidade de emissão em função da concentração dos cátions metálicos, que suprimiram melhor a fluorescência dos

CQDs, conforme descrito na seção 3.2.4.1. Para esses cátions (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+}), inicialmente foi preparado uma solução-mãe de concentração 0,006 mol/L. Em seguida, na cubeta de quartzo, foi adicionado 2 mL da solução precursora da nanopartícula e adicionadas alíquotas das soluções de cada sal metálico, formando uma solução final de concentração na faixa de 10-70 μM . As medidas de emissão foram realizadas com $\lambda_{\text{exc}} = 325$ nm e fenda de abertura de 1 nm.

3.2.5 ESTUDO DE ESTRATÉGIA PARA SENSORIAMENTO DE PROTEÍNAS.

3.2.5.1 Estratégia de sensoriamento de proteínas

Inicialmente, foram preparadas soluções estoque de *CQDs*, cátions metálicos e proteínas. Em seguida, uma solução estoque de *CQDs* foi primeiramente preparada em tampão fosfato (PB, 5 mM, pH 7,4). A absorvência desta solução foi medida a 340 nm e a concentração dos *CQDs* foi obtida com precisão com base na curva de calibração.

Foram escolhidas soluções de íons metálicos de concentração adequada quanto à otimização da razão através de curvas de titulação preparadas usando PB. Posteriormente, uma solução estoque de cada proteína analítica também foi preparada em PB. As concentrações dessas soluções foram adquiridas por medidas de absorvência a 280 nm.

Neste caso, a concentração de proteína foi calculada usando a lei de Beer-Lambert ($C = A_{280} / (\epsilon_{280} \cdot l)$. Uma vez que as soluções estoque foram preparadas, outro teste de estabilidade foi realizado nesta etapa para saber o tempo em que a interação entre os conjuntos de *CQDs* - Mn^{+} e proteínas analíticas seria estável.

Foram adicionados 2 mL de uma dispersão de *CQDs* (20 mg/mL) numa cubeta de quartzo e a emissão de fluorescência foi registrada a 450 nm utilizando 325 nm como comprimento de onda de excitação. Subsequentemente, 30 μL de uma solução contendo BSA foram colocados na cubeta e a intensidade de fluorescência foi medida a cada 1 min durante 30 min.

Este procedimento foi realizado em triplicata. Depois disso, os experimentos de detecção foram realizados. Para este propósito, 2 mL da solução de *CQDs* (20

mg.mL⁻¹) e 30 µL da solução de íon metálico foram adicionados à cubeta para formar o receptor baseado no “Nose-tongue”.

Após 7 min (com base no teste de estabilidade), o espectro de fluorescência (350 - 650 nm) foi medido utilizando a excitação a 325 nm. Esta medida foi considerada como o valor em branco e foi usada para identificar os *CQDs*. Subsequentemente, adicionou-se 30µL de solução proteica da proteína analítica para obter 50 nM na cubeta. Após 20 min (com base no teste de estabilidade), o espectro de fluorescência na faixa de 350-650 nm foi novamente gravado utilizando o comprimento de onda de excitação em 325nm.

Este procedimento foi realizado para BSA, Hemoglobina (Hem), Miglobina (Mb) e Citocromo C (Cit C) em três repetições foram realizadas para cada uma delas. Portanto, 4 proteínas foram testadas contra os três *CQDs-M+* em triplicata, o que gera uma matriz de dados de treinamento de 3 receptores baseados no nariz x 4 proteínas x 3 réplicas. Embora seja importante enfatizar que todo o espectro foi designado como uma resposta. Portanto, a matriz de dados brutos possui um grande número de variáveis (53 variáveis por *CQDs-M+*).

Todos os dados gerados foram então processados por meio de ferramentas estatísticas através de um software aberto chamado R Project (Team, 2015). No entanto, uma seleção das variáveis mais significativas para classificação foi inicialmente realizada utilizando um método stepwise (pacote *klaR*) para diminuir o volume de dados. Subsequentemente, estes dados pré-processados foram ainda analisados usando através de análise discriminante linear (LDA) para discriminar as proteínas analíticas a 50 nM. Nesta etapa, os pacotes *MASS* e *Rpart* foram utilizados. A rotina passo-a-passo foi definida no software do projeto R e a análise dos dados foi realizada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

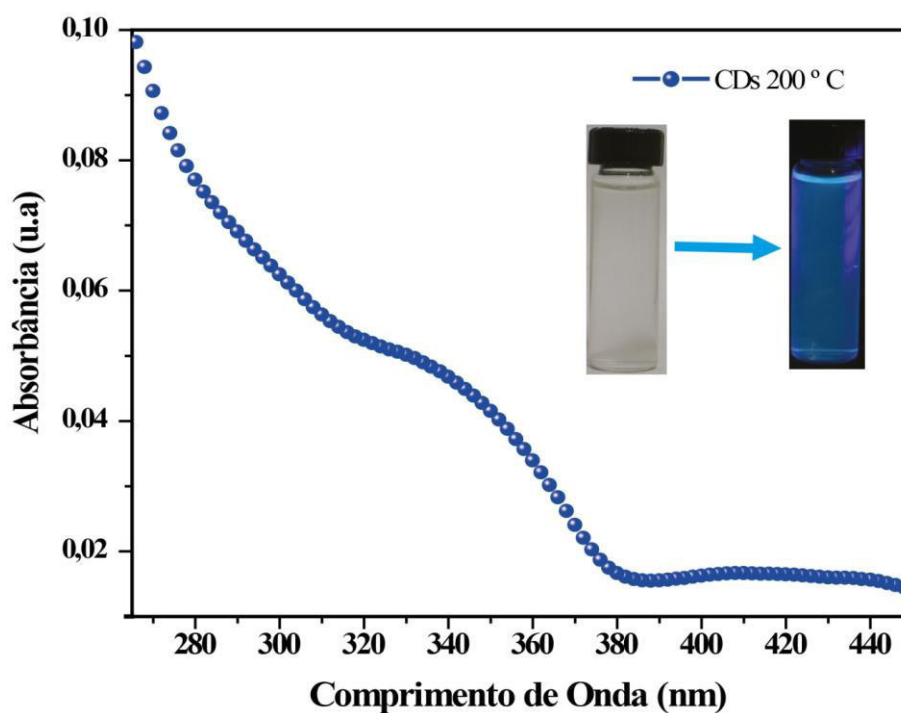
4.1 Caracterização das propriedades ópticas

As propriedades ópticas dos *CQDs* foram monitoradas por espectroscopia de UV-vis e fotoluminescência.

4.1.1 Espectroscopia de Absorção no UV-vis e de Fluorescência

Na espectroscopia do UV-vis, as principais características correspondentes aos *CQDs* foram avaliadas pelas medidas de absorção na região de 200-700nm. Sob luz visível, a suspensão apresentou-se incolor e, quando expostas sob luz ultravioleta de 365nm, uma forte luminescência azul foi observada, como mostrado *inset* na figura 11.

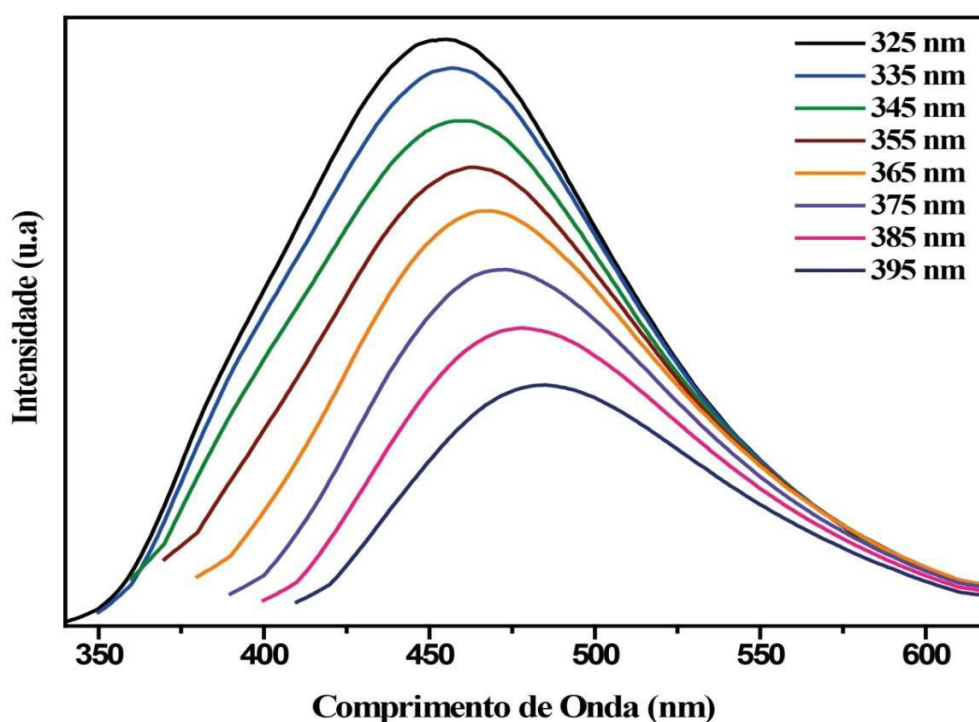
Figura 11- Espectro de absorção dos *CQDs*.



Fonte: Autor.

Uma banda de absorção em 340nm foi observada e identificada no espectro UV-vis, correspondente às transições do tipo $\eta-\pi^*$ (Dong, Shao, *et al.*, 2012; Lim, Shen e Gao, 2015), conforme indicado na figura 11, que envolve as transições dos grupamentos do tipo C-O e carbonilas. As propriedades fotoluminescentes dos CQDs foram estudadas a partir dos espectros de emissões apresentados na figura 12.

Figura 12- os espectros de fluorescência dos CQDs em diferentes comprimentos de onda de excitação.



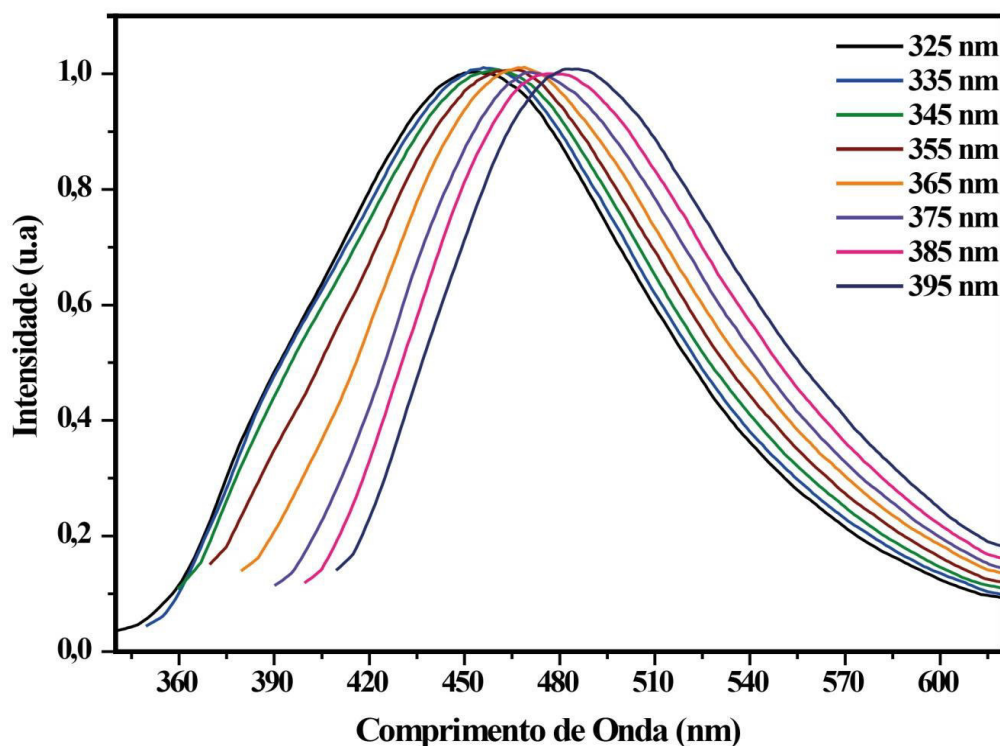
Fonte: Autor.

Uma diminuição na intensidade de fotoluminescência foi acompanhada à medida em que se variava o comprimento de onda de excitação para maiores comprimento de ondas. A maior intensidade de emissão foi observada no comprimento de 425nm, quando excitados no comprimento de 325nm.

A fluorescência dos CQDs é explicada pela presença de grupos funcionais em sua de superfície, causado as armadilhas ou defeitos. Essa característica possui como consequência a dependência de comprimento de onda de excitação. (Alam *et al.*,

2015; Eda *et al.*, 2010; Ko *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2010; Qu *et al.*, 2014; Roy *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014).

Figura 13- Espectro de Fluorescência de deslocamento de emissão dos CQDs.



Fonte: Autor.

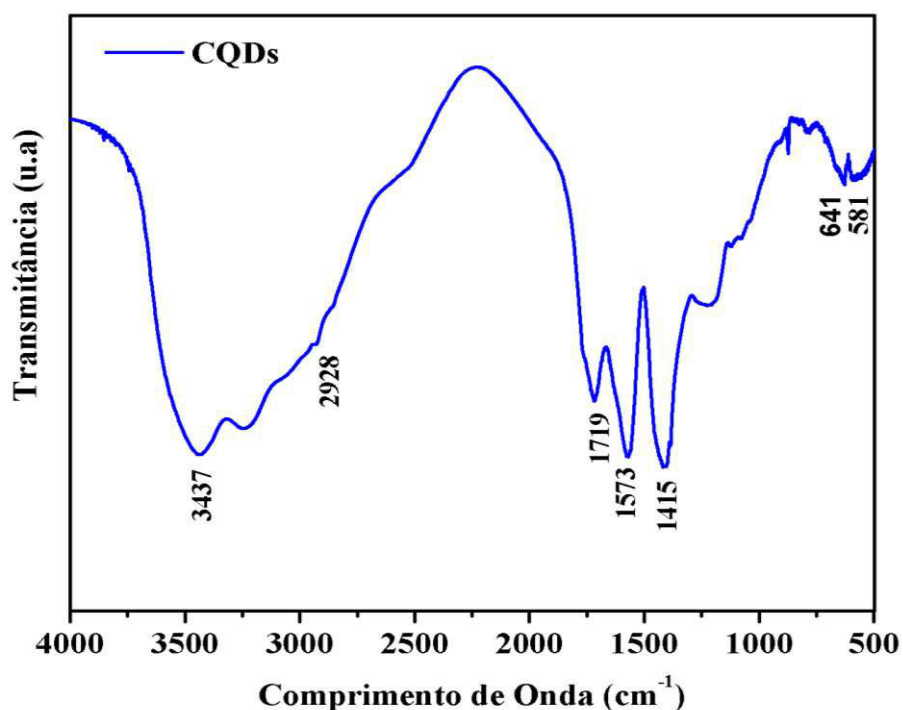
A figura 13 exibe o deslocamento dos máximos de fotoluminescência para maiores comprimentos de onda em função do comprimento de onda de excitação. Esse fato é explicado pelos grupos presentes na superfície dos CQDs, como exemplo, C-O, C=O e COOH. A variedade de grupos na superfície gera vários níveis de energia entre os orbitais HOMO e LUMO tornando a emissão dos CQDs dependente da energia de excitação.

4.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

4.2.1 Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho (FTIR)

A presença de grupos funcionais nos CQDs foi avaliada pelo FTIR. Informações importantes sobre os grupos funcionais presentes na nanopartícula foram obtidos pela identificação das principais vibrações características nos espectros registrados dos CQDs formados, como apresentado na Figura 14.

Figura 14- Espectro vibracional na região do Infravermelho (FTIR) dos CQDs.



Fonte: Autor.

A tabela apresenta as principais vibrações no espectro do FTIR. Foram identificadas uma banda em 3437 cm⁻¹ no espectro do AC, referente ao estiramento da ligação O-H, enquanto as bandas em 2928, 1415, 641 e 581 cm⁻¹ foram atribuídos

ao estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H. As bandas em 1719 e 1573 são atribuídas ao estiramento das ligações C=O (Huang *et al.*, 2015; Ogi *et al.*, 2014).

Tabela 1- Principais vibrações características dos grupos funcionais na superfície dos CDs no espectro FTIR.

Posição das bandas/ cm^{-1}	Vibração característica
3437	v O–H
2928	$\nu_{\text{ass}}\text{C–H}$
1719	v C=O
1573	v C=O
1415	$\nu_{\text{ass}}\text{C–H}$
641	$\nu_{\text{ass}}\text{C–H}$
581	$\nu_{\text{ass}}\text{C–H}$

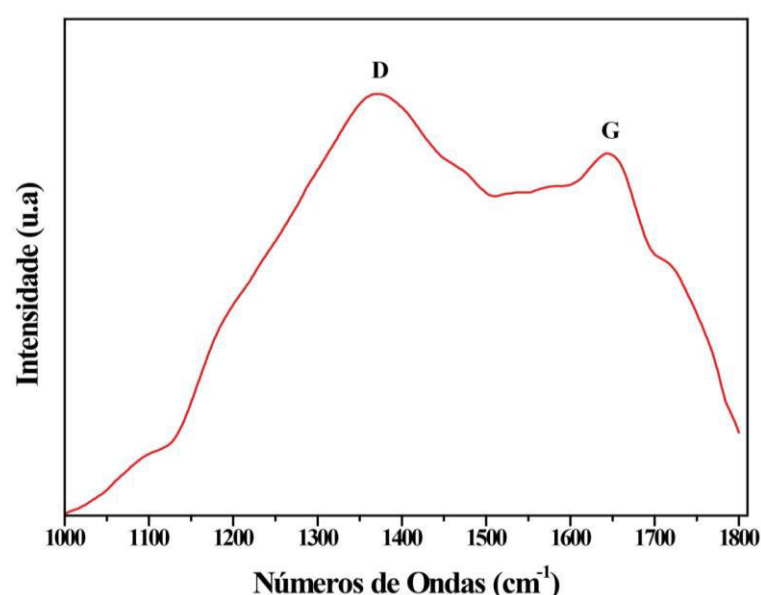
Fonte: Autor.

Estes resultados obtidos no espectro de FTIR sugerem que na superfície do CQDs estão presentes Hidroxila e carboxila, com isso, a dependência da fluorescência do CQDs com a presença de grupos funcionais diferentes, além disso, a presença desses grupamentos explica a hidrofiliabilidade e a estabilidade dos CQDs em meio aquoso (Gedda *et al.*, 2014; Lavkush Bhisare *et al.*, 2015).

4.2.2 Espectroscopia Ramam

A espectroscopia Raman fornece informações sobre níveis de energia vibracionais e sobre a estrutura através do espalhamento de luz. A figura 15 representa o espectro ramam do CQDs sintetizados.

Figura 15- Espectro ramam do CQDs.



Fonte: Autor.

O espectro foi registrado de 1000 a 1800 cm^{-1} , duas faixas largas distintas foram observadas em 1372 e 1646 cm^{-1} , o que corresponde às bandas D e G, respectivamente. A literatura relata que a banda-D (modo A_{1g}) surge principalmente de átomos de carbono sp^3 desordenados, enquanto que a banda G (modo E_{2g}) pode ser relacionada à vibração de átomos de carbono ligados a sp^2 em um hexagonal bidimensional (2D).

Além disso, a razão I_D/I_G pode ser usada para evidenciar características estruturais, uma vez que a intensidade da banda D pode ser associada à extensão dos defeitos nas nanopartículas. Para os CQDs sintetizados neste trabalho, a razão I_D/I_G foi de $\sim 1,06$. Este valor é ligeiramente superior a razão observada para o grafeno

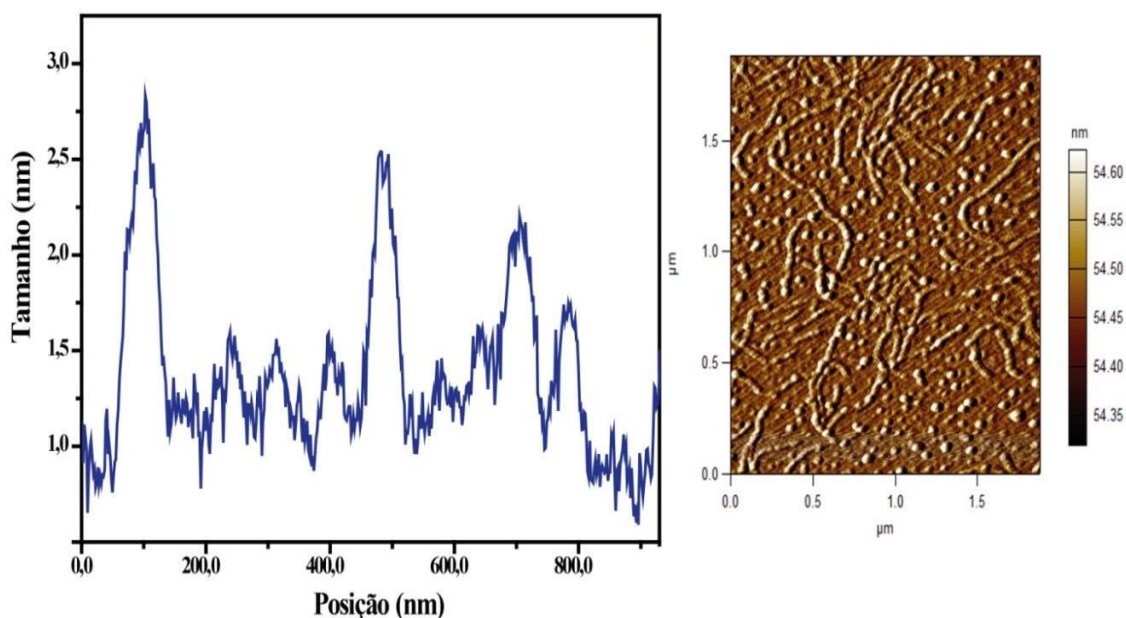
(~ 0.98) 55, que é a estrutura esperada para os CQDs sintetizados a partir da AC por termólise. (Fang, Xu e Zheng, 2016).

4.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

4.3.1 Microscopia de força atômica (AFM)

A imagem de AFM mostrou que os CQDs apresentam morfologia esférica com diâmetro entre 1,2 a 2,8nm (Figura 16) e dispersam uniformemente sobre a superfície de Mica.

Figura 16- (a) Imagens topográficas e de fase da amostra de CQDs. (b) Gráfico de tamanho dos CQDs medidos.



Fonte: Autor

No trabalho de *Anilkumar et al* (Anilkumar *et al.*, 2011), os CQDs produzidos eram monodispersos e morfologicamente esféricos, com dimensões médias de 3 nm. Com isso, os CQDs produzidos nesse trabalho possuem tamanhos e morfologia já relatados na literatura.

4.4 RECEPTORES À BASE DE ÍON METÁLICO:

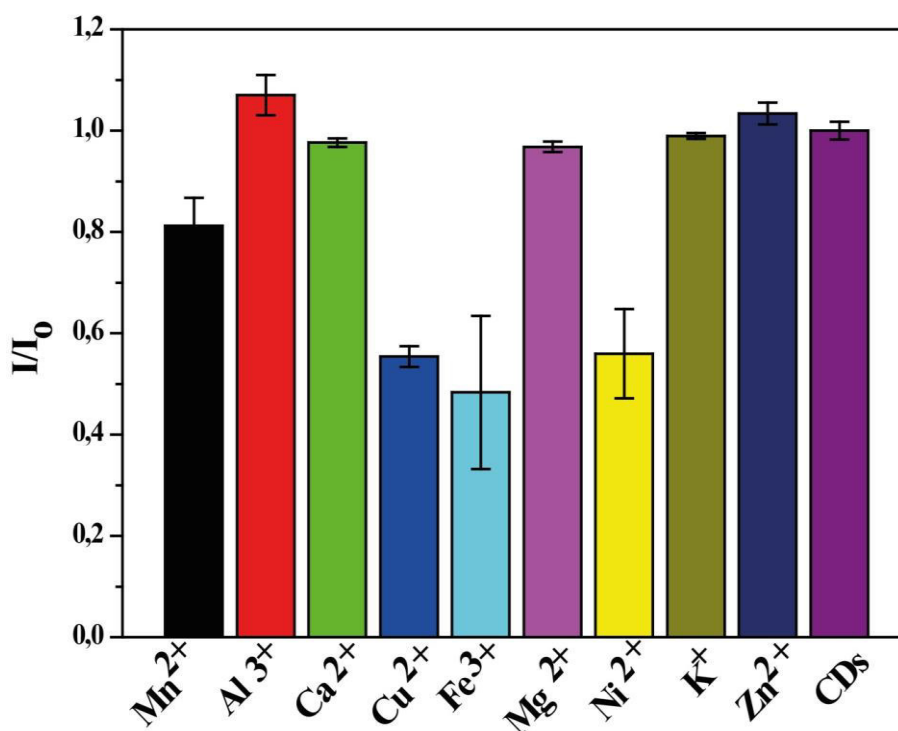
4.4.1 Escolha e otimização de proporções

Uma vez que os CQDs foram totalmente caracterizados, o próximo passo foi encontrar os receptores baseados no nariz para construir a metodologia de detecção. Para isso, hipotetizamos que os íons metálicos seriam capazes de produzir eventos de ligação distintos entre os CQDs e as proteínas analíticas.

Como é bem conhecido, as proteínas (Quintanar e Rivillas-Acevedo, 2013; Sharma e Agarwal, 2001) e os CQDs (Sun *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2014) podem interagir com os cátions metálicos. Além disso, os íons metálicos atuam como agentes para modificar as propriedades da superfície, permitindo-nos evitar a modificação superficial usual através de moléculas orgânicas.

Este processo pode ser caro e demorado, o que é indesejado. Portanto, os CQDs sintetizados foram primeiramente avaliados contra 50 μM de vários cátions metálicos (Al^{3+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} ou K^+). A figura 17 mostra os resultados da espectroscopia de fluorescência para cada teste.

Figura 17- Resposta de fluorescência dos CQD contra vários cátions metálicos a 50 μM . A intensidade de fluorescência foi investigada a 450 nm usando um comprimento de onda de excitação de 325 nm e normalizada usando I/I_0 , onde I_0 e I denotam a intensidade antes e depois da adição de íons metálicos, respectivamente. Cada valor médio e desvio padrão foram calculados com base em três repetições.



Fonte: Autor.

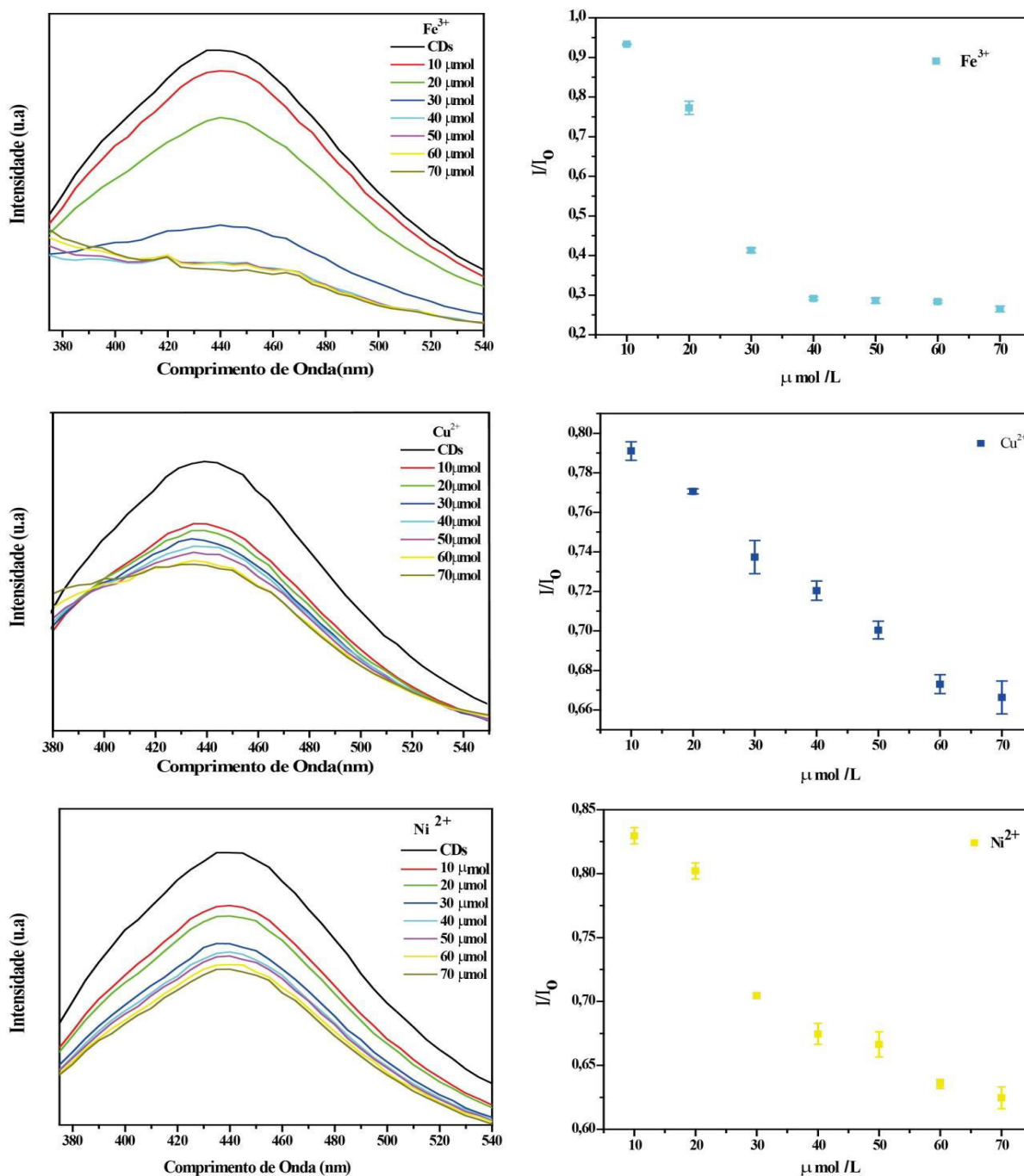
Neste caso, a resposta a ser avaliada foi a razão I/I_0 onde I_0 e I denotamos a intensidade de fluorescência adquirida a 450 nm antes e após a adição de cada cátion metálico, respectivamente. Os resultados apontaram para diferentes efeitos na intensidade de fluorescência dos CQDs. Para K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} , não foi observada supressão significativa (<5%). Por outro lado, os íons Fe^{3+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} apresentaram capacidade de suprimir, enquanto os íons Zn^{2+} e Al^{3+} foram capazes de aumentar a intensidade da fluorescência.

Estes resultados podem ser explicados pela presença de orbitais “d” vazios ou pela capacidade de determinado cátion metálico em eliminar defeitos superficiais.

Por exemplo, K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} não apresentam orbitais “ d ” preenchidos em sua distribuição eletrônica. Portanto, nenhum efeito significativo na intensidade de fluorescência foi observado. Claramente, este resultado indica a interação entre cátions metálicos e *CQDs* através de orbitais “ d ”. Uma vez que Fe^{3+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} foram capazes de suprimir fortemente a intensidade de fluorescência através da transferência eletrônica não-reativa do estado excitado dos *CQDs* sintetizados para os orbitais $3d$ vazios. Em contraste, o realce de fluorescência causado pelo Zn^{2+} e Al^{3+} pode ser atribuído à passivação da superfície do *CQDs* eliminando defeitos e confinando excitons, que melhoram a intensidade da fluorescência (Song *et al.*, 2014).

Em relação ao conceito de “nose-tongue”, os cátions metálicos escolhidos para compor os receptores foram Fe^{3+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} . Essa decisão foi tomada com base na eficiência de resfriamento observada para cada íon metálico. Conseqüentemente, a variação da resposta de fluorescência resultante do evento de ligação diferencial seria tão alta quanto possível. Além disso, as concentrações de Cu^{2+} , Ni^{2+} e Fe^{3+} a serem utilizadas foram investigadas através de curvas de titulação de fluorescência, que são exibidas na Fig. 18.

Figura 18- Titulação de fluorescência realizada à temperatura ambiente para íons metálicos Cu^{2+} , Ni^{2+} e Fe^{3+} . A intensidade de fluorescência foi investigada a 450 nm utilizando um comprimento de onda de excitação de 325 nm e normalizada usando I/I_0 , onde I_0 e I denotam a intensidade antes e depois da adição de íons metálicos, respectivamente. O destaque em cada gráfico denota a concentração escolhida para compor os conjuntos CQDs - Mn^{+} .

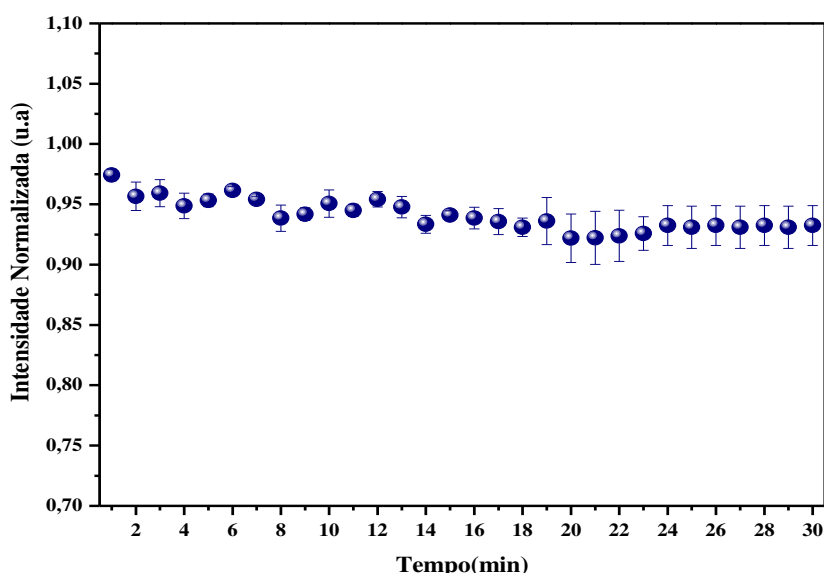


Fonte: Autor.

Nesse sentido, as concentrações mais apropriadas foram de 30, 30 e 20 μM , respectivamente. Para esclarecer essas escolhas, vale a pena mencionar que a intensidade de fluorescência dos *CQDs* pode diminuir ou aumentar dependendo da afinidade de ligação das proteínas alvo aos conjuntos *CQDs*- M^+ . Por exemplo, uma maior interação entre a proteína analítica e o cátion metálico pode levar a um aumento da intensidade de fluorescência. Já que os íons metálicos seriam removidos da superfície do *CQDs* evitando o chamado efeito de filtro interno (Dong, Wang, *et al.*, 2012). Por outro lado, a proteína analito também pode ter a capacidade de atenuar ainda mais a intensidade de fluorescência dos *CQDs*, como também demonstrado em nosso trabalho anterior (Freire *et al.*, 2018).

Dado o exposto, a concentração de cada cátion metálico foi escolhida com base em um valor de meia saturação da curva de titulação. O valor da intensidade de fluorescência ainda seria capaz de mudar (para baixo ou para cima) após a adição da proteína alvo. Além disso, o tempo para a interação entre os conjuntos *CQDs*- Mn^+ e as proteínas para atingir o equilíbrio também foi investigado. No entanto, este parâmetro não pode ser distinto para cada proteína analítica. Assim, realizamos os testes utilizando apenas BSA, devido sua alta concentração (70% p/p) no soro humano (De *et al.*, 2009), como é mostrado na Fig. 19.

Figura 19- Tempo de supressão interação conjunto *CQDs*- M^+ e BSA.



Fonte: Autor

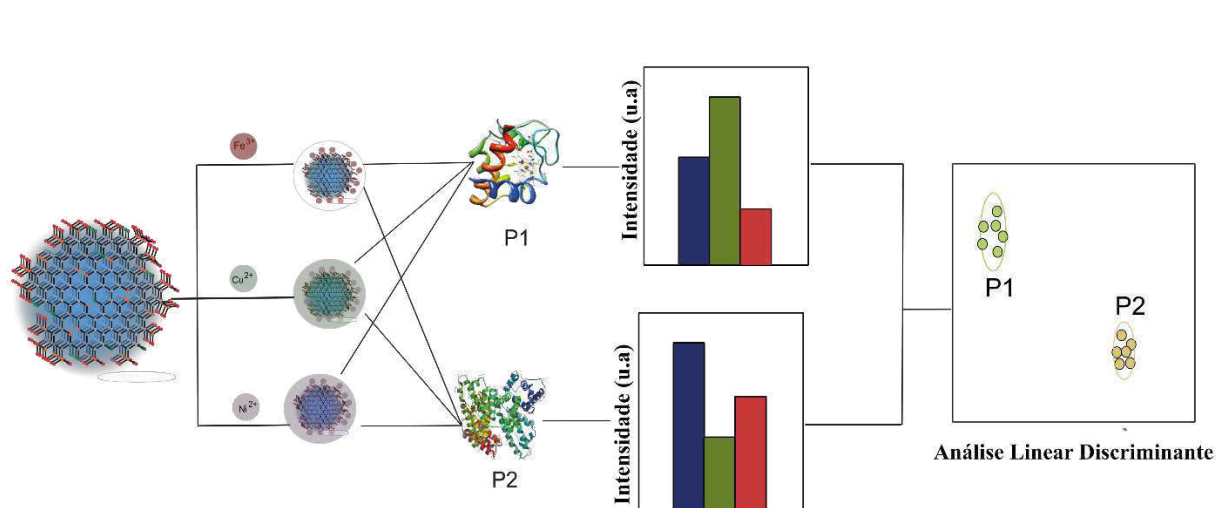
Claramente, não há mais variação na intensidade de fluorescência, como pode ser observada após 7 min. Portanto, após a adição da proteína alvo, 7 min deve ser o tempo de incubação ideal para realizar uma nova medição da intensidade de fluorescência.

De acordo com a literatura [69], o equilíbrio interacional entre CQDs e cátions metálicos é rapidamente alcançado. Considerando isso, foram realizados testes para investigar o tempo ótimo de incubação dos conjuntos CQDs- M^+ .

5. SELETIVIDADE DE PROTEÍNAS

Uma vez que todos os três CQDs - Mn^+ conjuntos foram construídos, a Fig. 20 exibe uma ilustração esquemática de nossa estratégia baseada em 'nose'.

Figura 20- Esquema do método nose/tongue.

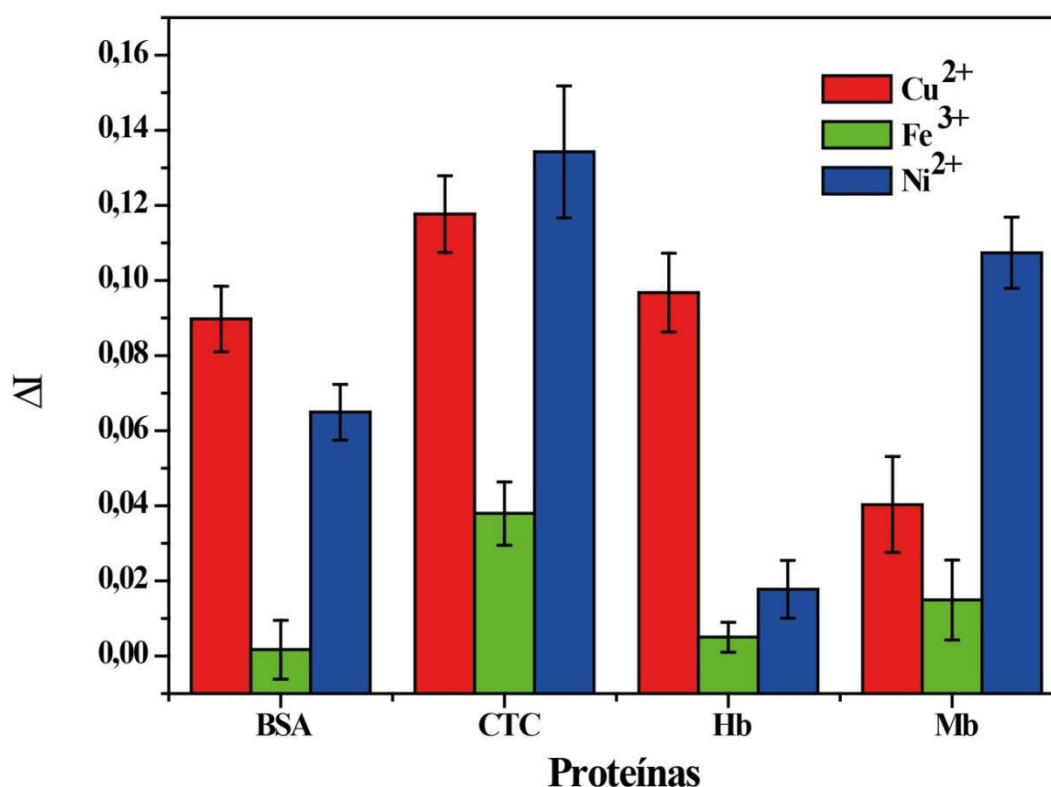


Fonte: Autor

Em primeiro lugar, os três receptores proporcionariam eventos de ligação distintos para uma determinada proteína alvo. Como resultado, um padrão único de resposta de fluorescência para cada proteína seria gerado. Isso nos permitiria executar a identificação analisando todo o conjunto de dados por meio do LDA. Para verificar o poder de diferenciação da nossa estratégia, os três conjuntos CQDs - M^+ foram testados contra 4 proteínas diferentes (Hb, Mb, CTC e BSA) a 50 nM.

Nesta etapa, o espectro de fluorescência na faixa de 350 - 650 nm foi adquirido usando excitação em 325 nm. Portanto, uma enorme matriz de treinamento (3 receptores baseados no nariz x 4 proteínas x 9 réplicas) foi criada. Com base nestes dados, a Fig. 21 apresenta os padrões de resposta de fluorescência (considerando a resposta de fluorescência a 450 nm) para cada proteína.

Figura 21- Padrões de resposta da fluorescência ($\Delta I = I/I_0$) das nanopartículas de CQDs com 3 íons metálicos (Bioreceptor-transdutor) em relação a quatro proteínas (todos em 50nM): BSA, Mb, Hb, Cit c.



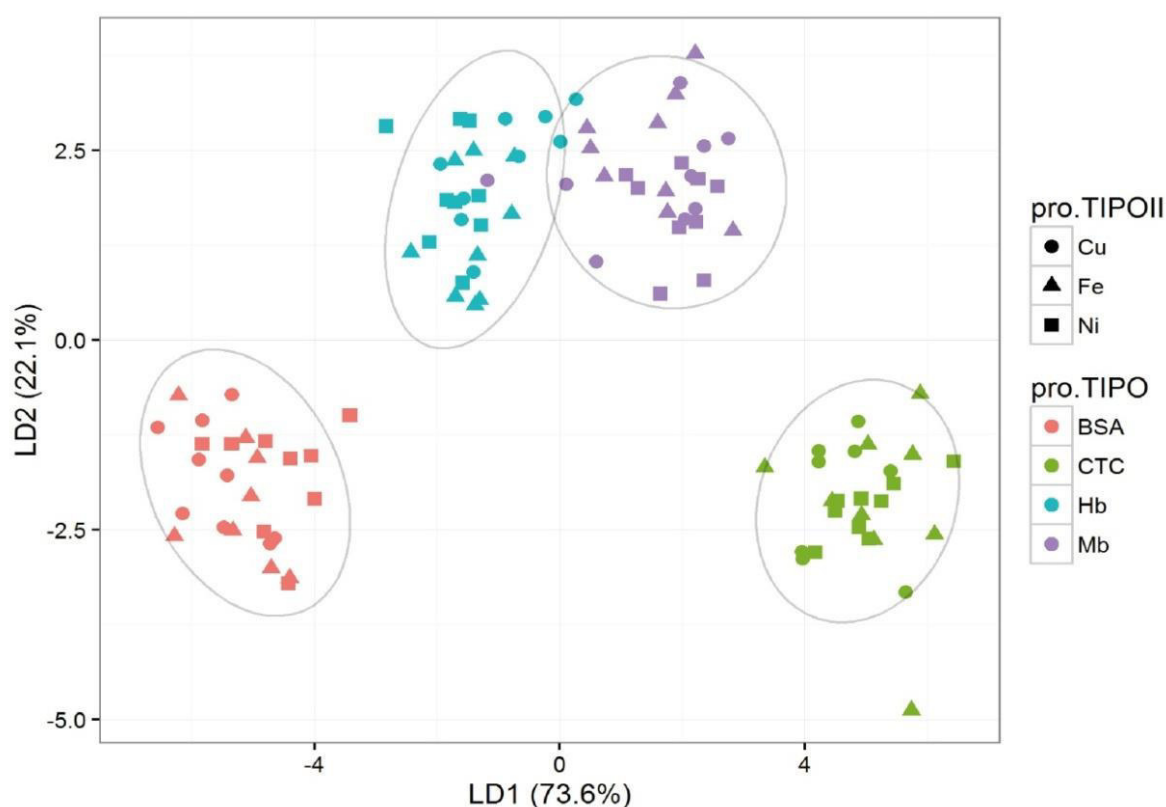
Fonte: Autor.

Claramente, padrões diferentes foram observados, o que evidencia a capacidade de nossa estratégia para identificar as 4 proteínas analíticas. No entanto, o tratamento estatístico da matriz de treinamento foi realizado com LDA através do projeto de software livre R.

Neste sentido, a resposta de fluorescência para o comprimento de onda de excitação foi primeiro analisada passo a passo para selecionar as variáveis mais

significativas em relação à diferenciação. Como resultado, 23 variáveis foram obtidas. Posteriormente, essas variáveis foram usadas para gerar dois fatores canônicos (73,6 e 22,1%) utilizados para construir o gráfico bidimensional do LDA (Fig. 21).

Figura 22- Padrões de resposta de fluorescência dos CQDs com cinco metais contra 4 proteínas (todos a 50nM): citocromo C (CTC), hemoglobina (Hb), albumina de soro bovino (BSA), e mioglobina (Mb).



Fonte: Autor

Como pode ser visto, os 36 casos foram agrupados em 4 grupos distintos. De acordo com a matriz de classificação, 100% de precisão foi obtida, o que demonstra a capacidade da nossa estratégia baseada em "nariz" para identificar as proteínas alvo. Além disso, a metodologia também foi capaz de discriminar entre proteínas metálicas e não metálicas. Uma vez que os grupos Hb, Mb e CTC foram bem separados do grupo BSA. Isso pode evidenciar a influência do sítio metálico das proteínas, que afetam a interação com os conjuntos CQDs – Mn⁺.

6. CONCLUSÃO

Os *CQDs* exibem espectros de fluorescência dependentes da excitação e possuem diâmetro uniforme (tamanho média 0,8-2,8nm). Os cátions metálicos Fe^{3+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} promoveram supressão significativa na intensidade de fluorescência perceptível em relação aos outros cátions metálicos (Al^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , K^+ e Fe^{3+}). Foi construído um conjunto de sensores de *CQDs-M⁺*, que poderiam ser utilizados para a identificação de proteínas. A principal vantagem do arranjo de sensor proposto é a simplicidade, devido à utilização de *CQDs* como elementos sensores, baseado nas interações entre proteínas e sistema nanopartículas-cátion metálico. Após as análises, diferentes padrões de resposta do sistema *CQDs-M⁺* de quatro proteínas a 50nM foram obtidos. Com base nos resultados foi possível determinar um padrão para identificação de proteínas através da técnica estatística de LDA. Neste sentido, o conjunto de receptores *CQDs- Fe³⁺*, *CQDs- Cu²⁺*, *CQDs- Ni²⁺* fornece uma plataforma extremamente poderosa para a análise de proteínas.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar das discussões sobre o tipo de supressão, será necessária a investigação do tipo de supressão no sistema CQDs- M^+ - P . Outro fator importante a ser investigado será o comportamento do nanosensor em identificar proteínas em sistemas biológicos, bem como avaliar o efeito da matrix biológica, na ausência de proteínas, alta salinidade, pH entre outros. Necessita-se analisar o rendimento quântico da amostra, como a construção de um dispositivo para aperfeiçoar a técnica.

REFERÊNCIAS

- ACHTUNG, I.; III, R. E. Carbon Dots Prepared by Hydrothermal Treatment of Dopamine as an Effective Fluorescent Sensing Platform for the Label-Free Detection of. *[s.l.]*.n. Iii, p. 7243–7249, 2013.
- ALAM, A.-M.; PARK, B.-Y.; GHOURI, Z. K.; PARK, M.; KIM, H.-Y. Synthesis of carbon quantum dots from cabbage with down- and up-conversion photoluminescence properties: excellent imaging agent for biomedical applications. *[s.l.]*. **Green Chem.**, p. 3791–3797, 2015.
- ANILKUMAR, P.; WANG, X.; CAO, L.; SAHU, S.; LIU, J.-H.; WANG, P.; KORCH, K.; TACKETT II, K. N.; PARENZAN, A.; SUN, Y.-P. Toward quantitatively fluorescent carbon-based “quantum” dots. *[s.l.]*. **Nanoscale**, v. 3, n. 5, p. 2023, 2011.
- BAG, N.; MATHUR, R.; HUSSAIN, F.; INDRACANTI, N.; SINGH, S.; SINGH, S.; CHAUHAN, R. P.; CHUTTANI, K.; MISHRA, A. K. Synthesis and in vivo toxicity assessment of CdSe : ZnS quantum dots functionalized with EDTA-Bis-. *[s.l.]*. p. 1416–1425, 2015.
- BAKER, S. N.; BAKER, G. A. Luminescent Carbon Nanodots: Emergent Nanolights. *[s.l.]*. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, n. 38, p. 6726–6744, 2010.
- CHATTERJEE, S.; KUMAR, G. S. Targeting the heme proteins hemoglobin and myoglobin by janus green blue and study of the dye–protein association by spectroscopy and calorimetry. *[s.l.]*. **RSC Adv.**, v. 4, n. 80, p. 42706–42715, 2014.
- DE, M.; RANA, S.; AKPINAR, H.; MIRANDA, O. R.; ARVIZO, R. R.; BUNZ, U. H. F.; ROTELLO, V. M. Sensing of proteins in human serum using conjugates of nanoparticles and green fluorescent protein. *[s.l.]*. **Nature Chemistry**, v. 1, n. 6, p. 461–465, 2009.
- DING, H.; CHENG, L.-W.; MA, Y.-Y.; KONG, J.-L.; XIONG, H.-M. Luminescent carbon quantum dots and their application in cell imaging. *[s.l.]*. **New Journal of Chemistry**, v. 37, n. 8, p. 2515–2520, 2013.
- DONG, Y.; SHAO, J.; CHEN, C.; LI, H.; WANG, R.; CHI, Y.; LIN, X.; CHEN, G. Blue luminescent graphene quantum dots and graphene oxide prepared by tuning the carbonization degree of citric acid. *[s.l.]*. **Carbon**, v. 50, n. 12, p. 4738–4743, 2012.
- DONG, Y.; WANG, R.; LI, G.; CHEN, C.; CHI, Y.; CHEN, G. Polyamine-Functionalized Carbon Quantum Dots as Fluorescent Probes for Selective and Sensitive Detection of Copper Ions. *[s.l.]*. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 14, p. 6220–6224, 2012.
- EDA, B. G.; LIN, Y.; MATTEVI, C.; YAMAGUCHI, H.; CHEN, H.; CHEN, I.; CHEN, C.; CHHOWALLA, M. Blue Photoluminescence from Chemically Derived Graphene Oxide. *[s.l.]*. p. 505–509, 2010.
- FANG, L.; XU, Q.; ZHENG, X. Soy flour-derived carbon dots : facile preparation , fluorescence enhancement , and sensitive Fe 3 + detection. *[s.l.]*. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 18, n. 8, p. 1–13, 2016.

- FREIRE, R. M.; LE, N. D. B.; JIANG, Z.; KIM, C. S.; ROTELLO, V. M.; FECHINE, P. B. A. NH₂-rich Carbon Quantum Dots: A protein-responsive probe for detection and identification. *[s.l.] Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 255, n. Part 3, p. 2725–2732, 2018.
- GEDDA, G.; PANDEY, S.; BHAIASARE, M. L.; WU, H.-F. Carbon dots as nanoantennas for anti-inflammatory drug analysis using surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in serum. *[s.l.] RSC Advances*, v. 4, n. 72, p. 38027, 2014.
- HU, S.; NIU, K.; SUN, J.; YANG, J.; ZHAO, N.; DU, X. One-step synthesis of fluorescent carbon nanoparticles by laser irradiation †. *[s.l.]* p. 484–488, 2009.
- HUANG, S.; WANG, L.; HUANG, C.; XIE, J.; SU, W.; SHENG, J.; XIAO, Q. A carbon dots based fluorescent probe for selective and sensitive detection of hemoglobin. *[s.l.] Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 221, p. 1215–1222, 2015.
- KO, H. Y.; CHANG, W.; PARAMASIVAM, G.; JEONG, M. S. In vivo imaging of tumour bearing near-infrared fluorescence-emitting carbon nanodots derived from tire soot †. *[s.l.]* p. 10290–10292, 2013.
- LAVKUSH BHAIASARE, M.; PANDEY, S.; SHAHNAWAZ KHAN, M.; TALIB, A.; WU, H.-F. Fluorophotometric determination of critical micelle concentration (CMC) of ionic and non-ionic surfactants with carbon dots via Stokes shift. *[s.l.] Talanta*, v. 132, p. 572–578, 2015.
- LI, L.-L.; JI, J.; FEI, R.; WANG, C.-Z.; LU, Q.; ZHANG, J.-R.; JIANG, L.-P.; ZHU, J.-J. A Facile Microwave Avenue to Electrochemiluminescent Two-Color Graphene Quantum Dots. *[s.l.] Advanced Functional Materials*, v. 22, n. 14, p. 2971–2979, 24 jul. 2012.
- LI, X.; WANG, H.; SHIMIZU, Y.; PYATENKO, A.; KAWAGUCHI, K.; KOSHIZAKI, N. Preparation of carbon quantum dots with tunable photoluminescence by rapid laser passivation in ordinary organic solvents. *[s.l.]* p. 932–934, 2011.
- LIM, S. Y.; SHEN, W.; GAO, Z. Carbon quantum dots and their applications. *[s.l.] Chemical Society reviews*, v. 44, n. 1, p. 362–381, 2014.
- _____. Carbon quantum dots and their applications. *[s.l.] Chemical Society Reviews*, v. 44, n. 1, p. 362–381, 2015.
- LINKS, D. A. ChemComm Highly luminescent carbon nanodots by microwave-assisted pyrolysis w. *[s.l.]* p. 7955–7957, 2012.
- LIU, R.; WU, D.; LIU, S.; KOYNOV, K.; KNOLL, W.; LI, Q. An aqueous route to multicolor photoluminescent carbon dots using silica spheres as carriers. *[s.l.] Angewandte Chemie - International Edition*, v. 48, n. 25, p. 4598–4601, 2009.
- LIU, Y. One-step microwave-assisted polyol synthesis of green luminescent carbon dots as optical nanoprobos. *[s.l.] Carbon*, v. 68, p. 258–264, 2013.
- MACHADO, C. E.; VIEIRA, K. O.; FERRARI, J. L.; SCHIAVON, M. A. Carbon Quantum Dots: Chemical Synthesis, Properties and Applications. *[s.l.] Revista Virtual de Química*, v. 7, n. 4, p. 1306–1346, 2015.
- OGI, T.; IWASAKI, H.; AISHIMA, K.; ISKANDAR, F.; WANG, W. RSC Advances Transient nature of graphene quantum dot formation via a hydrothermal reaction

†.[s.l.]. **RSC Advances**, v. 4, p. 55709–55715, 2014.

PAN, D.; ZHANG, J.; LI, Z.; WU, M. Hydrothermal route for cutting graphene sheets into blue-luminescent graphene quantum dots. [s.l.]. **Advanced Materials**, v. 22, n. 6, p. 734–738, 2010.

LIBARDI, Silvia Helena. **Atividade antioxidante da vanilina e do ácido vanílico e o efeito da complexação por proteínas do soro do leite na desativação de radicais e ferrilmioglobina em condições simulando o trato gastrointestinal**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010. doi:10.11606/D.75.2010.tde-06042011-104437. Acesso em: 16 de novembro de 2015.

PENG, H.; TRAVAS-SEJDIC, J. Simple Aqueous Solution Route to Luminescent Carbogenic Dots from Carbohydrates. [s.l.]. v. 19, n. 4, p. 5563–5565, 2009.

QU, D.; ZHENG, M.; ZHANG, L.; ZHAO, H.; XIE, Z.; JING, X.; HADDAD, R. E. Formation mechanism and optimization of highly luminescent N-doped graphene. [s.l.]. p. 1–11, 2014.

QUINTANAR, L.; RIVILLAS-ACEVEDO, L. Studying Metal Ion–Protein Interactions: Electronic Absorption, Circular Dichroism, and Electron Paramagnetic Resonance BT - Protein-Ligand Interactions: Methods and Applications. [s.l.]. In: WILLIAMS, M. A.; DAVITER, T. (Eds.). . Totowa, NJ: Humana Press, 2013. p. 267–297.

ROY, P.; CHEN, P.; PERIASAMY, A. P.; CHEN, Y.; CHANG, H. Photoluminescent carbon nanodots : synthesis , physicochemical properties and analytical applications. [s.l.]. **Biochemical Pharmacology**, v. 18, n. 8, p. 447–458, 2015.

SAHU, S.; BEHERA, B.; MAITI, T. K.; MOHAPATRA, S. Simple one-step synthesis of highly luminescent carbon dots from orange juice: application as excellent bio-imaging agents. [s.l.]. **Chemical Communications**, v. 48, n. 70, p. 8835, 2012.

SHARMA, S.; AGARWAL, G. P. Interactions of Proteins with Immobilized Metal Ions: A Comparative Analysis Using Various Isotherm Models. [s.l.]. **Analytical Biochemistry**, v. 288, n. 2, p. 126–140, 2001.

SHEN, L.; ZHANG, L.; CHEN, M.; CHEN, X.; WANG, J. The production of pH-sensitive photoluminescent carbon nanoparticles by the carbonization of polyethylenimine and their use for bioimaging. [s.l.]. **Carbon**, v. 55, p. 343–349, 2013.

SONG, Y.; ZHU, S.; XIANG, S.; ZHAO, X.; ZHANG, J.; ZHANG, H.; FU, Y.; YANG, B. Investigation into the fluorescence quenching behaviors and applications of carbon dots. [s.l.]. **Nanoscale**, v. 6, n. 9, p. 4676–82, 2014.

SUN, H.; GAO, N.; WU, L.; REN, J.; WEI, W.; QU, X. Highly Photoluminescent Amino-Functionalized Graphene Quantum Dots Used for Sensing Copper Ions. [s.l.]. **Chemistry – A European Journal**, v. 19, n. 40, p. 13362–13368, 2013.

SUN, X.; LEI, Y. Fluorescent carbon dots and their sensing applications. [s.l.]. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 89, p. 163–180, 2017.

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

TEAM, R. D. C. **R: A Language and Environment for Statistical Computing.** Vienna. [s.l.].

TOGNACCINI, L.; CIACCIO, C.; ORIA, V. D.; CERVELLI, M.; HOWES, B. D.; COLETTA, M.; MARIOTTINI, P.; SMULEVICH, G.; FIORUCCI, L. Structure – function relationships in human cytochrome c : The role of tyrosine 67. [s.l.]. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 155, p. 56–66, 2016.

WANG, L.; ZHU, S.; WANG, H.; QU, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; CHEN, Q.; AL, W. E. T. Common Origin of Green Luminescence in Carbon Nanodots and Graphene Quantum Dots. [s.l.]. n. 3, p. 2541–2547, 2014.

WANG, Q.; YANG, X.; YANG, X.; LIU, F.; WANG, K. Visual detection of myoglobin via G-quadruplex DNAzyme functionalized gold nanoparticles-based colorimetric biosensor. [s.l.]. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 212, p. 440–445, 2015.

WANG, S.; CHEN, Z.-G.; COLE, I.; LI, Q. Structural evolution of graphene quantum dots during thermal decomposition of citric acid and the corresponding photoluminescence. [s.l.]. **Carbon**, v. 82, p. 304–313, 2015.

XU, X.; RAY, R.; GU, Y.; PLOEHN, H. J.; GEARHEART, L.; RAKER, K.; SCRIVENS, W. A. Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments. [s.l.]. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 40, p. 12736–12737, 2004.

YAN, F.; ZOU, Y.; WANG, M.; MU, X.; YANG, N.; CHEN, L. Highly photoluminescent carbon dots-based fluorescent chemosensors for sensitive and selective detection of mercury ions and application of imaging in living cells. [s.l.]. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 192, p. 488–495, 2014.

ZHAI, Y.; ZHU, Z.; ZHU, C.; REN, J.; WANG, E.; DONG, S. Multifunctional water-soluble luminescent carbon dots for imaging and Hg²⁺ sensing. [s.l.]. **Journal of Materials Chemistry B: Materials for biology and medicine**, v. 2, n. 1, p. 6995–6999, 2014.

ZHANG, M. *et al.* Facile synthesis of water-soluble, highly fluorescent graphene quantum dots as a robust biological label for stem cells. [s.l.]. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 15, p. 7461, 2012.

ZHAO, A.; CHEN, Z.; ZHAO, C.; GAO, N.; REN, J.; QU, X. Recent advances in bioapplications of C-dots. [s.l.]. **Carbon**, v. 85, p. 309–327, abr. 2015.

ZHU, S. *et al.* Strongly green-photoluminescent graphene quantum dots for bioimaging applications. [s.l.]. **Chemical communications (Cambridge, England)**, v. 47, n. 24, p. 6858–6860, 2011.

ZONG, J.; ZHU, Y.; YANG, X.; SHEN, J.; LI, C. Synthesis of photoluminescent carbogenic dots using mesoporous silica spheres as nanoreactors w. [s.l.]. p. 764–766, 2011.