Priprava i modifikacija ugljikovih kvantnih točaka iz kore klementine

Šafranko, Silvija

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:133450

Rights / Prava: Attribution-ShareAlike 4.0 International/Imenovanje-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Silvija Šafranko, mag. chem.

PRIPRAVA I MODIFIKACIJA UGLJIKOVIH KVANTNIH TOČAKA IZ KORE KLEMENTINE: FIZIKALNO-KEMIJSKA KARAKTERIZACIJA I ISPITIVANJE FARMAKOLOŠKE AKTIVNOSTI DOBIVENIH NANOČESTICA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, veljača, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Poslijediplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija i nutricionizam
Smjer: Prehrambena tehnologija

Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za tehnološko projektiranje i farmaceutsko inženjerstvo
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska
UDK: 620.3(043.3)
543.9: 634.322(043.3)
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Znanstvena grana: Inženjerstvo
Tema rada je prihvaćena na V. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 28. veljače 2022.
Voditelj: *prof. dr. sc. Stela Jokić*
Suvoditelj: *prof. dr. sc. Ivica Strelec*

Priprava i modifikacija ugljikovih kvantnih točaka iz kore klementine: Fizikalno-kemijska karakterizacija i ispitivanje farmakološke aktivnosti dobivenih nanočestica

Silvija Šafranko, *0291002140*

Sažetak: U ovom doktorskom radu provedena je priprava i karakterizacija ugljikovih kvantnih točaka (CQD) dobivenih iz kore klementine te je ispitana njihova primjenjivost u biomedicinske i analitičke svrhe. Modelni sustav predstavljaju nanočestice CQD dobivene iz limunske kiseline hidrotermalnom sintezom uz dodatak različitih aminokiselina (Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Phe, Ser i Trp) kao *N*-dopanti. Rezultati su pokazali da nanočestice dobivene uporabom limunske kiseline i aminokiselina Ala, Arg, His, Leu, Lys i Trp iskazuju izvrsna fizikalno-kemijska svojstva u rasponu kvantnih prinosa od 12,97 % do 36,43 % pri ispitanom pH = 7, dok je u odnosu na sustav bez dodatka aminokiselina (CQD_{CA}) dobiven vrlo nizak kvantni prinos od 2,02 %. Na temelju rezultata modelnog sustava, navedene aminokiseline ispitane su u sintezi CQD iz biomase (kore klementine). Istraživanjem je pokazano da kemijski profil različitih prirodnih komponenti koje se nalaze u kori klementine utječu na optička, fizikalna i kemijska svojstva nanočestica, ali i na biološku aktivnost, koju nanočestice dobivene iz limunske kiseline nisu iskazivale. Kako bi se povećao kvantni prinos uzoraka dobivenih iz kore klementine, dodatak manje količine limunske kiseline rezultirao je poboljšanjem i u kvantnom prinosu, ali i u potencijalnoj primjenjivosti čestica s izvrsnom biološkom i farmakološkom aktivnošću (hibridni uzorak $CQD_{CA+KK+Leu}$). Primjenom metode odzivnih površina provedena je optimizacija procesa priprave $CQD_{CA+KK+Leu}$ uzorka te je ispitan utjecaj pojedinih parametara (temperatura i vrijeme) na odziv kvantnog prinosa. U konačnici, tri uzorka s najboljim svojstvima iz svake serije sinteze ispitana su na kemijska (stupanj disperzivnosti), fizikalna (AFM, FTIR, PXRD) i optička svojstva (spektrofluorimetrija, UV-Vis spektroskopija) te na biološku i farmakološku aktivnost. Ispitivanje biološke aktivnosti nanočestica provedeno je spektrofotometrijskim metodama za određivanje antiradikalne aktivnosti (DPPH metoda), inhibicije denaturacije proteina, dok je ispitana i biokompatibilnost/citotoksičnost nanočestica na tumorske stanične linije (HeLa, NCI-H385, CaCo-2 i D54). Dobiveni uzorci CQD_{CA+Leu} i $CQD_{CA+KK+Leu}$ pokazali su visoki afinitet prema Fe^{3+} ionima te su razvijeni modeli za detekciju Fe^{3+} iona metodom spektrofluorimetrije. Rezultatima je pokazano da su razvijeni modeli pogodni za ispitivanja detekcije Fe^{3+} iona i na realnim uzorcima bunarske vode.

Ključne riječi: *ugljikove kvantne točke, kore klementine, nanočestice, detekcija Fe^{3+} iona, biološka aktivnost*

Rad sadrži: 124 stranice
39 slika
24 tablice
225 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	Prof. dr. sc. *Lidija Jakobek Barron*	predsjednik
2.	Izv. prof. dr. sc. *Maja Molnar*	član
3.	Izv. prof. dr. sc. *Martina Medvidović-Kosanović*	član
4.	Doc. dr. sc. *Ivana Tomac*	zamjena člana

Datum obrane: 9. veljače 2023.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Rektoratu sveučilišta u Osijeku, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu te samo u elektroničkom obliku u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DOCTORAL THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Postgraduate University Study-Food Technology and Nutrition

Department of Process Engineering
Subdepartment of Process Design and Pharmaceutical Engineering
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia
UDC: 620.3(043.3)
543.9: 634.322(043.3)
Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Scientific branch: Engineering
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. V held on February 28, 2022.
Mentor: *Stela Jokić, PhD, full prof.*
Co-Mentor *Ivica Strelec, PhD, full prof.*

The Preparation and Modification of Carbon Quantum Dots from *Citrus clementina*: Physico-chemical Characterization and Pharmacological Activity Investigation of the Obtained Nanoparticles

Silvija Šafranko, 0291002140

Summary: In this study, the preparation, charaterization and investigation of the potential application of carbon quantum dots (CQD) derived from *Citrus clementina* peel was investigated. The prepared nanoparticles from citric acid and amino acids of different complexity (Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Phe, Ser i Trp) by hydrothermal synthesis represented a model system. The prepared nanoparticles obtained from citric acid and amino acids Ala, Arg, His, Leu, Lys, and Trp demonstrated great physicochemical properties with calculated quantum yield from 12.97% to 36.43% under investigated pH=7. The sample obtained without the addition of amino acids, referred as CQD_{CA} sample, exhibited low quantum yield of 2.02%. Hence, these amino acids were further used for the fabrication of biomass-derived CQD from *Citrus clementina* peel. The study has demonstrated that chemical profile has effects on the optical, physical and chemical properties of nanoparticles, as well as on the biological activities, compared to the model systems derived from citric acid. In order to improve quantum yield of biomass-derived CQD, small amounts of citric acid were added to the reaction mixture for the $CQD_{CA+KK+Leu}$ preparation which led to the higher quantum yield, but also has broaden applicability of nanoparticles due to the outstanding biological and pharmacological properties. By applying response surface methodology, process optimization for $CQD_{CA+KK+Leu}$ was performed and the influence of individual parameter (temperature and time) on the response of quantum yield was also investigated. Furthermore, overall three best-performing samples for each series of synthesis were studied in details regarding chemical (solubility), physical (AFM, FTIR, PXRD), optical (spectrofluorimetry, UV-Vis spectroscopy), biological and pharmacological properties. Biological activities of prepared samples were investigated by spectrophotometric methods of antiradical activity (DPPH method), inhibition of protein denaturation, and biocompatibility/cytotoxicity was investigated on tumor cell lines (HeLa, NCI-H385, CaCo-2, D54). Finally, by investigating the selectivity of samples on different metal ions, CQD_{CA+Leu} and $CQD_{CA+KK+Leu}$ samples have shown high affinity toward Fe^{3+} ions and models were developed for Fe^{3+} ion sensing. Developed models were tested for the Fe^{3+} ion detection in real well-water samples.

Key words: *carbon quantum dots, citrus peel, nanoparticles, Fe^{3+} sensing, biological activity*

Thesis contains: 124 pages
39 figures
24 tables
225 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. *Lidija Jakobek Barron,* PhD, full prof. — chair person
2. *Maja Molnar,* PhD, associate prof. — member
3. *Martina Medvidović-Kosanović,* PhD, associate prof. — member
4. *Ivana Tomac,* PhD, assistant prof. — stand-in

Defense date: February 9th, 2023.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek; President's office, University Library in Zagreb and only in electronic version in University Library in Osijek.

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Steli Jokić na vodstvu, podršci, razumijevanju, svim savjetima i usmjeravanjima tijekom izrade doktorske disertacije. Hvala Vam na prilici i što ste uvijek podržali moje „lude“ ideje. Veliko hvala komentoru prof. dr. sc. Ivici Strelecu koji me mnogo puta svojim savjetima vratio na pravi put kada je manjkalo rješenja.

Cijenjenim članovima Povjerenstva iskreno zahvaljujem na konstruktivnim komentarima koji su uvelike unaprijedili kvalitetu ove disertacije.

Neizmjerno sam zahvalna svim profesorima, asistentima i suradnicima s Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku koji su uvijek spremni priskočiti u pomoć. Kolegama i prijateljima s Odjela za kemiju u Osijeku (posebice doc. dr. sc. Anamariji Stanković, dr. sc. Jeleni Kojčinović, Pavi, Daliboru i Dominiku) od srca zahvaljujem što su uskočili kad je najviše „gorjelo“. Dijelu ove doktorske disertacije mogu zahvaliti i suradnicima s Instituta Ruđer Bošković, Instituta za fiziku u Zagrebu, Medicinskom fakultetu u Osijeku, Kemijsko-tehnološkom fakultetu u Splitu, Daegu Gyeongbuk Institute of Science and Technology u Južnoj Koreji, University of Bordeaux u Francuskoj te Institute of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy u Pečuhu.

Hvala i doc. dr. sc. Aleksandaru Széchenyi na vrijednim savjetima i usmjeravanjima oko strukturne analize. Zahvaljujem doc. dr. sc. Krunoslavu Aladiću na uvijek rado ustupljenim stručnim savjetima i pomoći oko prikupljanja uzoraka. Srdačno zahvaljujem i prof. dr. sc. Mireli Kopjar na ustupljenom FTIR-ATR instrumentu za potrebe analize uzoraka. Posebno hvala upućujem prof. dr. sc. Ljubici Glavaš-Obrovac i doc. dr. sc. Marijani Leventić s Medicinskog fakulteta Osijek na pomoći „u zadnji tren“ i na usmjeravanju u interpretaciji rezultata.

Hvala mojim dragim kolegicama i prijateljicama s PTF-a koje su, iako smo se razbježale na sve strane, i dalje bile tu i pružile mi neizmjernu podršku. Posebno hvala mojim najbližim legicama i našim dr. sc. Ana-Mariji Cikoš i doc. dr. sc. Mariji Banožić. Mojoj dragoj Antoniji i Žani veliko hvala što su od prvoga dana bile tu kao neizostavna moralna i prijateljska podrška.

Ponajviše hvala mojoj dragoj obitelji koja je uvijek bila tu, pružila mi pomoć, razumijevanje i podršku u svakom obliku, motivirala me i inspirirala da ne odustajem. Hvala i mom Dini na ogromnoj podršci, razumijevanju i strpljenju.



Ovaj doktorski rad izrađen je na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku sredstvima Hrvatske zaklade za znanost kroz „Projekt razvoja karijera mladih istraživača: izobrazba novih doktora znanosti (ESF DOK-2018-01) u sklopu Uspostavnog istraživačkog projekta „Primjena inovativnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz nusproizvoda biljnoga podrijetla“ (UIP-2017-05-9909).

Sadržaj

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 4
2.1. UGLJIKOVI NANOMATERIJALI 5
2.2. UGLJIKOVE KVANTNE TOČKE 5
2.2.1. Sintetski pristupi za dobivanje CQD 7
2.2.1.1. „*Top-down*“ pristup 8
2.2.1.2. „*Bottom-up*“ pristup 8
2.3. KARAKTERIZACIJA NANOMATERIJALA CQD 9
2.3.1. Kemijska i strukturna svojstva CQD 10
2.3.2. Optička svojstva CQD 12
2.3.2.1. Mehanizmi djelovanja fotoluminescencije 12
2.3.2.2. Metode karakterizacije za određivanje optičkih svojstava CQD 13
2.4. ODABIR PREKURSORA I DOPANTA U PRIPRAVI CQD 14
2.4.1. Biomasa kao prekursor ugljika u tehnologiji CQD 15
2.4.2. Kora citrusa kao prekursor ugljika u sintezi CQD 17
2.4.3. Aminokiseline kao N-dopanti u tehnologiji CQD 18
2.5. ZNAČAJ I PRIMJENA CQD 19
2.5.1. Biološka aktivnost CQD 19
2.5.2. Farmakološka aktivnost i primjena CQD u teranostici 20
2.5.3. Primjena CQD u detekciji metalnih iona 21
2.6. OPTIMIRANJE PROCESA U TEHNOLOGIJI CQD 23
3. EKSPERIMENTALNI DIO 26
3.1. ZADATAK 27
3.2. MATERIJALI 28
3.2.1. Popis kemikalija i materijala 28
3.2.2. Biljni materijal – kora klementine 29
3.3. METODE 30
3.3.1. Sintetski postupak i pročišćavanje modelnih CQD 30
3.3.2. Sintetski postupak i pročišćavanje dobivenih CQD na bazi kore klementine 30
3.3.3. Kvalitativno i kvantitativno određivanje komponenti u kori klementine tehnikom UHPLC-ESI-HRMS 31
3.3.4. Sinteza hibridnog uzorka i optimiranje procesa RSM metodom 32
3.3.5. Spektrofotometrijske i spektrofluorimetrijske metode 33

3.3.5.1. Optička karakterizacija sintetiziranih uzoraka CQD 33
3.3.6. Fizikalno-kemijska karakterizacija dobivenih uzoraka CQD 35
3.3.6.1. Određivanje kemijskog sastava EDS metodom 35
3.3.6.3. Mjerenje zeta potencijala 35
3.3.7. Strukturna i morfološka karakterizacija CQD 36
3.3.7.1. Karakterizacija uzoraka CQD AFM metodom 36
3.3.7.2. Karakterizacija uzoraka CQD HR-TEM metodom 36
3.3.7.3. Karakterizacija uzoraka CQD PXRD metodom 36
3.3.7.4. Karakterizacija uzoraka CQD FTIR-ATR metodom 37
3.3.8. Ispitivanje biološke i farmakološke aktivnosti uzoraka 37
3.3.8.1. Određivanje antiradikalne aktivnosti 37
3.3.8.2. Ispitivanje biokompatibilnosti/citotoksičnosti CQD uzoraka 38
3.3.8.3. Analiza inhibicije denaturacije proteina 38
3.3.9. Primjena CQD u detekciji metalnih iona 39
3.3.9.1. Ispitivanje CQD na selektivnost metalnih iona 39
3.3.9.2. Razvoj modela za detekciju Fe^{3+} iona u modelnim sustavima 40
3.3.9.3. Primjena nanoprobe CQD za detekciju Fe^{3+} iona u sustavu bunarske vode 40
3.3.10. Statistička analiza i obrada podataka 41
4. REZULTATI I RASPRAVA 42
4.1. Karakterizacija modelnih CQD uzoraka 43
4.2. Ispitivanje selektivnosti modelnih CQD na metalne ione 55
4.3. Pročišćavanje i karakterizacija CQD uzoraka na bazi kore klementine 57
4.4. Ispitivanje selektivnosti CQD_{KK} na metalne ione 68
4.5. Ispitivanje antiradikalne aktivnosti sintetiziranih CQD – biološka aktivnost 70
4.6. Priprema i karakterizacija hibridnog uzorka – optimiranje procesa 73
4.6.1. Karakterizacija optimalnog hibridnog uzorka 79
4.7. Fizikalno-kemijska i optička karakterizacija odabranih uzoraka CQD 81
4.8. Primjena pripravljenih uzoraka CQD_{CA+Leu}, CQD_{KK+Arg} i $CQD_{CA+KK+Leu}$ 92
4.8.1. Ispitivanje farmakološke aktivnosti uzoraka 92
4.8.2. Ispitivanje primjene uzoraka na detekciju Fe^{3+} iona u modelnim i realnim uzorcima 97
5. ZAKLJUČCI 104
6. LITERATURA 107

Popis oznaka, kratica i simbola

0D	Nuldimenzionalni
1D	Jednodimenzionalni
2D	Dvodimenzionalni
3D	Trodimenzionalni
AFM	Mikroskopija atomskih sila (engl. *Atomic Force Microscopy*)
ANOVA	Analiza varijance (engl. *Analysis of Variance*)
BDE	Energija disocijacije veze (engl. *Bond Dissociation Energy*)
CA	Limunska kiselina (engl. *Citric Acid*)
CCD	Centralno kompozitni plan pokusa (engl. *Central composite design*)
CCF	Plošno centralno kompozitni plan pokusa (engl. *Face-Centered Composite Design*)
CHFS	Hidrotermalna sinteza s kontinuiranim protokom superkritične vode (engl. *Continuous Hydrothermal Flow Synthesis*)
CNTs	Ugljikove nanocijevčice (engl. *Carbon Nanotubes*)
CQD	Ugljikove kvantne točke (engl. *Carbon Quantum Dots*)
CTP-11	Irinotekan (engl. *Irinotecan*)
D	Ukupna željena funkcija (engl. *Desirability Function*)
DAD	Detektor niza dioda (engl. *Diode-array Detector*)
df	Stupnjevi slobode (engl. *Degrees of Freedom*)
DMF	Dimetilformamid (engl. *Dimethylformamide*)
DMSO	Dimetil sulfoksid (engl. *Dimethyl Sulfoxide*)
DOE	Dizajniranje eksperimenata (engl. *Design of Experiments*)
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (engl. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*)
EC_{50}	50 % maksimalne učinkovite koncentracije (engl. *Half Maximal Effective Concentration*)
EDS	Energetski disperzivna rendgenska spektroskopija (engl. *Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy*)
FL	Fotoluminescencija (engl. *Photoluminescence*)
FTIR	Infracrvena spektroskopija s Furierovom transformacijom (engl. *Fourier-transform Infrared Spectroscopy*)
HAT	Prijenos vodikovog atoma (engl. *Hydrogen Atom Transfer*)
HCl	Klorovodična kiselina
HOMO	Najviša popunjena molekularna orbitala (engl. *Highest Occupied Molecular Orbital*)

HPLC	Visoko djelotvorna tekućinska kromatografija (engl. *High Performance Liquid Chromatography*)
HR-TEM	Transmisijska elektronska mikroskopija visoke rezolucije (engl. *High Resolution - Transmission Electron Microscopy*; HR-TEM)
KK	Kora klementine
LED	Svjetleća dioda (engl. *Light-Emitting Diode*)
LPEI	Linearni polietilenimin (engl. *Linear Polyethyleneimine*)
LUMO	Najniža nepopunjena molekularna orbitala (engl. *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*)
MWCO	Granična molekulska masa (engl. *Molecular Weight Cut-off*)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin bromid (engl. *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*)
NaCl	Natrijev klorid
NaOH	Natrijev hidroksid
NIR	Blisko infracrveno područje (engl. *Near Infrared*)
NSAID	Nesteroidni protuupalni lijekovi (engl. *Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs*)
PBS	Fosfatni pufer s dodatkom soli (engl. *Phosphate Buffered Saline*)
PXRD	Rendgenska difrakcija na prahu (engl. *Powder X-ray Diffraction*)
QY	Kvantni prinos (engl. *Quantum Yield*)
R^2	Koeficijent determinacije (engl. *Predicted* R^2)
ROS	Reaktivne vrste kisika (engl. *Reactive Oxygen Species*)
RSD	Relativna standardna devijacija (engl. *Relative Standard Deviation*)
RSM	Metoda odzivnih površina (engl. *Response Surface Methodology*)
SWE	Ekstrakcija subkritičnom vodom (engl. *Subcritical Water Extraction*)
SN-38	7-etil-10-hidroksi-kamptotecin
UHPLC-ESI-HRMS	Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti u sprezi masene spektrometrije visoke djelotvornosti s elektrosprej ionizacijom (engl. *Ultrahigh Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry*)
UV/VIS	Ultraljubičasto/Vidljivo (engl. *Ultraviolet-visible)*

1. UVOD

Suvremena znanost i općenito industrija u stalnoj su potrazi za efikasnim, jeftinim i brzim rješenjima, a ogroman izazov predstavljaju ekonomski i ekološki aspekti u razvoju novih tehnologija i proizvodnji materijala. Danas su ugljikovi nanomaterijali preuzeli važnu ulogu u znanosti i industriji materijala zbog svojih jedinstvenih električnih, mehaničkih i optičkih svojstava koji se upravo zbog raznovrsnosti karakteristika mogu pronaći u širokom spektru primjene (Dimos 2016; Ai i sur., 2021; Kumar i sur., 2022). Postoje različite klasifikacije ugljikovih nanomaterijala s obzirom na njihove fizikalno-kemijske karakteristike, dok se najčešća klasifikacija pronalazi obzirom na strukturnu dimenzionalnost (Han i sur., 2016). Ugljikove kvantne točke (engl. *Carbon Quantum Dots* – CQD) pripadaju relativno novoj i inovativnoj skupini ugljikovih fotoluminescentnih nanomaterijala koji se odlikuju izvrsnom biokompatibilnošću, kemijskom i foto-stabilnošću te specifičnim strukturnim i fizikalnim karakteristikama (Javed i O'Carroll 2021a; Ai i sur., 2021; Wu i sur., 2022; Kumar i sur., 2022). Upravo je ovaj široki raspon svojstava nanočestica izazvao znatan interes i odjek znanstvene zajednice za ovom skupinom nanomaterijala u područjima kemije materijala i nanotehnologije, analitičke kemije, medicinske kemije i farmacije. Kao jednu od najvećih prednosti priprave CQD prestavlja mogućnost varijacija u svojstvima nanočestica, odnosno promjene u fotoluminescentnim svojstvima koje je moguće ostvariti promjenama u veličini nanočestica, načinu sinteze čestica ili pak promjenama u strukturnim karakteristikama dodavanjem heteroatoma ili funkcijskih skupina na površinu čestica (Dimos 2016). Proces funkcionalizacije površine CQD dovodi do promjena u optičkim svojstvima i širem rasponu primjene nanočestica, posebice u područjima farmacije i biomedicine. Naime, poznato je da se na površini CQD čestica, uz prisutnost velikog broja karboksilnih, karbonilnih i hidroksilnih skupina, mogu pronaći i amino skupine koje dokazano omogućuju interakcije s biološkim molekulama i materijalima te poboljšavaju kvantni prinos (engl. *Quantum Yield*; QY) (Khairol Anuar i sur., 2021). Štoviše, QY je važan parametar u karakterizaciji optičkih svojstava CQD koji u konačnici određuje njihovu primjenu u staničnom oslikavanju i osjetljivosti detekcije pojedinih kemijskih vrsta (Lv i sur., 2020). Iako se u tehnologiji CQD naglašava njihova biokompatibilnost i niska toksičnost, među prvim kvantnim točkama proizvedene su kvantne točke anorganske prirode na bazi teških metala poput kadmija (Cd^{2+}) ili cinka (Zn^{2+}) čija je primjenjivost u biološkim sustavima upitna (Li i sur., 2013; Li i sur., 2019). Stoga ne čudi stalno nastojanje znanstvenika da se otkrije pogodni sintetski put k dobivanju CQD usporedivih svojstava s poboljšanjima u biokompatibilnosti. Jedno od rješenja je zasigurno uvođenje netoksičnih ugljikovih spojeva (poput organskih kiselina) kao prekursora ugljika u CQD, a daljnji korak k poboljšavanju svojstava je uporaba biomase kao prekursora ugljika. Uporaba biomase kao prekursora ugljika u tehnologiji CQD pokazala se kao izvrsna alternativa toksičnim i ekološki neprihvatljivim kemikalijama s mogućnošću iskorištenja nusproizvoda različitih industrija. Također, zanimljivo je da upravo ovako dobivene CQD mogu pokazivati i

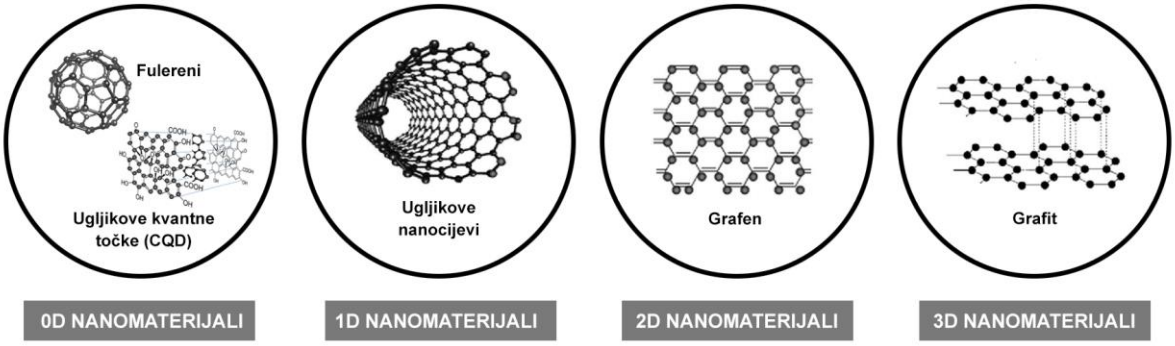
određenu biološku i/ili famakološku aktivnost koja može biti rezultat prisutnosti dodatnih funkcijskih skupina podrijetlom iz biomase (Sachdev i Gopinath 2015; Dong i sur., 2020; Ezati i sur., 2022). Međutim, ukoliko uzorak biomase nije obogaćen heteroatomima poput dušika i sumpora, davat će relativno nizak QY te će za njegovu uporabu biti potrebna naknadna modifikacija i funkcionalizacija površine CQD (Liang i sur., 2014). Upravo postupak funkcionalizacije površine CQD ima presudnu ulogu u poboljšanju optičkih karakteristika, topljivosti u različitom mediju, utječući indirektno na njihovu primjenjivost (Dimos 2016).

Cilj ove doktorske disertacije usmjeren je na pripremu novih CQD nanomaterijala koji iskazuju biološku i farmakološku aktivnost te na razvoj inovativnog senzorskog materijala za detekciju različitih metalnih iona. Kao modelni sustav korištena je limunska kiselina kao prekursor ugljika i aminokiseline različite kemijske kompleksnosti kao dopanti dušika. Takve CQD su sintetizirane kako bi se mogle odabrati aminokiseline za dobivanje biokompatibilnih i biološki aktivnih CQD iz kore klementine. U konačnici, kako bi se povećavala osjetljivost CQD u detekciji Fe^{3+} iona, pripremljen je hibridini uzorak CQD kombinacijom kore klementine, limunske kiseline i aminokiseline leucin. Dobiveni CQD analizirani su na strukturna i kemijska svojstva te na potencijalnu biološku i farmakološku aktivnost. Nadalje, čestice su testirane na biokompatibilnost na tumorske stanice, čak i pri visokim koncentracijama od 200 μg/mL. Provedeno je testiranje antiradikalne aktivnosti uzoraka CQD te inhibicije denaturacije proteina kojom bi se pokazao protuupalni učinak pripremljenih nanočestica.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. UGLJIKOVI NANOMATERIJALI

Nanomaterijali, kao posebna klasa materijala veličine čestica manjih od 100 nm, posebno se ističu zbog velikih mogućnosti primjene u elektronici, biomedicini, prehrambenoj tehnologiji, analitičkoj kemiji pa sve do područja koja se bave studijama skladištenja energije. Povijesno gledano, priča o ugljikovim nanomaterijalima i njihovom značaju u znanstveno-istraživačkim krugovima započinje prvim istraživanjima fulerena i njegovih derivata (Kroto i sur., 1985; Kour i sur., 2020). Upravo zbog svojih jedinstvenih fizikalno-kemijskih svojstava, velike specifične površine, termalne stabilnosti, specifičnih električnih, mehaničkih i optičkih svojstava, nanomaterijali na bazi ugljika zaista pronalaze primjenu širokog spektra u različitim područjima industrije i znanosti (Afreen i sur., 2018). Ovisno o dimenzionalosti, veličini i obliku, ugljikovi nanomaterijali se mogu podijeliti u sljedeće skupine (**Slika 1**): 1) nuldimenzionalni (0D; fulereni i kvantne točke), 2) jednodimenzionalni (1D; ugljikove nanocjevčice i nanovlakna), 3) dvodimenzinalni (2D; grafen) i 4) trodimenzionalni (3D; grafit i ugljikova spužva) nanomaterijali (Mohamed, 2017; Afreen i sur., 2018). Upravo zbog očitih razlika u obliku i veličini materijala, prisutne su i varijacije u veličini pora, reaktivnosti, površinskoj funkcionalnosti, čvrstoći, vodljivosti, optičkim, mehaničkim i električnim svojstvima i drugo.



Slika 1. Klasifikacija ugljikovih nanomaterijala prema dimenzionalnosti (preuzeto i prilagođeno prema Yan i sur., 2016).

2.2. UGLJIKOVE KVANTNE TOČKE

Prema definiciji, CQD pripadaju skupini nuldimenzionalnih (0D) ili točkastih materijala promjera oko 10 nm, s različitim udjelima sp^3- i sp^2-hibridiziranih ugljikovih atoma (Kang i sur., 2020). Štoviše, CQD predstavljaju revolucionarne i inovativne ugljikove fotoluminescentne nanomaterijale koji zbog svojih izvanrednih fizikalno-kemijskih te optičkih svojstava privlače posebnu pozornost znanstvene zajednice (Javed i O'Carroll 2021a; Ai i sur., 2021; Wu i sur., 2022; Kumar i sur., 2022). Njihova kemijska i foto-stabilnost, biokompatibilnost, prilagodljiva

topljivost u specifičnim medijima (ovisno o početnim prekursorima i korištenom otapalu) te relativno jednostavna mogućnost modifikacije, omogućuje CQD široku paletu primjene s naglaskom u biomedicini, farmaciji, monitoringu vode te općenito u nanotehnologiji i analitičkoj kemiji (Gao i sur., 2016; Chu i sur., 2019; Ji i sur., 2020; Nazri i sur., 2021; Šafranko i sur., 2021a; Qin i sur., 2022; Zhu i sur., 2022; Wu i sur., 2022).

Promjene u optičkim karakteristikama CQD moguće je prilagođavati i kontrolirati varijacijama u kemijskom sastavu funkcijskih skupina na površini čestica (funkcionalizacija površine), u veličini čestica, ali i inkorporiranjem ili ugradnjom različitih heteroatoma u strukturu, odnosno dopiranjem (Yan i sur., 2018; Chen i sur., 2019; Liu 2020). Kao jedno od potencijalnih rješenja s ciljem poboljšanja optičkih svojstava CQD nanočestica navodi se funkcionalizacija površine s karboksilnim i hidroksilnim skupinama, dok posebnu pozornost dobivaju i istraživanja s modifikacijama koje uključuju amino ($-NH_2$) i tiolne (-SH) skupine za koje je dokazano da osnažuju afinitet prema biološkim materijalima i određenim metalnim iona te poboljšavaju QY (Chen i sur., 2019; Kim i Kim 2020). Novija i temeljitija istraživanja CQD navode da se i post-sintetskim tretiranjem akiralnih CQD mogu dobiti kiralne CQD s mogućnošću enantioselektivnog odziva kiralnih kemijskih vrsta (Das i sur, 2022). Ovakvo istraživanje jedno je od rijetkih koje se bavi proučavanjem strukture/stereokemije CQD koje bi potencijalno moglo dati odgovor o utjecaju pojedinih prekursora na samu aktivnost pripremljenih CQD.

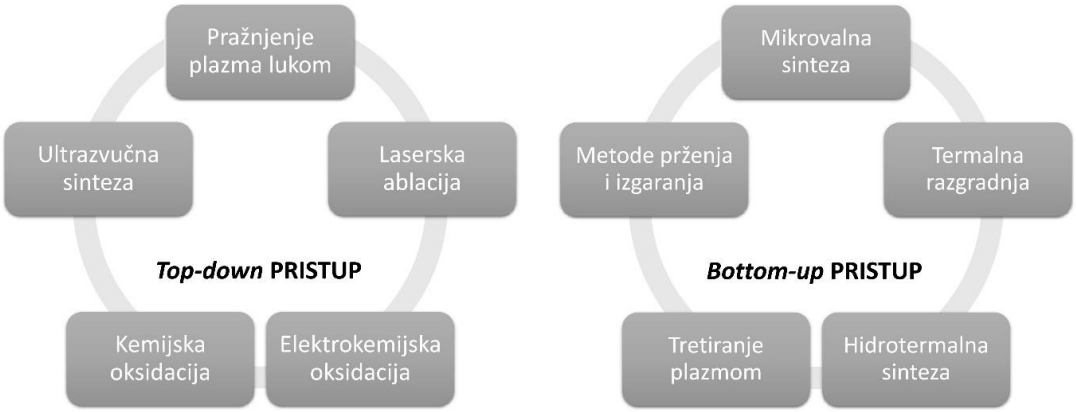
Poznato je da se fotoluminescentne (fluorescentne) CQD nanočestice mogu pripraviti dvama različitim sintetskim pristupima, primarno „*bottom-up*“ i „*top-down*“ pristupom. Pristup „*bottom-up*“ podrazumijeva sintezu nanočestice počevši od atoma i/ili molekule (Wang i sur., 2017a), dok se kod „*top-down*“ pristupa koriste veći prekursori kako bi se kemijskim ili fizikalnim postupkom dobile manje čestice (Gao i sur., 2016; Sciortino i sur., 2018; Šafranko i sur., 2021a; Wang i sur., 2019). Priča o ovim multifunkcionalnim i fluorescentnim nanomaterijalima započinje slučajnim dobivanjem CQD „*top-down*“ pristupom tijekom postupka pročišćavanja ugljikovih nanocijevi s jednom stijenkom (engl. *Single-wall carbon nanotubes*; SWNTs). Nakon pročišćavanja SWNTs preparativnom gel elektroforezom, Xu i sur. (2004) uočili su fluorescentne čestice koje su isprva tretirali kao međuprodukt postupka. Na temelju tog istraživanja, Sun i sur. (2006) dobivene nanočestice imenuju kao CQD. Od tada CQD postaje dobar temelj za mnoga istraživanja i novije spoznaje, a koji je danas prava riznica za znanstvenike koji rješenja traže u jeftinim i multifunkcionalnim materijalima.

Biomedicinska istraživanja na CQD tehnologiji uglavnom su se temeljila na sintezi CQD na bazi teških metala poput kadmija (Cd^{2+}) te iako su čestice zadovoljile funkcionalnim karakteristikama, problem je stvarao visoki citotoksični učinak čak i pri vrlo niskim koncentracijama (Ding i sur., 2016; Yoo i sur., 2019; Abbas i sur., 2020).

Polazeći od važnosti uvažavanja principa zelene kemije (Anastas i Eghbali, 2010), jedan od glavnih ciljeva u sintezi CQD je pronalazak pogodnog sintetskog pristupa koji bi bio ekološki-prihvatljiv, relativno brz i jeftin, a ujedno učinkovit za dobivanje novih multifunkcionalnih i biokompatibilnih kvantnih točaka. Kao vrlo lako dostupan i rasprostranjen organski prekursor, biomasa se pokazala kao izvrsna alternativa inače skupim i često ekološki-neprihvatljivim kemikalijama. Osim što se biomasa može smatrati kao izvor prekursora ugljika prirodnog porijekla koji je jeftin i netoksičan, nudi se i mogućnost iskorištenja nusproizvoda/otpada bez značajne ili nikakve ekonomske vrijednosti (koji ujedno predstavlja i ekološki rizik) za dobivanje visoko-vrijednih materijala s potencijalnom primjenom u nanotehnologiji. Jedan od velikih izazova predstavlja niski QY CQD dobivenih iz biomase te je potrebna prethodna ili naknadna modifikacija/funkcionalizacija površine nanočestica (Jing i sur., 2019; Meng i sur., 2019; Qi i sur., 2019; Šafranko i sur., 2021b). Niski QY ograničava primjenu fluorescentnih materijala u biomedicinske i analitičke svrhe, posebice u smislu staničnog oslikavanja (engl. *bioimaging)* jer utječe na osjetljivost i rezoluciju fluorescentnog oslikavanja (Lv i sur., 2020) te na osjetljivost analitičkih metoda za detekcije kemijskih vrsta. Stoga, funkcionalizacija i općenito modifikacija površine nanočestica ima vrlo važnu ulogu u poboljšanju optičkih karakteristika CQD i topljivosti u različitom mediju, utječući indirektno i na njihovu primjenjivost (Dimos, 2016).

2.2.1. Sintetski pristupi za dobivanje CQD

Literaturno je obrađeno mnogo sintetskih puteva s ciljem dobivanja multifunkcionalih i učinkovitih CQD (Wang i sur., 2017a; Yan i sur., 2018; Wang i sur., 2019; Kou i sur., 2020; Jorns i Pappas 2021; Kumar i sur., 2022). Međutim, općenito se metode za dobivanje CQD mogu ugrubo klasificirati u dvije skupine kao „*top-down*“ i „*bottom-up*“ pristupi (**Slika 2**). Ovisno o odabranom pristupu, bitno je napomenuti da upravo ovaj čimbenik ima važan utjecaj na veličinu čestica, koloidnu stabilnost, prisutnost funkcijskih skupina na površini pa stoga direktno određuje i optička i fizikalno-kemijska svojstva pripravljenih CQD nanočestica (Zhang i Yu, 2016).



Slika 2. Shematski prikaz podjele sintetskih pristupa korištenih u sintezama CQD.

2.2.1.1. „*Top-down*“ pristup

U „*top-down*“ metodi (**Slika 2**) se makroskopske ugljične strukture (grafitni prah, čađa, aktivni ugljen, ugljične nanocijevi, karbonska vlakna) smanjuju do nano veličina i to postupcima kao što su laserska ablacija, ultrazvučna sinteza, kemijska oksidacija, elektrokemijska oksidacija te pražnjenje plazma lukom (M. i sur., 2022).

Prednosti „*top-down*“ metode su sljedeće: jednostavna priprema, mogućnosti uporabe jeftinih sirovina, mogućnost masovne proizvodnje. U nedostatke ubrajamo dugotrajan proces pripreme i obrade čestica koji zahtijeva teške uvjete sinteze (jake kiseline ili oksidacijska sredstva), a samim time i poprilično skupu opremu i materijale. Na taj način dolazimo do zaključka kako su „*top-down*“ metode pogodne za masovnu industrijsku proizvodnju.

2.2.1.2. „*Bottom-up*“ pristup

Pristup „*bottom-up*“ ipak je opisan u većem broju znanstvenih i literaturnih pregleda i radova te se metode poput mikrovalne i hidrotermalne sinteze te postupka termalne razgradnje najčešće spominju u kontekstu priprave CQD (Wang i sur., 2019; Naik i sur., 2022; Xue i sur., 2022). Ovim pristupom nanostrukture nastaju od manjih komponenti kao što su atomi i molekule (Kumar i sur., 2022). Velika prednost „*bottom-up*“ metoda jest mogućnost modifikacije površine čestica tijekom postupka sinteze ili posttretiranjem (Wang i Hu 2014). Metode „*bottom-up*“ smatraju se boljim odabirom za sintezu CQD zbog većih mogućnosti uporabe prekursora/dopanata i kontrole nad veličinom čestica, morfologijom i kemijskim sastavom. Nadalje, mogućnost primjene različitih organskih prekursora ugljika uzrokuje promjenjivost svojstava CQD, a samim time se proširuje raspon mogućih primjena u različitim istraživačkim područjima.

Na tom tragu, hidrotermalna sinteza, mikrovalna sinteza i termalna razgradnja (**Slika 2**) najčešće su opisane metode za pripremu CQD kada govorimo o „*bottom-up*“ metodi zahvaljujući jednostavnosti, korištenju širokog izbora prekursora ugljika, mogućnosti funkcionalizacije površine, ekološke prihvatljivosti i niskih troškova (Cai i sur., 2021; Khayal i sur., 2021). U **Tablici 1**, sumirane su sve karakteristike oba pristupa.

Tablica 1. Prednosti i nedostatci „*top-down*“ i „*bottom-up*“ pristupa u sintezi CQD.

Metoda pripreme	Prednosti metode	Nedostaci metode	Reference
“*Top-down*” pristup			
Pražnjenje plazma lukom Laserska ablacija Kemijska oksidacija Elektrokemijska oksidacija	Relativno jednostavni postupci Jeftina sirovina Proizvodnja u velikom mjerilu Nema potrebe za pročišćavanjem	Otežana kontrola veličine čestica Skupa oprema i sirovina	Sun i sur., 2006; Ray i sur., 2009; Kou i sur., 2020
“*Bottom-up*” pristup			
Hidrotermalno/solvotermalno tretiranje Karbonizacija Sinteza potpomognuta mikrovalovima Termalna razgradnja i piroliza	Dobra kontrola nad veličinom čestica i morfologijom Jeftinija metoda Veće mogućnosti u funkcionalizaciji površine	Priprava u većem mjerilu otežana Potrebno je uzorak pročistiti	Krista i sur., 2020; Kou i sur. 2020; Al Jahdaly i sur., 2021

2.3. KARAKTERIZACIJA NANOMATERIJALA CQD

Svojstva pripremljenih CQD mogu varirati ovisno o primijenjenom sintetskom postupku i uvjetima (primijenjena temperatura i vrijeme tretiranja), odabiru prekursora ugljika, modifikaciji/funkcionalizaciji površine čestice ili pak dopiranjem heteroatomima (Dimos, 2016). Svi ti čimbenici direktno mogu utjecati na veličinu čestica, strukturu i morfološke karakteristike, na prisutnost pojedinih funkcijskih skupina na površini i upravo ove karakteristike određuju primjenjivost pripremljenih uzoraka u različitim sferama znanosti i industrije (Tuerhong i sur., 2017; Koutsogiannis i sur., 2020). Međutim, jedan od najvažnijih parametara u procjeni optičkih performansi nastalih čestica je zasigurno QY koji ujedno s određivanjem pomaka valne duljine emisije prema plavom (engl. *blue shift*) ili crvenom (engl. *red shift*) dijelu spektra, biokompatibilnosti/citotoksičnosti i topljivosti čestica u različitim medijima određuje krajnju

primjenjivost CQD u biomedicinskom ili u analitičkom smjeru (Li i Zhu, 2013; Lv i sur., 2020). Stoga je prije ispitivanja primjenjivosti čestica, vrlo važno provesti kemijsku, strukturnu i optičku karakterizaciju CQD uzoraka.

2.3.1. Kemijska i strukturna svojstva CQD

Prema općenitoj definiciji, CQD se sastoje od ugljikove jezgre s vezanim funkcijskim skupinama (uglavnom skupine s kisikom) na površini materijala (Ross i sur., 2020; Khayal i sur., 2021). Do danas, potpuno razumijevanje egzaktne strukture CQD i dalje ostaje izazov. U najčešćim slučajevima CQD se pronalaze u amorfnom i sferičnom obliku nastalih čestica s prisutnošću sp^2- i sp^3- hibridiziranog ugljikova atoma. Iako CQD mogu biti i kristalične prirode, većina literaturnih navoda strukturu CQD spominje u kontekstu amorfne prirode (niski stupanj kristaliničnosti s defektima na površini) s visokim stupnjem pravilne raspodjele sp^2-hibridiziranog aromatskog ugljikova atoma u jezgri, dok se u vanjskoj ljusci pojavljuju sp^3-hibridizirani ugljikovi atomi koji nisu pravilno raspoređeni (Hui i sur., 2018; Meierhofer i sur., 2020; Jorns i Pappas, 2021). U konačnici, na samoj površini se mogu pojavljivati funkcijske skupine poput karboksilne, hidroksilne ili amino skupine porijeklom iz prekursora ili pak iz dodanog dopanta.

Nedestruktivna analitička tehnika koja se koristi za strukturnu analizu i karakterizaciju materijala je upravo rendgenska difrakcija na prahu (engl. Powder *X-ray Diffraction*; PXRD). Ovom metodom se dobivaju informacije o samoj kristalnoj strukturi, kemijskom sastavu i određenim fizičkim karakteristikama bez razaranja uzorka od interesa. U istraživanju Sachdev i Gopinath (2015) provedena je strukturna karakterizacija uzoraka CQD dobivenih iz biomase lista korijandera. Iz rezultata su bila vidljiva dva pika na difraktogramima PXRD analize: široki amorfni pik (vrpca) na 2θ = 21,5° i slabi pik na 2θ = 38,5° te su tim pikovima dodjeljene (002) i (101) ravnine amorfnog ugljika. Nadalje, u istraživanju Edison i sur. (2016), sintezom potpomognutom mikrovalovima iz L-askorbinske kiseline i *β*-alanina dobivaju *N*-CQD. Strukturnom analizom PXRD-a dobiven je difraktogram s dvije široke vrpce pri 2θ = 23,7° i 2θ = 42° s visokim udjelima (002) i (100) ravnina koje potencijalno upućuju na prisutnost grafitne strukture u materijalu.

Metoda koja se može svrstati u nedestruktivne metode strukturne karakterizacije je i mikroskopija atomskih sila (engl. *Atomic Force Microscopy*; AFM). Metoda kojom se mjereći interakciju između oštrog šiljka pričvršćenog na savitljivu polugu i površine analita dobiva informacija o topografiji uzorka (Vahabi i sur., 2013). Na taj je način moguće dobiti 3D prikaz površine uzorka sa subnanometarskoj rezoluciji i moguće je provesti više načina mjerenja: sile adhezije, elastičnost uzorka, međumolekularne sile, tvrdoća uzorka (Dufrêne 2002). Princip

rada instrumenta se temelji na promjeni veličine sile ovisno o položaju (u smjeru *x* i *y* smjeru) probe i analita. Wei i sur. (2014) sintetizirali su *N*-CQD mikrovalnim tretiranjem iz glukoze i aminokiseline triptofan (Trp) te su uzorak okarakterizirali s AFM i HR-TEM tehnikom. AFM rezultati su upućivali na prosječnu visinu i veličinu čestica od 2,77 nm i 2,88 nm. U konačnici, vizualizirane su čestice sferične morfologije. Nadalje, drugi primjer uključuje sintezu *N-L*-CQD (*N*-dopirane CQD uporabom eutektičkog otapala (maseni omjeri betain : mliječna kiselina iznosi 8 g : 21,7 g) i lignina te strukturnu karakterizaciju s prisutnosti distribucije veličine čestica od 4 nm do 12 nm i sa semi-sferičnom morfologijom (Jiang i sur., 2018). Detaljniji uvid u samu morfologiju i distribuciju veličine čestica u uzorku moguće je dobiti tehnikom transmisijske elektronske mikroskopije visoke rezolucije (engl. *High Resolution - Transmission Electron Microscopy*; HR-TEM) i uglavnom rezultati AFM i HR-TEM trebaju biti usporedivi.

Pojedine informacije o defektima na materijalu na atomskoj razini i strukturnim značajkama može pružiti i Raman spektroskopija (Jelinek, 2017). Vrlo je važna pojava dviju vrpci u karakterizaciji CQD, posebice D (I_D) vrpca na približno 1350 cm^{-1} koja odgovara prisutnosti sp^2-hibridiziranog ugljika s defektima (pojava sp^3-hibridiziranih ugljikovih atoma) te G vrpca (I_G) na približno 1600 cm^{-1} koja odgovara prisutnost sp^2-hibridiziranog ugljika s indikacijom na prisutnost sp^2-hibridiziranih ugljikovih atoma uređene strukture. Omjer intenziteta I_D/I_G upućuje na moguće defekte u grafitnoj strukturi i na stupanj uređenosti sp^2-hibridiziranih ugljikovih atoma u strukturi nakon kemijskog tretiranja oksidacijom ili dopiranjem (Vinci i sur., 2015).

Tehnike poput infracrvene spektrometrije s Fourierovom transformacijom signala (engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*, FT-IR) i spektroskopije fotoelektrona rendgenskim zrakama (eng. *X-ray Photoelectron Spectroscopy*, XPS) u sinergiji mogu potvrditi elementarnu strukturu (prisutnost pojedinih elemenata u uzorku i njihovu rasprostranjenost) te načine vezanja pojedinih jedinica u strukturi materijala (Khairol Anuar i sur., 2021; Kumar i sur., 2022). No, tehnika XPS daje detaljniji uvid u kemijska stanja na površinskim slojevima materijala. Kemijsku stabilnost suspenzija u određenom mediju i ovisnost o površinskom naboju čestica određuje se pomoću zeta potencijala (ζ-potencijal). Naime, poznato je da izrazito pozitivna ili negativna vrijednost ζ-potencijala čestica upućuje na dobru stabilnost suspenzije uslijed nastanka elektrostatičkog odbijanja čestica. Zapravo se i smatra da vrijednost ζ-potencijala od ± 30 mV ima dovoljnu odbojnu silu za postizanje veće fizikalne koloidne stabilnosti, dok odstupanja od te vrijednosti mogu upućivati na pojave poput agregacije, nestabilnosti, flokulacije ili koagulacije (Vogel i sur., 2017). Mnogi čimbenici mogu utjecati na koloidnu stabilnost poput koncentracije, pH vrijednosti, temperature, ionske jakosti medija i prisutnost funkcijskih skupina ili liganada na površini (Németh i sur., 2022).

2.3.2. Optička svojstva CQD

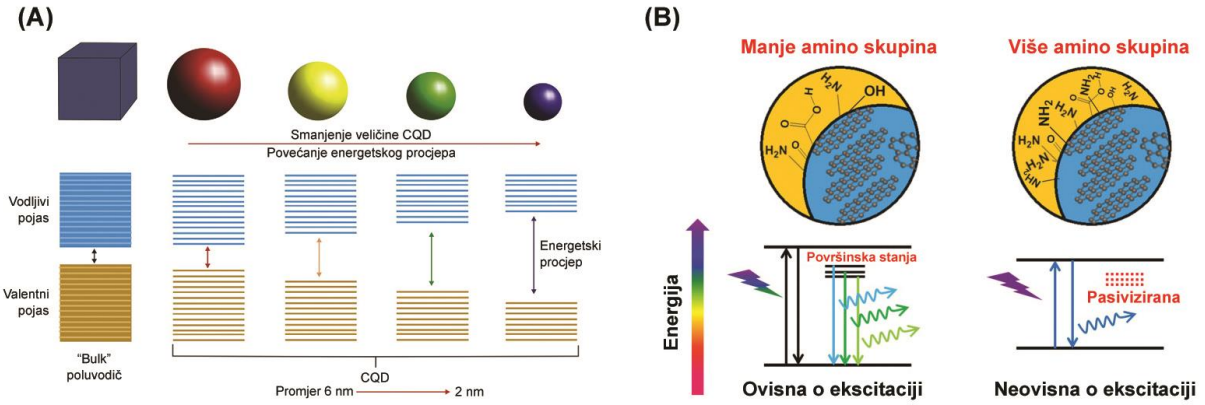
Prilagodljivo svojstvo fluorescencije CQD je vrlo važno svojstvo u određivanju primijenjivosti uzoraka, posebice u svrhe staničnog oslikavanja i kao senzorskog nanomaterijala. Da bi se u potpunosti shvatila pojedina svojstva CQD i njihov utjecaj na optička svojstva, prvo je potrebno razumijeti što se točno događa na kvantnoj razini uslijed apsorpcije elektromagnetskog zračenja. Predloženo je nekoliko mehanizama fotoluminescencije koji uključuju učinak kvantnog zatočenja (engl. *quantum confinement*), utjecaj defekata i površinskih stanja te se kao mogući izvor fotoluminescencije navode i nastali manji fluorofori kao nusprodukt sintetskog postupka dobivanja CQD (Liu 2020; Mintz i sur., 2019).

2.3.2.1. Mehanizmi djelovanja fotoluminescencije

Učinak kvantnog zatočenja (**Slika 3A**) se promatra kroz veličinu čestica, odnosno kada se uslijed smanjenja veličine čestica elektron „zarobljava“ u geometrijskom smislu prostora te se mijenja i energetski procjep kao rezultat smanjenja veličine čestica. Fotoluminescencija se prema ovom mehanizmu odvija zbog kvazi kontinuiranih stanja u energetskim vrpcama koja postaju diskretna te energetski procjep (engl. *band gap*) raste (Yuan i sur., 2017; Yan i sur., 2019; Liu 2020). Učinak kvantnog zatočenja ima direktan utjecaj na fotoluminescentna svojstva čestica i zapravo je poznato da se varijacijama u veličini čestica može dobiti široki spektar valnih duljina emisija. Stoga se može reći da je rezultat kvantnog zatočenja proširenje energetskog procjepa koji također utječe i na samu valnu duljinu emisije (obrnuto proporcionalan odnos) (Yuan i sur., 2017).

Nadalje, jedna od također prhvaćenih teorija je i utjecaj defekata i površinskih stanja čestica (**Slika 3B**). U ovom slučaju, informacije o elektronskim prijelazima iz osnovnog u pobuđeno stanje te o pojavama uzrokovanim tim promjenama daje nam dijagram po Jablonskom (Jablonski 1933). U klasičnom primjeru dijagrama po Jablonskom prikazani su elektronski prijelazi između procjepa najviše popunjene molekularne orbitale (engl. *Highest Occupied Molecular Orbital*; HOMO) i najniže nepopunjene molekularne orbitale (engl. *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*, LUMO) (Farshbaf i sur., 2018). Nakon apsorpcije fotona, HOMO elektroni prelaze u LUMO energetsku vrpcu uz odvijanje procesa neradijacijske (vibracijske) relaksacije. Nakon vibracijske relaksacije, elektron emitira energiju u obliku fotona te se vraća u HOMO energetsku razinu. U slučaju CQD, poznato je da se uslijed defekata u strukturnim svojstvima (kombinacija sp^2- i sp^3-hibridiziranih ugljikovih atoma) stvaraju dodatne energetske razine između HOMO i LUMO što rezultira da CQD emitiraju energiju određene valne duljine koja ovisi o energiji ekscitacije. Za primjer, Yu i sur. (2012) su pripravili CQD kako bi promatrali potencijalni mehanizam luminescencije u ovisnosti o prisustvu funkcijskih skupina

na površini, te su ustanovili da su amino skupine djelovale kao učinkovito pasivizacijsko sredstvo kojim se mogu kontrolirati površinska stanja CQD. Detaljniji uvid u proučavanje utjecaja različitih funkcijskih skupina i dopanata na optička svojstva dobivenih CQD dan je u znanstvenom radu Das i sur. (2022) gdje su korišteni prekursori cisteina, glutationa, fenilglicina i triptofana.



Slika 3. Grafički prikazi mehanizama: (A) kvantno zatočenje i (B) utjecaj površinskih stanja (preuzeto i prilagođeno iz Sumanth Kumar i sur., 2018; Li i sur., 2015).

Uz sve navedeno, kao potencijalni izvor fotoluminescencije se navodi i prisutnost manjih fluorofora nastalih kao nusprodukt sintetskog postupka dobivanja CQD. Takve luminescentne molekule mogu biti suspendirane nezavisno o karbogenoj jezgri CQD ili se mogu adsorbirati na površinu CQD, utječući direktno na optička svojstva CQD (Ai i sur., 2021; Li i sur., 2022).

2.3.2.2. Metode karakterizacije za određivanje optičkih svojstava CQD

Optička karakterizacija CQD podrazumijeva ispitivanje apsorpcijskog svojstva CQD u UV-Vis području, spektrofluorimetrijsko ispitivanje CQD na fotostabilnost, QY, maksimume valnih duljina emisije i ekscitacije, utjecaj otapala, pH vrijednosti te prisutnosti pojedinih iona i molekula na intenzitet fotoluminescencije. Uvidjelo se da CQD pokazuju svojstvo apsorpcije u UV području, posebice u području valnih duljina od 260 – 270 nm te u valnom području od 300 – 330 nm koja se proteže i duž vidljivog (Vis) područja. Pojava apsorpcijske vrpce pri nižim valnim duljinama u području od 260 – 270 nm upućuje na π–π* prijelaz (HOMO-LUMO) C=C veza, odnosno prisutnosti sp^2-hibridiziranih domena, dok je pri višem valnom području uočen n–π* prijelaz (prijelaz iz nevezne u protuveznu orbitalu) C=O veza. Takav n–π* prijelaz se odvija kada nespareni elektroni kisika C=O veze (nazvani „n“ elektroni) pobuđivanjem prijeđu u π* protuveznu orbitalu (Das i sur., 2019). Iz navedenih činjenica, moguće je zaljučiti da će izgled UV-Vis spektara ovisiti o stupnju i načinu modifikacije/funkcionalizacije površine

materijala. Jedan od glavnih fenomena CQD nanomaterijala jest njihovo svojstvo fotoluminescencije koje im omogućuje primjenu u različitim sferama znanosti i industrije.

Ključni parametri za određivanje primjenjivosti CQD u bioanalitičke svrhe su QY, svojstvo prilagodljive valne duljine emisije i disperzivnost u vodenom mediju. Parametar QY upućuje na mogućnost primjene CQD u staničnom oslikavanju i određivanju osjetljivosti detekcije pojedinih kemijskih vrsta (Koutsogiannis i sur., 2020). Kod staničnog oslikavanja, niski QY utječe na osjetljivost i razlučivost snimanja, dok kod analitičkih metodi, niska osjetljivost može ograničiti primijenjivost u detekciji kemijskih vrsta (Koutsogiannis i sur., 2020; Lv i sur., 2020). Jedan od najvećih izazova u sintezi CQD jest dobivanje pročišćenog uzorka visokog QY i dobre biokompatibilnosti. Primjerice, uporabom biomase bez prethodne modifikacije ili *N*-dopiranja dobivaju se CQD vrlo niskog QY, dok se uvođenje sadržaja dušika u strukturu CQD pokazalo kao izvrsno rješenje kako bi se povećao QY materijala, ali i proširila primjena istih u različite smjerove (Liang i sur., 2014; Šafranko i sur., 2021b; Nguyen i sur., 2022). Kao što je već spomenuto, ovisnost valne duljine ekscitacije na emisiju flourescencije može biti uzrokovana veličinom i fizikalno-kemijskim stanjima na površini čestica (Sun i sur., 2006), no prema nekim autorima, pojava fotoluminescencije kod CQD također može biti rezultat defekata u strukturi i prisutnosti konjugiranih π-domena (Wang i sur., 2017a; Ai i sur., 2021).

Optička svojstva CQD se većinom spominju u smislu primjenjivosti u staničnom oslikavanju ili pak u razvoju metoda za detekciju molekula i metalnih iona. Najveći izazov primjene CQD u staničnom oslikavanju je zasigurno QY, fotostabilnost (pojava fotoizbjeljivanja) i biokompatibilnost. Idealni slučaj je dobiti CQD s visokim QY s emisijom u crvenom području, odnosno u NIR (blisko-infracrveno) području koje bi omogućilo primjenu i u *in vivo* istraživanjima (Escobedo i sur., 2010; Li i sur., 2021). Na taj način bi se omogućilo stabilnije oslikavanje jer izvor zračenja u vidljivom području reducira rizik oštećenja stanica (kao što je to u slučaju UV područja), dok novija istraživanja upućuju na učinkovitije prodiranje NIR zračenja kroz tkivo s visokim potencijalom primjene u *in vivo* studijama (Hong i sur., 2017).

2.4. ODABIR PREKURSORA I DOPANTA U PRIPRAVI CQD

Mnogi čimbenici poput primijenjene temperature u postupku sinteze, vremena reakcije, vrste otapala mogu utjecati na intrinzična svojstva CQD koja se ujedno mogu povezati i s fotoluminescentnim ponašanjem pripravljenih CQD (Khairol Anuar i sur., 2021). Međutim, ogroman utjecaj na sama svojstva CQD zasigurno ima i odabir pogodnog prekursora i dopanta ovisno o željenoj primjeni CQD. Stoga, varijacijama u prekursorima/dopantima i primijenjenim eksperimentalnim uvjetima, moguće je dobiti CQD različitih morfoloških i optičkih karakteristika (Chu i sur., 2019).

Anorganske kvantne točke (fluorofori) na bazi teških metali (CdS, CdSe, CdTe) pokazale su izvrsna fotokatalitička, kemijska i električna svojstva kao i fotostabilnost te su svoju primjenu pronašle u izradi solarnih ćelija, senzora, LED uređaja te su čak provedena testiranja i na biološkim sustavima (Li i sur., 2013; Li i sur., 2019). Međutim, rad s biološkim uzorcima ili *in vivo* studije zahtijevaju dodatno ispitivanje uzoraka na biokompatibilnost/citotoksičnost i upravo je primjena kvantnih točaka na bazi kadmija limitirana u biomedicinskoj primjeni zbog iskazivanja značajnog citotoksičnog učinka i pri vrlo niskim koncentracijama sintetiziranih uzoraka (Chinnathambi i sur., 2017). Daljnji napori znanstvenika usmjereni su ka istraživanjima koja bi omogućila pripravu kvantnih točaka bez kadmija, a kao jedno od učinkovitih rješenja su i CQD na bazi biomase (Li i sur., 2013).

2.4.1. Biomasa kao prekursor ugljika u tehnologiji CQD

Pod biomasom se podrazumijeva općenito materijal prirodnog porijekla, dok se i nusproizvodi, industrijski ili kućni otpad kao bogat izvor ugljika može koristiti kao prekursor u sintezi CQD kao alternativa toksičnim kemikalijama. Na taj se način mogu proizvesti biokompatibilne CQD koje su svojim svojstvima usporedive onima anorganskog podrijetla. Iako sve čini vrlo idealno, izazovi i u ovom slučaju postoje posebice što se tiče QY. Naime, CQD uzorci dobiveni iz biomase često se odlikuju niskim QY te je njihova primjena vrlo ograničena i što se tiče staničnog oslikavanja i primjene kao nanoprobe za razvoj analitičkih metoda (Dimos 2016; Qi i sur., 2019). Različita istraživanja su pokazala kako bi se modifikacijom površine ili dopiranjem različitim heteroatomima taj problem mogao riješiti (Liang i sur., 2014; Dimos 2016; Šafranko i sur., 2021b). Iako se poboljšanje optičkih karakteristika spominje u smislu dopiranja s dušikovim elementom i/ili skupinama, ne tako rijetko se spominje i dopiranje sa sumporom (Achadu i sur., 2020) i fosforom (Kalaiyarasan i sur., 2020). I fosfor i sumpor su vrlo kompatibilni kao pogodan heteroatom za dopiranje CQD zbog svojih atomskih karakteristika, odnosno oba elementa imaju veći atomski promjer i vrlo lako mogu stvoriti „nered“ unutar ugljikove strukture. Nadalje, atom dušika je elektronegativniji u odnosu na ugljik i sadrži sveukupno 5 elektrona u valentnoj ljusci, no zbog slične atomske veličine pogodan je i za dopiranje CQD (Edison i sur., 2016; Kang i sur., 2020).

Potrebno je naglasiti da ovaj pristup može biti od velike značajnosti, prvenstveno jer se kao prekursori ugljika mogu koristiti i nusproizvodi prehrambene industrije koji potencijalno predstavljaju ekonomski/ekološki problem i kojeg je vrlo teško adekvatno zbrinuti. Biomasa, kao materija prirodnog i organskog podrijetla, bogata je ugljikohidratima, proteinima, vlaknima i polifenolnim komponentama koje mogu biti pogodan prekursor u sintezi CQD. U nekim slučajevima biomasa je prirodno obogaćena dušikovim spojevima pa prethodna modifikacija

površine nije niti potrebna kako bi se poboljšala svojstva CQD (Su i sur., 2018a). Ujedno takva prirodna materija (posebice nusproizvodi i otpad) vrlo često nema ekonomsku vrijednost i ovakvim pristupom se mogu iskoristiti za dobivanje vrijednih materijala primijenjivih u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji te u biomedicini. U **Tablici 2** prikazan je literaturni pregled uvjeta i primjena CQD dobivenih iz različitih prekursora biomase.

Tablica 2. Uvjeti i primjene sintetiziranih CQD iz različitih prekursora biomase.

Biomasa	Vrsta sinteze	Modifikacija	QY	Primjena	Reference
Svježa rajčica	Sinteza potpomognuta mikrovalovima	EDA[1], urea	1,77 % (sirovine), 7,90 % od EDA i 8,50 % od uree (modifikacija)	Detekcija vanilina	Liu i sur., 2017
Cherry rajčice	Hidrotermalna	ND[2]	9,70 %	Detekcija trifluralina - herbicid	Lai i sur., 2020
Sok limuna	Hidrotermalna	EDA	31,0 %	Detekcija Hg^{2+} iona	Tadesse i sur., 2020
Rosa roxburghii	Hidrotermalna	ND	24,80 %	Detekcija *o*-nitrofenola	Zhang i sur., 2020
Škrob krumpira	Ultrazvučna sinteza s dodatkom kiseline	Oksidacija kiselinom	10,0 % (standard: Rodamin B)	Detekcija Zn^{2+} iona	Qiang i sur., 2019
Mrkva	Hidrotermalna	PEI[3]	11,50 %	Detekcija S^{2-} iona	Jin i sur., 2017
Špinat	Hidrotermalna	ND	53,0 %	Detekcija 2-nitrofenola (2-NP) and 4-nitrofenola (4-NP)	Ren i sur., 2018
Mješavina soka limuna i crvenog luka	Sinteza potpomognuta mikrovalovima	NH_4OH	23,60 %	Riboflavin	Monte-Filho i sur., 2019
Šareni grah	Hidrotermalna	ND	10,85 %	Detekcija Fe^{3+} iona	Zulfajri i sur., 2019
Ekstrakt crvenog luka	Hidrotermalna	EDA	6,21 %	Detekcija Zn^{2+} iona u krvnoj plazmi	Ghosh Dastidar i sur., 2021
Kora naranče (OP), ginkgo biloba lišće (GB), *paulownia* lišće (PL) i cvijet magnolije (MF)	Hidrotermalna	ND	4,29 % (OP-CQD), 7,72 % (GB-CQD), 4,74 % (PL-CQD), 8,13 % (MF-CQD)	Detekcija Fe^{3+} iona	Wang i sur., 2020
Kora limuna	Hidrotermalna	Oksidacija kiselinom (0,1 M H_2SO_4/TiO_2)	14,0 %	Detekcija Cr^{6+} iona	Tyagi i sur., 2016
	Hidrotermalna	ND	11,0 %	Detekcija karmina u pićima (E120)	Su i sur., 2018b
Kora manga	Hidrotermalna	Toluen, APTES[4]	ND	Detekcija mezotriona - herbicid	Sun i sur., 2019
Mlijeko poslije isteka roka trajanja	Sinteza subkritičnom vodom	ND	8,64 %	Detekcija Fe^{3+} iona	Su i sur., 2018a
Biomasa luka	Karbonizacija	EDA	28,0 %	Detekcija Fe^{3+} iona	Bandi i sur., 2016
Kora ananasa	Hidrotermalna	Etanol	42,0 %	Detekcija Hg^{2+} iona	Vandarkuzhali i sur., 2018

Nastavak **Tablice 2**					
Rižini ostaci	Hidrotermalna	Lizin	23,48 %	Detekcija Fe^{3+} iona i tetraciklina - antibiotik	Qi i sur., 2019
Čađa	Kemijska oksidacija	HNO_3	3,0 %	Detekcija pikrinske kiseline, Cu^{2+} i Fe^{3+} iona	Venkatesan i sur., 2019
Taro kora	Karbonizacija	H_2O_2, Eu^{3+}	13,80 %	Detekcija F^- iona	Boruah i sur., 2020

[1] EDA - etilendiamin, [2] ND – nema dostupnih podataka, [3] PEI - polietilenimin, [4] APTES - (3-aminopropil)trietoksisilan

2.4.2. Kora citrusa kao prekursor ugljika u sintezi CQD

Kako bi se shvatio cilj uporabe biomase/otpada kore klementine kao pogodnog prekursora za pripravu CQD, potrebno je prvo objasniti fitokemiju samog biljnog materijala. Naime, plod klementine pripada skupini citrusnog voća koje je vrlo zastupljeno u prehrambenoj industriji. Za potrebe prehrambene industrije uglavnom se koristi plod za preradu svježih sokova ili sokova na bazi citrusa. Osim proizvodnje sokova i zbog svoje specifične arome, citrusi se također mogu koristiti kao pojačivači okusa (Marti i sur., 2011). Međutim, kao glavni problem u proizvodnji postavlja se veliki zaostatak otpada nakon prerade voća što potencijalno predstavlja veliki i ekonomski i ekološki rizik. Najčešće se taj otpad manifestira u obliku pulpe, vlaknastih membrani, sjemenki, no u najvećem udjelu zaostaje kora citrusa. Literatura čak ukazuje na široki spektar mogućnosti iskorištenja takvog otpada u komercijalne svrhe poput proizvodnje prehrambenih vlakana, eteričnih ulja bogatim isparljivim komponentama, ekstrakcija pektina, dodataka prehrani bogatih antioksidansima i bioaktivnim komponentama (Berk 2016; Rafiq i sur., 2018; Mahato i sur., 2019). Citrusi, kao i većina bilja, voća i povrća, odlikuje se širokom sortnom raznolikošću, a pritom i u kemijskim i fizikalnim karakteristikama svake sorte pojedinačno. Bogatstvo bioaktivnih komponenti na bazi ugljika prisutnih u kori citrusa, poput fenolnih spojeva (flavonoidi, fenolne kiseline, kumarini), terpenoida (limonoidi i karotenoidi) te pektina omogućuje citrusima, kao bogatom izvoru ugljika, primjenu u pripravi CQD. Također, prisutnost minerala, tokoferola i askorbinske kiseline daje citrusima dodatnu nutritivnu vrijednost (Lu i sur., 2021; Saini i sur., 2022). Tyagi i sur. (2016) u znanstvenom radu pokazuju moguću uporabu kore limuna u sintezi CQD koje iskazuju visoki QY od ~14 % te su lako disperzivne u vodenom mediju. Nanočestice su primjenjive u detekciji Cr^{6+} iona te iskazuju dobru fotokatalitičku aktivnost kao nanokompozit titanijeva dioksida (TiO_2) i CQD. Nadalje, Gudimella i sur. (2021) pripravljaju CQD na bazi kore naranče pod refluks zagrijavanjem te su nanočestice CQD ispitane na antiradikalnu aktivnost te stanično oslikavanje. Iz kore naranče CQD također pripravlja Prasannan i sur. (2013) uz hidrotermalnu karbonizaciju i naknandu oksidaciju površine nanočestica s natrijevim hipokloritom (NaClO). Oksidirane CQD korištene su kao prekursor za pripravu nanokompozita CQD i cinkova oksida (ZnO) koji je ispitan na fotokatalitičku aktivnost. Zanimljivo, mikrovalnom sintezom iz suspenzije kore naranče, Hu i

sur. (2021) sintetiziraju nanočestice CQD koje su korištene za detekciju *Escherichia coli* u mlijeku.

Iako se može zaključiti da je kora citrusa pogodan i djelomično istražen prekursor ugljika u pripravi CQD, do sada nisu zabilježena sistematizirana istraživanja priprave CQD na bazi kore klementine i primjene aminokiselina kao *N*-dopanta.

2.4.3. Aminokiseline kao N-dopanti u tehnologiji CQD

Proteini se smatraju najrasprostranjenijim molekulama u prirodi i živim sustavima koji obavljaju esencijalne funkcije u svim živim bićima (Berg i sur., 2019). Aminokiseline, kao građevne jedinice proteina, uglavnom se međusobno razlikuju nabojem, hidrofobnošću, oblikom, kemijskom reaktivnošću, po sposobnosti i afinitetu stvaranja vodikovih veza. Upravo zbog prisutnosti dušika, u amino skupini ili s dušikovim atomima na ogranku, aminokiseline mogu poslužiti kao dopant dušika u pripravi CQD. Pregled znanstvenih radova s primjenom aminokiselina u sintezi CQD naveden je u **Tablici 3**.

Tablica 3. Literaturni pregled uporabe aminokiselina kao *N*-dopanta u pripravi CQD.

Aminokiselina	Vrsta sinteze/prekursor	QY	Primjena	Reference
Glu, Leu, Arg, Trp, Tyr, His	Solvotermalna (formamid)	Glu (39,0 %), Leu (50,4 %), Arg (48,6 %), Trp (55,6 %), Tyr (51,5 %), His (61,8 %)	Detekcija različitih proteina (*β*-gluc[1], Heme[2], Xyl[3], ChT[4], and Cyt C[5])	Pandit i sur., 2019
Ser, His, cistin	Hidrotermalna (2 %-tna octena kiselina)	~ 7,5 %, ovisno o primijenjenim uvjetima sinteze	ND[6]	Pei i sur., 2015
Gly, Lys, Ser	Hidrotermalna / limunska kiselina	Gly (12,0 %), Lys (10,6 %), Ser (12,3 %)	Detekcija metalnih iona (Hg^{2+}, Cu^{2+} i Fe^{3+})	Wang i sur., 2017b
Phe	Hidrotermalna sinteza / limunska kiselina	ND	Detekcija Fe^{3+} iona	Pu i sur., 2019
Phe	Hidrotermalna sinteza / limunska kiselina	65 %	Detekcija Fe^{3+} iona	Chahal i sur., 2020
Cys	Hidrotermalna uz dodatak NaOH	ND	Priprema porfirin-CQD hibrida	Liu i sur., 2020
Lys	Hidrotermalna / rižini ostaci	23,48 %	Detekcija Fe^{3+} iona i tetraciklina - antibiotik	Qi i sur., 2019

[1]*β*-gluc – β-glukanaza, [2]Heme – hemoglobin, [3]Xyl – ksilanaza, [4]ChT – kimotripsin, [5]Cyt C – Citokrom C, [6]ND – nema dostupnih podataka

2.5. ZNAČAJ I PRIMJENA CQD

Nanočestice CQD iskazuju odlična fizikalna, kemijska i optička svojstva i s obzirom na malu veličinu, jak intenzitet fotoluminescencije, nisku toksičnost, mogućnost disperzivnosti u različitim otapalima, dobru biokompatibilnost te mogućnost jednostavne površinske modifikacije i funkcionalizacije, CQD dobivene iz biomase povoljan su materijal u širokoj primjeni u različitim analitičkim procesima (Pandit i sur., 2019; Monte-Filho i sur., 2019; Ghosh Dastidar i sur., 2021; Liu i sur., 2021). Kako je naglašeno i ranije, CQD posjeduju odlična fotoluminescencijska svojstva i različite funkcijske skupine na površini te su kao takve pokazale veliku sposobnost detekcije različitih analita, poput metala i bioaktivnih molekula. Osim toga, zahvaljujući navedenim svojstvima, CQD se mogu koristiti u različitim aspektima istraživanja, poput u *in vivo* snimanju i ciljanoj terapiji, u isporuci lijekova, kao senzori, u fotokatalizi, kao LED diode, prilikom skladištenja energije te kao fluorescentna boja (Dimos 2016; Kang i sur., 2020). Zahvaljujući izvrsnim optičkim svojstvima, CQD su pronašle široku primjenu u području biomedicine. Kako je poznato da posjeduju nisku citotoksičnost i dobru biokompatibilnost, kao takve zadovoljavaju osnovne preduvjete za *in vivo* snimanja stanica i tkiva (Naik i sur., 2022). Na taj način zamjenjuju klasične poluvodičke kvantne točke koje su zbog svojih intenzivnih i podesivih, fotoluminescentnih karakteristika dugi niz godina imale primjenu u biomedicinskom polju. Međutim, velik problem poluvodičkih kvantnih točaka bio je njihova toksičnost i upotreba teških metala prilikom njihove sinteze. Stoga se smatra da su klasične kvantne točke uspješno zamijenjene netoksičnim, ekološki i biološki prihvatljivim CQD.

Uz sve ranije navedeno, treba naglasiti kako svojstva CQD u određivanju svojstava pojedinih analita u dodiru s površinom pronalaze svoju primjenu u različitim poljima današnjeg djelovanja. Ovdje je najbitnije naglasiti primjenu CQD u biomedicini i razvoju analitičkih metoda.

2.5.1. Biološka aktivnost CQD

Primjena CQD u literaturi uglavnom se odnosi na razvoj analitičkih metoda detekcije različitih kemijskih vrsta ili na stanično oslikavanje tumorskih stanica. Međutim, mnoga istraživanja upućuju i na njihovo biološko djelovanje kao što je antimikrobno, antifungalno, antiviralno te antioksidacijska svojstva (Dong i sur., 2020; Xue i sur., 2022; Sachdev i Gopinath 2015; Ezati i sur., 2022a; Ezati i sur., 2022b). Kao dobar primjer se može navesti istraživanje Ezati i sur. (2022b) koji su sintetizirali CQD iz glukoze kao ugljikova prekursora, uz dopiranje borom (*B*-), sumporom (*S*-) te dušikom (*N*-). Pronađeno je da *B*-dopirane CQD i *S*-dopirane CQD pokazuju

izvrsnu antimikrobnu aktivnost na *Escherichia coli* (*E. coli*) i *Listeria monocytogenes* patogene. Nadalje, najbolja antimikrobna aktivnost na oba patogena pokazana je na uzorcima CQD dopiranim s dušikom (*N*-dopiranje), dok je izrazita učinkovitost pokazana i protiv *Ammophilus fumigatus*, *Penicillium citrinum*, *Candida albicans*, and *Rhodotorula rubra* mikroorganizama, iskazujući antifungalno djelovanje. Uzorak *S*-CQD pokazao je izvrstan inhibitorni učinak rasta gljivica *Fusarium solani*.

2.5.2. Farmakološka aktivnost i primjena CQD u teranostici

Farmakološka primjena CQD vezana je uz teranostiku (dijagnostika i terapija), kao antitumorski agensi ili kao fluorescentni markeri tumorskih stanica u staničnom oslikavanju te u dostavi lijekova u terapiji (Dugam i sur., 2021). Posebno je važno naglasiti da je u staničnom oslikavanju važno koristiti izvor zračenja niskog intenziteta i energije kako ne bi došlo do induciranja oksidativnog stresa i mogućih oštećenja stanica. Potencijalno objašnjenje leži u tome da se uslijed interakcije sa zračenjem, temperatura sustava povisuje te mogu nastati reaktivne kemijske vrste (uslijed induciranja lančanih kemijskih reakcija). Ukoliko se ovi ključni uvjeti zadovolje, postoji veliki potencijal primjene ovakvih nanomaterijala i u *in vivo* istraživanjima. Obzirom na navedeno, danas se istraživanja uglavnom temelje na pronalasku CQD s emisijom u crvenom ili NIR području (Li i sur., 2021). Zapravo je pretpostavka da se farmakološki (antitumorski) ili biološki (antimikrobni, antifungalni, antiviralni) učinak CQD uslijed interakcije zračenja iz UV ili NIR područja ostvaruje putem snažnog fotodinamičkog učinka (djeluju kao fotosenzibilizatori) kojim se mogu proizvesti citotoksične reaktivne kisikove jedinke (engl. *Reactive Oxygen Species*; ROS) inducirajući staničnu smrt (apoptoza ili nekroza) (Dong i sur., 2020; Lam i sur., 2020).

Jedan od zanimljivih primjera u kojem su CQD pronašle primjenu s potencijalnim antitumorskim učinkom je studija D'souza i sur. (2018) koji su pripremili CQD iz usitnjene povrtne mrkve hidrotermalnom sintezom pri uvjetima od 170 °C kroz 12 sati. Nakon pročišćavanja uzorka, pripremio se hibridni uzorak mitomicin-CQD s ciljem lakše dostave lijeka u MCF-7 tumorske stanice. Čisti uzorak CQD iskazao je izrazitu biokompatibilnost s preživljavanjem stanica od 81 % pri vrlo visokim koncentracijama od 1000 μg/mL, dok je hibridni uzorak mitomicin-CQD pokazao značajan citotoksični učinak na tumorske stanične linije MCF-7. U istraživanju Šafranko i sur. (2021b) temeljenom na sintezi CQD iz kore klementine i aminokiselina Gly i Arg, ustanovljen je specifični antitumorski učinak na stanične linije raka gušterače (CFPAC-1) s CQD@Gly (IC_{50} = 6.91 ± 0.81 μg/mL), dok CQD@Arg nije pokazao citotoksičan učinak niti na jednu od testiranih staničnih linija: HepG2, MCF-7, HCT-116 i CFPAC-1 čime se pokazala dobra biokompatibilnost za stanično oslikavanje tumorskih

stanica MCF-7. Kompozit CQD i aktivnog metabolita irinotekana (CTP-11, kemoterapeutskog lijeka protiv kolorektalnog karcinoma) 7-etil-10-hidroksi-kamptotecin (SN-38), pripremljen je od strane skupine znanstvenika Mattinzoli i sur. (2022). Aktivni metabolit SN-38 ima veću aktivnost od irinotekana, no najveći problem stvara njegova hidrofobnost i slaba topljivost u vodi, u većini fiziološki kompatibilnih i farmaceutski prihvatljivih otapala čime je ograničena primjena metabolita SN-38 u biološkim sustavima (Atyabi i sur., 2009). Istraživanje je pokazalo da kovalentnim vezanjem CQD i SN-38 nastaje hibridni kompozit CD-SN38 koji omogućuje olakšano penetriranje u tumorske stanice i kontrolirano otpuštanje lijeka u ciljanu metu stanica kolorektalnog karcinoma.

2.5.3. Primjena CQD u detekciji metalnih iona

Tijekom razvoja novih analitičkih metoda, uvijek je važno uzeti u obzir da razvijene metode budu jednostavne za provedbu, precizne, ekonomski pristupačne te visoke osjetljivosti. Jasno je kako standardne metode za detekciju kemijskih analita podrazumijevaju skup složenih i vremenski kompleksnih radnji i preduvjeta, a ponekad i posebne uvjete rada. Razvoj novih detekcijskih tehnika uključuje širi spektar različitih metoda poput elektrokemijskih, fluorescentnih i kemiluminescentnih tehnika s posebnim naglasakom na novije fluorescentne metode uz uporabu CQD kao fluorescentnih nanoprobi (Kang i sur., 2020).

Fluorescentne CQD korištene su kao nanoprobe za detekciju metalnih iona, kemijskih vrsta i bioloških molekula i to sve na temelju stupnja osjetljivosti i selektivnosti CQD na pojedinu supstancu. Materijal podvrgnut analizi stupa u interakciju s površinom CQD, a sam proces interakcije opisuje se prijenosom elektrona i naboja, rezonantnim prijenosom energije ili efektom unutarnjeg filtera (engl. *inner filter effect*) koji uzrokuje varijacije u svojstvima fotoluminescencije. Treba naglasiti kako funkcijske skupine na površini CQD stupaju u interakciju s analitima poput metalnih iona (Fe^{3+}, As^{3+}, Cr^{3+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Ag^{+}, Hg^{2+}, Sn^{2+}, Pb^{2+}, Mg^{2+}, K^{+}, Ca^{2+}, Na^{+}, Al^{3+}, Mn^{2+}) te bioloških spojeva poput vitamina B12, glukoze, galaktoze, L-cisteina, itd (Li i Zhu 2013; Gao i sur., 2016; Ji i sur., 2020; Kour i sur., 2020; Šafranko i sur., 2021a; Batool i sur., 2022).

Upotrebom CQD u obliku fluorescentnih nanoprobi prilikom detekcije metalnih iona, najčešće se detektiraju ioni željeza u obliku Fe^{3+} iona. Željezo se svrstava u esencijalne elemente te kao takve, smatramo ih neophodne za normalnu funkciju organizama. Željezo nalazimo u biološkim sustavima kao sastavni dio hemoglobina, mioglobina te brojnih drugih enzima koji sudjeluju u pospješivanju pravilnog rada i funkcije sustava, no s druge strane, manjak istog ili pak prekomjerno nakupljanje dovodi do različitih poremećaja i pojave bolesti poput anemije,

otkazivanja organa, upala, Alzheimerove i Parkinsonove bolesti, pa čak i do smrti (Goswami i sur., 2002; Chung i sur., 2018).

Iz svega navedenog, može se zaključiti kako je razvoj ovakvog sustava, odnosno nanoprobe od velike važnosti za primjenu u biomedicini. Ono što je važno naglasiti kada se govori o koordinaciji (keliranju) željeza s funkcijskim skupinama površine CQD jest da iste imaju najveći afinitet vezanja (Fe^{3+}) iona kroz različite fragmente prisutnih na površini čestica u obliku karboksilnih, hidroksilnih i amino skupina. U **Tablici 4** prikazan je sumirani pregled literature dosadašnjih istraživanja primjene CQD u detekciji Fe^{3+} iona (u razdoblju od 2016. do 2022. godine).

Tablica 4. Literaturni pregled istraživanja detekcije Fe^{3+} iona s CQD u razdoblju od 2016. – 2022. godine.

CQD nanoprobe	Tip CQD	QY (%)	$\lambda_{EX}/\lambda_{EMmax}$	Linearni raspon	LOD	Referenca
CQD/ostatak riže-lizin	*N*-CQD	23,48 %	360/440 nm	3,32-32,26 μM	0,7462 μM	Qi i sur., 2019
CQD/trinatrijev citrat-fosforna kiselina	*P*-CQD	16,1 %	310/440 nm	0,02-3 μM	9,5 nM	Kalaiyarasan i sur., 2020
CQD iz šarenog graha	Čiste CQD	10,85 %	380/450 nm	30-600 μM	9,55 μM	Zulfajri i sur., 2019
CQD iz cvijeta magnolije	*N*-CQD	8,13 %	350/435 nm	0,2-100 μM	0,073 μM	Wang i sur., 2020
CQD/karboksimetilceluloza-LPEI[1]	*N*-CQD	44,0 %	350/465,5 ± 3 nm	1-400 μM	0,14 μM	Issa i sur., 2020
CQD/celulozna vlakna – sumporna kiselina	*S*-CQD	32,0 %	360/435 nm	25–250 μM	0,96 μM	Yang i sur., 2016
CQD iz *Fusobacterium nucleatum*	*N*-CQD	9,99 %	360/450 nm	20-180 μM	0,82 μM	Liu et al., 2021
CQD/glutaminska kiselina - EDA[2]	*N*-CQD	12,45 %	360/459 nm	8-80 μM	3,8 μM	Chen i sur., 2020
CQD/fenilalanin-limunska kiselina	*N*-CQD	ND[3]	335/440 nm	5-500 μM	0,720 μM	Pu i sur., 2020
CQD/trinatrijev citrat-urea-borna kiselina	*B*,*N*-ko-dopirane CQD	70,0 %	340/450 nm	0-100 μM	80,0 ± 0,5 nM	Mohammed i Omer, 2020
CQD/glutaminska kiselina	*N*-CQD	17,8 %	370/440 nm	0-50 μM	4,67 μM	Yu i sur., 2016
CQD/EDA-mikrokristalna celuloza	*N*-CQD	51,0 %	360/436 nm	10-240 μM	0,21 nM	Wu i sur., 2017a
CQD/limunska kiselina-L-cistein	*N*,*S*-ko-dopirane CQD	69,0 %	345/415 nm	1–500 μM	0,014 μM	Wu i sur., 2017b
CQD/pepeo biomase-EDA	*N*-CQD	26,1 %	340/420 nm	0,06–1400 μM	60 nM	Deng i sur., 2018
CQD/sok lubenice-etanol	*N*-CQD	10,6 %	355/439 nm	0–300 μM	0,16 μM	Lu i sur., 2018
CQD/žižula voće	*N*-CQD	ND[3]	370/440 nm	0–200 μM	ND[3]	Kim i Kim 2018
CQD/lignin u DES[4] (betain i mliječna kiselina)	*N*-CQD	7,95 %	300/400 nm	0–500 μM	0,44 μM	Jiang i sur., 2018

Nastavak **Tablice 4**						
CQD/glukoza-amonijak-fosforna kiselina	*N,P*-ko-dopirane CQD	30,0 %	336/437 nm	5-100 nM	1,8 nM	Shi i sur., 2016
CQD/vinska kiselina-L-arginin	*N*-CQD	8,3 %	350/425 nm	0-70 μM	0,50 μM	Zhu i sur., 2020
CQD/*Borassus flabellifer*	*N*-CQD	19,4 %	310/395 nm	10–100 μM	2,10 μM	Nagaraj i sur., 2022
CQD/limunska kiselina-tiourea	*N,S*-ko-dopirane CQD	53,80 %	360/450 nm	0–100 μM	0,20 μM	Zhou i sur., 2022

[1] LPEI - polietilenimin, [2] EDA - etilendiamin, [3] ND – nema dostupnih podataka, [4] DES-eutektička otapala

2.6. OPTIMIRANJE PROCESA U TEHNOLOGIJI CQD

U svakom istraživanju najvažnije je planiranje eksperimenata, organizacija rada i podataka. To često zahtijeva složena računanja koja su vremenski zahtjevna te je uporaba računala i statističkih alata neophodna kako bi se više različitih operacija provodilo simultano i bez rizika potkradanja pogreške. Na procese, i u prehrambenoj i u kemijskoj industriji, može se utjecati varijacijama procesnih parametara i na taj način ih ili ispitati ili unaprijediti (Politis i sur., 2017). Kontroliranjem uvjeta procesa ili reakcije moguće je kontrolirati i pratiti kvalitetu proizvoda, mehanizme reakcije te maksimalan ili minimalni udio pojedine komponente (Sahu i Andhare 2018). Da bi se odredili značajni parametri u određenom procesu, potrebno je posegnuti ka vrlo složenim matematičkim i statističkim alatima kako bi se kroz analizu podataka dobio stvaran uvid u značajnost parametara u procesu (Bezerra i sur., 2008; Bahraminasab i sur., 2017; Lee 2019). Tehnika dizajniranje eksperimenata (engl. *Design of Experiments*; DOE) omogućuje relativno brzo ispitivanje utjecaja pojedinih parametara ili njihovih interakcija na željeni odziv (engl. *Response*) kojeg se promatra (Myers i sur., 2016; Sahu i Andhare 2018; Jankovic i sur., 2021). Da bi se odabrao odgovarajući dizajn eksperimenata, potrebno je unaprijed znati cilj i svrhu provođenja eksperimenata te se najčešće koriste ili faktorski plan ili metoda odzivnih površina (engl. *Response Surface Methodology*; RSM) (Myers i sur., 2016).

Upravo jedna od najpopularnijih tehnika koja se koristi za optimiranje procesa jest RSM metoda. Nakon predstavljanja metode RSM od strane znanstvenika George E. P. Box sa suradnicima 1951. godine, RSM postaje neizostavan alat gotovo u svakom istraživanju koje uključuje praćenje utjecaja procesnih parametara na određeni odziv procesa (Box i Wilson 1992). RSM se najčešće definira kao skup statističkih i matematičkih metoda u svrhu modeliranja polinomskih modela i početnih podataka koji moraju prikazati ponašanje skupa podataka u svrhu izrade statističkih predviđanja (Bezerra i sur., 2008; Myers i sur., 2016). Početni korak dizajna eksperimenata uključuje postavljanje eksperimentalne matrice koja predstavlja kombinaciju procesnih parametara i njihovih uvjeta te predviđeni prostor za upis rezultata eksperimenta kao funkcije odziva. Procesni parametri koji se variraju i koji imaju

utjecaj na proces nazivaju se nezavisni parametri (*X*), dok promatrani odziv (*y*) predstavlja zavisnu varijablu. Odabir između dvije najčešće korištene metode, Box-Behnken (engl. *Box-Behnken design*; BBD) plana i centralno-kompozitnog plana (*Central composite rotable design*; CCD) pokusa, ovisit će o minimalnom broju promatranih faktora eksperimenta. Razlike između faktorskog dizajna i RSM jest da algoritam faktorskog dizajna koristi sve kombinacije ispitivanih procesnih parametara, dok se u RSM-u koristi određene razine (Goos i Jones 2011). Dok CCD pripada skupini nefaktorskih planova eksperimenata u kojem svaki od faktora varira na pet razina (-α, -1, 0, +1, +α), BBD se može smatrati rotatabilnim i koristi se po tri razine svakog faktora (-1, 0 ,+1) (Kumari i Gupta 2019; Risawanto i sur., 2019). Ovisno o kompleksnosti procesa, analizom će se ponuditi odabir funkcije prvog ili drugog reda. Ako se radi o linearnoj funkciji, jednadžba modela (1) će biti oblika:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \cdots \beta_i x_i + \varepsilon \quad (1)$$

Nadalje, jednadžba (2) modela funkcije drugog reda glasi:

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^{k} \beta_j X_j + \sum_{j=1}^{k} \beta_{jj} X_j^2 + \sum \sum_{i<j} \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

gdje sljedeće oznake predstavljaju: *y* – promatrani odziv; β_0 – konstanta jednadžbe odzivnog polinoma; β_j – koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma; β_{jj} – koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma; β_{ij} – koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma; X_i i X_j – kodirane nezavisne varijable (Baş i Boyaci, 2007).

Da bi se dobili koeficijenti jednadžbe modela, potrebno je odraditi ponavljanja eksperimenta u zadanim (centralnim) točkama dizajna te provesti složene matematičke kalkulacije analize varijance (engl. *Analysis of Variance;* ANOVA). Statistička značajnost razvijenog modela se procjenjuje na temelju statističkih parametara poput korelacije podataka, *p*-vrijednosti, F-vrijednosti, reziduala, normalne raspodjele, koeficijenta determinacije (R^2) i drugih (Myers i sur., 2016). Ukoliko je ispitani model značajan, pomoću 2D i/ili 3D dijagrama može se grafički interpretirati utjecaj pojedinog i/ili interakcije procesnih parametara. Optimiranje procesa, ovisno o predviđenom smjeru, daje informacije pri kojim uvjetima se može dobiti željeni odziv procesa. Rad s RSM metodom ima i svoje nedostatke, a jedno od čestih nedostataka je dobivanje optimalnih uvjeta unutar gornje i/ili donje granice postavljenih uvjeta što povećava nepouzdanost predviđanja s razvijenim modelom (Djimtoingar i sur., 2022). Drugi potencijalni problem predstavlja da testiranje sustava koji se ispituje nije u potpunosti poznat te to često može rezultirati dobivanjem podataka koji nisu točni niti pouzdani. Ovakva situacija je ponekad

neizbježna i rješenje problema nije odmah vidljivo ili zbog nedovoljnog iskustva tehnologa koji se bavi problematikom ili zbog krivo postavljenog dizajna eksperimenata.

Primjena RSM tehnike u tehnologiji CQD nije nepoznanica. Naime, skupina autora Dela Cruz i sur. (2019) pripremili su CQD iz poliuretana karbonizacijom uz H_2SO_4 kiselinu. Kako bi se dobile CQD dobrih fotoluminescentnih svojstava, provelo se optimiranje procesa prema BBD dizajnu. Kao nezavisne varijable koristila se koncentracija kiseline (X_1; 2,0 - 3,0 mol/dm^3), vrijeme reakcije (X_2; 2 – 6 sati) i temperatura (X_3; 200 – 300 °C), dok je promatrani odziv (zavisna varijabla) bio QY (y). Pri uvjetima koncentracije H_2SO_4 kiseline od 3,0 mol/dm^3, u vremenu od 6 sati i temperaturi od 200 °C, QY dobivenih CQD iznosio je QY = 33 %. Predviđeni podaci modela potvrđeni su i eksperimentalno, dok je primjena dobivenih CQD usmjerena ka detekciji Ag^+ iona u modelnom sustavu (LOD = 2,8 µmol/dm^3) i u realnom sustavu vode. Nadalje, autori Issa i sur. (2020) primijenili su CCD dizajn kako bi ispitali utjecaj temperature (X_1; 220 - 260 °C), vrijeme reakcije (X_2; 1 – 3 sata) i udio LPEI (X_3; 0,5 – 1,5 %; linearni polietilenimin) na odziv QY. Statistička analiza utjecaja parametara pokazala je da vrijeme reakcije ima najznačajniji utjecaj na odziv, u odnosu na temperaturu i na udio LPEI u reakciji. Reducirani kubični model (uz isključenje parametara koji nisu statistički značajni) dobiven je model s dobrim koeficijent determinacije od R^2 = 0,9993 i dobrim slaganjem eksperimentalnih i predviđenih vrijednosti. Optimalni uvjeti su određeni za QY = 44 % uz primjenu temperature od 260 °C, kroz vrijeme od 2 sata i LPEI udjelom od 1 %.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ove doktorske disertacije bio je:

- provesti kvalitativnu i kvantitativnu analizu vodenog ekstrakta kore klementine UHPLC-ESI-HRMS metodom kako bi se utvrdio kemijski sastav;
- pripraviti uzorke CQD hidrotermalnim tretiranjem – priprava modelnih CQD uzoraka iz limunske kiseline pri pH = 3 i pH = 7 te na temelju tih rezultata, pripraviti CQD uzorke na bazi kore klementine;
- odrediti parametar kvantnog prinosa i drugih optičkih svojstava dobivenih uzoraka kao što su: ovisnost valne duljine ekscitacije o intenzitetu fotoluminescencije, utjecaj ionske jakosti (NaCl) na intenzitet fotoluminescencije, utjecaj pH medija na intenzitet fotoluminescencije, ovisnost ζ-potencijala o pH suspenzije nanočestica, utjecaj otapala na fotoluminescenciju (Qi i sur., 2019);
- optimirati postupak dobivanja maksimalnog QY s hibridnim uzorkom kore klementine i limunske kiseline primjenom metode odzivnih površina korištenjem programa Design-Expert®, v.7. (Bas i Boyacı, 2007);
- uzorke najboljih karakteristika iz svake serije sinteze CQD okarakterizirati s obzirom na njihove fizikalno-kemijske i optičke karakteristike te s obzirom na potencijalnu biološku i farmakološku aktivnost;
- ispitati navedene uzorke na farmakološke i analitičke primjenjivosti: fluorescentna detekcija metalnih iona na spektrofluorimetru, određivanje antiradikalne aktivnosti pomoću standardne DPPH metode (metoda modificirana prema Sachdev i Gopinath 2015), odrediti biokompatibilnosti/citotoksičnosti uzoraka na različite stanične linije te ispitati protuupalni učinak na inhibiciju denaturacije proteina (modificirano prema Gambhire i sur., 2009; Gunathilake i sur., 2018);
- ispitati selektivnost detekcije na različite metalne ione te odrediti limit detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) za razvijenu metodu osjetljive i selektivne detekcije metalnih iona;
- uzorke CQD s najvišim određenim QY i selektivnim odzivom na Fe^{3+} ione dodatno ispitati na detekciju Fe^{3+} iona na realnim uzorcima bunarske vode.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Popis kemikalija i materijala

Kemikalije, standardi i otapala korišteni u eksperimentima su priznate analitičke čistoće te su vodene otopine reagensa pripremljene s ultračistom Milli-Q vodom (Millipore/Simplicity 185 sustav; provodnost ≤ 0,054 μS/cm). Kao prekursor ugljika u sintezama modelnih CQD korištena je limunska kiselina monohidrat (p.a. čistoće) proizvođača Gram Mol iz Hrvatske. Za sintezu modelnih CQD korištene su aminokiseline navedene u **Tablici 5**.

Tablica 5. Aminokiseline korištene za sintezu CQD.

Aminokiselina	Formula	Proizvođač
L-alanin (Ala); čistoće ≥ 98 %	$C_3H_7NO_2$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
L-arginin (Arg); p.a.	$C_6H_{14}N_4O_2$	Fluka-Garantie, Švicarska
L-asparagin (Asn); čistoće ≥ 98 %	$C_4H_8N_2O_3$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
L-fenilalanin (Phe); čistoće 99 %	$C_9H_{11}NO_2$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
L-glicin (Gly); čistoće min. 99,7 %	$C_2H_5NO_2$	Merck, Njemačka
L-glutamin (Gln); čistoće ≥ 99,5 %	$C_5H_{10}N_2O_3$	Kemika, Zagreb, Hrvatska
L-glutaminska kiselina (Glu); p.a.	$C_5H_9NO_4$	Kemika, Zagreb, Hrvatska
L-histidin (His); čistoće 99 %	$C_6H_9N_3O_2$	Acros Organics, Belgija
L-leucin (Leu); čistoće 99 %	$C_6H_{13}NO_2$	Merck, Njemačka
L-lizin (Lys); čistoće > 98 %	$C_6H_{14}N_2O_2$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
L-serin (Ser); čistoće 99 %	$C_3H_7NO_3$	Alfa Aesar, Njemačka
L-triptofan (Trp); čistoće 99 %	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	Acros Organics, Belgija

Nadalje, kako bi se ispitala selektivnost CQD na pojedine ione korištene su sljedeće kemikalije:

Željezov(III) klorid heksahidrat ($FeCl_3 \times 6H_2O$; Gram Mol, Hrvatska; p.a.), magnezijev(II) klorid heksahidrat ($MgCl_2 \times 6H_2O$; T.T.T., Hrvatska; p.a.), kalcijev(II) klorid dihidrat ($CaCl_2 \times 2H_2O$; BDH Prolabo, UK; ≥ 99 %), kalijev klorid (KCl, Gram Mol, Hrvatska; p.a.), natrijev klorid (NaCl; Gram Mol, Hrvatska; p.a.), bakrov(II) klorid dihidrat ($CuCl_2$ x $2H_2O$; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, SAD; ≥ 99,0 %), aluminijev(III) klorid heksahidrat ($AlCl_3$ x $6H_2O$; Brend Kraft, Njemačka; p.a.), živin(II) klorid ($HgCl_2$; VWR International, SAD; > 98 %) i manganov(II) klorid tetrahidrat ($MnCl_2$ x $4H_2O$; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, SAD; ≥ 98 %).

Standard kinin sulfat dihidrata ($C_{40}H_{54}N_4O_{10}S$; čistoće ≥ 99 %) kupljen je od proizvođača Acros Organic iz Belgije, dok je DPPH radikal (2,2′-difenil-1-pikrilhidrazil; ≥ 90 %) reagens kupljen od proizvođača Merck iz Njemačke. Također, ostale kemikalije i otapala kao što su etanol,

metanol, dimetil-sulfoksid (DMSO), aceton, sumporna kiselina, octena kiselina, klorovodična kiselina kupljene su također od proizvođača Merck (Njemačka), dok su peleti NaOH nabavljeni od proizvođača Gram Mol (Hrvatska). Sintetizirani uzorci CQD su pročišćeni od mogućih zaostataka soli postupkom dijalize na membranama za dijalizu Spectra/Por 7 (MWCO 1 kDa) kupljenih od proizvođača Spectrum Labs (Rancho Dominguez, CA, SAD).

U svrhe ispitivanja inhibicije denaturacije proteina korišteni su proteini bjelanjka kokošjeg jajeta (ovalbumin, liofilizirani prah, *Grade* V) i goveđi serumski albumin (frakcija V, za biokemiju) također nabavljenih od proizvođača Sigma-Aldrich (SAD).

Za potrebe ispitivanja potencijalne primjene CQD u realnim uzorcima korišteni su sljedeće uzorci:

- Uzorci bunarske vode (uzorci 16, 17, 18) ustupljeni su i analizirani od Hrvatskog veterinarskog instituta - Veterinarski zavod Vinkovci. Uzorci su prikupljeni s javnih bunara na području naselja Štitar i Spačva u mjesecu ožujku 2022. godine te je za potrebe validacije rezultata ovog istraživanja provedena standardna ISO procedura (HRN ISO 6332:1998 Kakvoća vode – Određivanje željeza – Spektrofotometrijska metoda s 1,10-fenantrolinom (ISO 6332:1988)) za određivanje koncentracije Fe^{3+} iona.

3.2.2. Biljni materijal – kora klementine

Kore klementine prikupljene su 2020. godine u studenom/prosincu s obiteljske farme Dalibor Ujević smještene u okolici Opuzena. Nakon što se kora odvojila od jestivog ploda, kore su prikupljene te isprane Milli-Q vodom kako bi se uklonile moguće kontaminacije iona prisutnih u tvrdoj vodi. Kore klementine su zatim zamrznute na – 80 °C za potrebe liofilizacije (engl. *freeze-drying*). Proces liofilizacije proveo se kroz 48 sati na instrumentu Martin Christ GmbH, tipa BETA I (Njemačka) te se osušena kora čuvala u zamrzivaču na – 18 °C sve do daljnje uporabe.

Liofilizirana kora je usitnjena u laboratorijskom mlinu (MRC Sample mill C-SM/450-C, Holon, Izrael) te je provedeno prosijavanje materijala standardnom serijom sita (Retsch AS 200, Njemačka) radi utvrđivanja raspodjele veličine čestica (veličina pora 600 μm). Tako usitnjen materijal kore klementine skladišten je na tamnom u hladnjaku pri +4 °C (do daljnjih analiza).

3.3. METODE

3.3.1. Sintetski postupak i pročišćavanje modelnih CQD

Sinteza modelnih CQD na bazi limunske kiseline provedena je hidrotermalnim postupkom na sljedeći način:

1) za sintezu CQD_{CA} (blank sustav) pripremljena je otopina limunske kiseline monohidrata (*m* = 1,025 g) u 20 mL Milli-Q vode. Nakon otapanja na ultrazvučnoj kupelji (Elma, Elmasonic P 70 H, Singen, Njemačka; *f*=37 Hz, *P*=50 W), otopina je prebačena u posudicu za digestiju kiselina (teflonska posudica od 45 mL i baza od nehrđajućeg čelika; Parr Instrument Company, Moline, IL, SAD) te se hidrotermalno tretirala pri temperaturi od 180 °C tijekom 9 sati. Nakon hlađenja, uzorak CQD je skladišten u plastičnoj epruveti od 50 mL na tamnom u hladnjaku pri +4 °C sve do daljnje uporabe. Sljedeći korak bio je centrifugiranje uzorka pri ~13200 x g tijekom 25 min u svrhu uklanjanja nečistoća, nakon čega je uslijedilo filtriranje supernatanta kroz filter špricu veličine pora od 0,2 µm (Najlon filter; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD) uz pročišćavanje uzorka CQD dijalizom. Uzorak CQD je prenesen u membranu za dijalizu (Spectra/Por 7 MWCO 1kDa; Spectrum Labs, Rancho Dominguez, CA, SAD) koja je zatim postavljeno u Milli-Q vodu (volumni omjer 1:100 uzorak:voda). Nakon prva 2 sata, provedena je zamjena Milli-Q vode, te je proces dijalize nastavljen do ukupnog vremena od 24 sata. Po završetku dijalize, pročišćeni uzorak CQD je skladišten na tamnom i hladnom +4 °C do daljnje uporabe.

2) za sintezu modelnih *N*-dopiranih CQD (CQD_{CA+AA}) reakcijska smjesa se sastojala od 850 mg limunske kiseline monohidrata i 175 mg određene aminokiseline (L-alanin, L-arginin, L-asparagin, L-fenilalanin, L-glicin, L-glutamin, L-glutaminska kiselina, L-histidin, L-leucin, L-lizin i L-serin). Limunska kiselina je otopljena u 15 mL Milli-Q vode, a aminokiseline u 5 mL Milli-Q vode. Nakon što su se obje otopine priredile, pomiješane su do ukupnog volumena od 20 mL te je reakcijska smjesa prebačena u teflonsku posudicu za digestiju kiselina. Hidrotermalna sinteza provela se pri temperaturi od 180 °C kroz 9 sati. Postupak pročišćavanja i skladištenja dobivenih modelnih CQD bio je kao i u prethodnom koraku.

3.3.2. Sintetski postupak i pročišćavanje dobivenih CQD na bazi kore klementine

Prije provedbe sintetskog postupka CQD, bilo je potrebno adekvatno pripremiti biljni materijal za tretiranje kao što je opisano u sekciji **3.2.2. Biljni materijal – kora klementine**.

Za potrebe priprave CQD na bazi kore klementine, pripremljen je vodeni ekstrakt u kruto-tekuće omjeru 1:30 (3 g liofilizirane kore klementine suspendirano je u 90 mL Milli-Q vode) koji se tretirao ultrazvučno kroz 30 min (Elma, Elmasonic P 70 H, Singen, Njemačka; *f*=37 Hz, *P*=50 W). Nakon završene ekstrakcije, uzorak je profiltriran kako bi se uklonio kruti dio uzorka, a za potrebe sinteze korišten je filtrat ekstrakta kore klementine. Za svaku seriju sinteze korišteno je 15 mL vodenog ekstrakta za dobivanje sljedećih uzoraka:

1) za sintezu uzorka CQD_{KK} (blank sustav) na bazi kore klementine, otpipetirano je sveukupno 15 mL ekstrakta kore klementine uz dodatak 5 mL Milli-Q vode za svekupni volumen smjese od 20 mL koja je zatim prebačena u teflonsku posudicu za digestiju kiselina. Hidrotermalna sinteza provela se pri temperaturi od 180 °C kroz 9 sati. Postupak pročišćavanja CQD je bio isti kao i za modelni sustav CQD uz iznimku potrebnog vremena za postupak provedbe dijalize uzorka. Naime, vremenski period (48 sati) potreban za detaljno i adekvatno pročišćavanje CQD_{KK} uzorka postupkom dijalize utvrdio se HPLC-DAD tehnikom u preliminarnim rezultatima te su saznanja sumirana u znanstvenom radu Šafranko i sur. (2021b) i primijenjena u ovoj doktorskoj disertaciji.

2) sinteza *N*-dopiranih CQD na bazi kore klementine provedena je miješanjem 15 mL vodenog ekstrakta kore klementine i 5 mL otopine odgovarajuće aminokiseline: leucin (Leu, *M* = 131,17 g/mol), triptofan (Trp, *M* = 204,23 g/mol), arginin (Arg, *M* = 174,20 g/mol), alanin (Ala, *M* = 89,09 g/mol) i histidin (His, *M* = 155,15 g/mol). Odabir navedenih aminokiselina temeljen je na rezultatima određivanja najvećeg QY modelnih sustava CQD. Hidrotermalni postupak, pročišćavanje i skladištenje uzoraka CQD je provedeno kako je to prethodno opisano u potpoglavlju **3.3.1. Sintetski postupak i pročišćavanje modelnih CQD**.

3.3.3. Kvalitativno i kvantitativno određivanje komponenti u kori klementine tehnikom UHPLC-ESI-HRMS

UHPLC-HRMS analize provedene su na ExionLC AD sustavu tekućinske kromatografije (AB Sciex, Concord, Kanada) opremljenim ExionLC AD automatskim uzorkivačem, pumpom, odplinjivačem, pećnicom za kolonu i upravljačem u kombinaciji s TripleTOF 6600+ (AB Sciex, Concord, Kanada) hibridnim spektrometrom masa kvadrupol-vrijeme preleta (engl. *quadrupole time of flight*, Q-TOF) koji sadrži ionski izvor *Duospray*. Kromatografsko odvajanje spojeva odvijalo se na analitičkoj koloni InfinityLab Poroshell 120 PFP dimenzija 2,1 x 100 mm, 1,9 µm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD). Pokretne faze bile su voda (A) i acetonitril (B) s brzinom protoka postavljenom na 0,4 mL/min. Temperatura kolone bila je 30 °C, a volumen injektiranja 4 µL. Za detekciju iona korištena je negativna elektrosprej ionizacija (ESI-). MS/MS

spektri masa dobiveni su disocijacijom izazvanom sudarima (engl. *Collision-Induced Dissociation*, CID) u podatkovno neovisnoj akviziciji (engl. *Information-Dependent Acquisition, IDA*). Za prikupljanje MS/MS spektara masa korišteni su ioni prekursori s intenzitetom signala iznad praga od 200 cps. Maksimalan broj iona prekursora koji su istovremeno bili podvrgnuti CID-u bio je 15. Parametri izvora iona bili su: ESI kapilarni napon 4,5 kV i temperatura izvora 300 °C, tlak plina za raspršivanje (zrak, plin 1) 40 psi, tlak plina grijača (zrak, plin 2) 15 psi, tlak plinske zavjese (dušik) 30 psi. Parametri snimljenog spektra masa bili su: potencijal deklasterizacije od 80 V, raspon *m*/*z* 40-1000 (MS) i 20-1000 (MS/MS) i vrijeme akumuliranja 100 ms. Kolizijski plin je bio dušik s energijom sudara od 40 eV i rasponom od 20 eV. Kalibracije skale masa (MS i MS/MS) obavljene su prije svakog izvođenja s kalibracijskom otopinom za ESI^- (ESI Negative Calibration Solution 5600, AB Sciex, Concord, Kanada). Podaci su obrađeni u programu ACD/Spectrus Procesor 2021.1.0 (ACD/Labs, Toronto, Kanada). Elementarni sastav spojeva određen je na temelju točnih masa odgovarajućih protoniranih molekula, njihovih izotopskih distribucija i iona produkata *m*/*z* u MS/MS spektrima. Identifikacija detektiranih komponenti provedena je na temelju njihovog elementarnog sastava, spektra masa i pretraživanja u ChemSpider bazi podataka. Odabir između predloženih rezultata temeljio se na podudaranju s MS/MS podacima. Analiza je provedena na Kemijsko-tehnološkom fakultetu u Splitu, Sveučilišta u Splitu.

3.3.4. Sinteza hibridnog uzorka i optimiranje procesa RSM metodom

Kako bi se poboljšala optička i kemijska svojstva te bioaktivnost CQD na bazi biomase kore klementine, istraživanje se dodatno produbilo dodatkom odgovarajuće količine limunske kiseline u vodeni ekstrakt kore klementine. Takav je uzorak dalje kroz rad označen kao $CQD_{CA+KK+Leu}$. Nakon predoptimiranja koje je uključivalo varijacije u parametrima mase dodane limunske kiseline (250 ili 500 mg) te odabiru odgovarajuće aminokiseline (leucin ili arginin; *m*(aminokiselina) = 175 mg), RSM metodom i dizajnom eksperimenata (plošno centralno kompozitni plan pokusa; CCF dizajn) provedeno je sveukupno 11 eksperimenata. U eksperimentu su promatrane dvije nezavisne varijable: X_1: temperatura (160 – 200 °C) i X_2: vrijeme sinteze (9 – 12 sati), dok je zavisna varijabla ili odziv predstavljao y_1: QY (%).

Procedura priprave $CQD_{CA+KK+Leu}$ uzorka uključivala je dodatak određene količine limunske kiseline u 15 mL vodenog ekstrakta kore klementine, dok se 5 mL vodene otopine aminokiseline (leucina ili arginina) naknadno dodalo kako bi se pripremila reakcijska smjesa. Predoptimiranje je provedeno za sinteze CQD pri temperaturi od 180 °C i vremenu od 9 sati kako bi se utvrdili odgovarajući uvjeti za najveće povećanje QY uzoraka. Nakon odabira odgovarajuće mase limunske kiseline i aminokiseline koja je doprinijela najvećem povećanju

QY, provedeno je ispitivanje CCF dizajna eksperimenta prema zadanim uvjetima koji su prethodno navedeni.

Procjena koeficijenata modela regresijskom analizom, analiza statističke značajnosti (ANOVA) ispitivanih parametra na odziv QY te numerička i grafička optimizacija ispitivanih procesnih parametra provedena je primjenom softverskog paketa Design-Expert®, v.7 (Stat Ease, Minneapolis, USA). Test statističkih razlika temeljio se na ukupnim kriterijima pogreške s razinom pouzdanosti od 95,0 %.

U konačnici, adekvatnost modela pokazana je i utvrđena koeficijentom determinacije (R^2), *p*-vrijednostima za model i nedostatkom modela (engl. *lack of fit*). Na temelju dobivenih matematičkih modela (polinoma) kreirane su 3D odzivne površine koje omogućavaju vizualni prikaz utjecaja pojedinih parametara i/ili njihovih interakcija na promatrane odzive, u ovom slučaju QY. Kao zadnji korak u RSM metodi provedeno je numeričko i grafičko optimiranje procesa prema ukupnoj željenoj funkciji D (Derringer i Suich 1980; Myers i sur., 2016).

Uzorak s najvećim QY nakon provedbe RSM analize detaljno se analizirao obzirom na kemijske, strukturne i optičke karakteristike, provelo se ispitivanje biološke i farmakaloške aktivnosti te se ispitao odziv nanoprobe $CQD_{CA+KK+Leu}$ na prisutnost pojedinih metalnih iona.

3.3.5. Spektrofotometrijske i spektrofluorimetrijske metode

3.3.5.1. Optička karakterizacija sintetiziranih uzoraka CQD

Određivanje QY na svim pripavljenim uzorcima CQD provedeno je prema metodi opisanim u radovima Alam i sur. (2015) i Šafranko i sur. (2021b). Ukratko, priređena su serijska razrijeđenja uzoraka CQD te im je izmjerena absorbancija na UV-Vis apsorpcijskom spektrofotometru uniSPEC 2 (LLG Labware, Češka Republika). Fotoluminescencijska mjerenja na uzorcima CQD provedena su na instrumentu Cary Eclipse fluorescencijskom spektrofotometru (Varian Inc. Santa Clara, CA, SAD). Kao referentni uzorak koristila se zakiseljena otopina kinin sulfata (γ = 100 µg/mL u 0,1 M vodenoj otopini H_2SO_4) kojemu pri zadanim uvjetima i valnoj duljini od 360 nm QY iznosi 54 % (Alam i sur. 2015; Bano i sur., 2018). Nakon izračuna integriranog intenziteta fotoluminescencije (računanjem površine ispod krivulje) i konstruiranja kalibracijske krivulje ispitivanih uzoraka i kinin sulfata, QY za ispitivane uzorke je izračunat prema sljedećoj jednadžbi (3):

$$QY_{CQD} = QY_{QS}\left[\frac{I_{CQD}}{A_{CQD}}\right]\left[\frac{A_{QS}}{I_{QS}}\right]\left[\frac{\eta^2_{CQD}}{\eta^2_{QS}}\right] \quad (3)$$

gdje sljedeći simboli označavaju: *QY* – kvantni prinos; *I* – integrirani intenzitet fotoluminescencije pri valnoj duljini ekscitacije λ = 360 nm; *A* – absorbancija pri valnoj duljini ekscitacije; η – indeks loma (za vodene otopine iznosi 1,33) (Alam i sur. 2015; Bano i sur., 2018). Oznaka „*CQD*“ odnosi se na parametre vezano za uzorak ugljikovih kvantnih točaka, dok „*QS*“ na referent kinin sulfata.

Kako bi se reducirao učinak reapsorpcije, vrijednosti optičke apsorpcije su održane na vrijednostima <0,1.

Nakon određivanja QY, ispitivanja fotoluminescencijskih karakteristika pripremljenih CQD uzoraka provela su se također na Cary Eclipse fluorescencijskom spektrofotometru (Varian Inc. Santa Clara, CA, SAD) što je uključivalo mjerenje ovisnosti valne duljine emisije o valnoj duljini ekscitacije, određivanje maksimuma emisije ovisno o valnoj duljini ekscitacije, utjecaj pH vrijednosti medija na intenzitet fotoluminescencije, utjecaj koncentracije NaCl u mediju na promjenu intenziteta fotoluminescencije te utjecaj otapala (aceton, DMSO, etanol, metanol) na intenzitet fotoluminescencije. Dodatna optička mjerenja provedena su na UV-Vis apsorpcijskom spektrofotometru uniSPEC 2 (LLG Labware, Češka Republika) kako bi se utvrdila priroda elektronskih prijelaza u UV i Vis području.

Za određivanje optičkih karakteristika koristili su se retentati s vrijednosti apsorpcije <0,1, dok je za potrebe mjerenja utjecaja koncentracije NaCl u mediju i utjecaja različitih otapala (aceton, DMSO, etanol, metanol) na intenzitet fotoluminescencije, vodena suspenzija CQD otparena na vakuumskom koncentratoru, SpeedVac-u (Savant™ SpeedVac™, Thermo Fisher Scientific, SAD) do konstantne mase.

Analiza utjecaja koncentracije NaCl u mediju na promjenu intenziteta fotoluminescencije CQD provodila se kako bi se utvrdio učinak visoke ionske jakosti na optička svojstva čestica te kako bi se pokazala kemijska stabilnost nanočestica. Eksperimenti su se provodili nakon što se uzorak podijelio u 6 različitih plastičnih epruveta od 15 mL te su se uzorci otparili na SpeedVac-u. Tijekom otparavanja, pripremljena je 1 mol/dm^3 vodena otopina NaCl koja je služila za pripravu serija uzoraka CQD u NaCl mediju u rasponu koncentracija od 0,1 mol/dm^3 do 1 mol/dm^3. Serija uzoraka se mjerila pri određenoj valnoj duljini λ_{EXmax} te se rezultat prikazao grafički kao omjer intenziteta ispitivanog uzorka *I* i intenziteta uzorka bez dodatka NaCl označen kao I_0.

Ispitivanje utjecaja otapala na promjenu intenziteta fotoluminescencije provelo se na način da se otpareni uzorak suspendirao u odgovarajućem otapalu volumena 2 mL: etanolu, metanolu, acetonu i DMSO. Mjerenje intenziteta fotoluminescencije provelo se pri valnoj duljini λ_{EXmax}, dok se rezultat prikazao kao omjer I/I_0.

3.3.6. Fizikalno-kemijska karakterizacija dobivenih uzoraka CQD

3.3.6.1. Određivanje kemijskog sastava EDS metodom

Kemijski sastav i udio dušika u CQD uzorcima određen je primjenom skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM; Tescan Vega3 LMU, Fuveau, Francuska) s detektorom X-zraka za elementarnu analizu (EDS; Quantax EDS, Bruker, Washington DC, USA). Uzorci CQD za analizu pripremljeni su dokapavanjem 200 µL uzorka CQD na silicijski „*wafer*“ (podlogu) te su prije analize osušeni. Uzorak se sušio u sušioniku pri 40 °C kroz 5 min. Rezultati su prikazani tablično kao maseni i atomski udio pojedinog elementa u uzorku popraćene s EDS spektrima prisutnih elemenata C, O i N. Analiza je provedena na Institutu za fiziku u Zagrebu.

3.3.6.2. Ispitivanje disperzivnosti uzorka CQD

Kako bi se ispitao stupanj disperzivnosti i odredio stupanj čistoće uzoraka CQD, slijedio se sljedeći protokol (modificirano prema Kapusniak (Jochym) i sur., 2021) :

Sveukupno je 8 mL uzorka CQD otpipetirano kako bi se otparili na SpeedVac-u do konstantne mase te je izvagana količina uzorka suspendirana u 10 mL Milli-Q vode. Ukoliko je bilo potrebno, uzorak se ultrazvučno tretirao (Elma, Elmasonic P 70 H, Singen, Njemačka; *f*=37 Hz, *P*=50 W) kako bi se olakšalo suspendiranje uzorka u vodenom mediju. Sljedeći korak je bio centrifugiranje uzorka pri ~13200 x g kroz 15 min u svrhu uklanjanja nečistoća, nakon čega je odvojeno sveukupno 5 mL supernatanta, koji je potom otparavan do konstantne mase. Stupanj disperzivnosti CQD je izračunat prema sljedećoj jednadžbi:

$$L = \left(\frac{10}{5} \times \frac{b}{a}\right) \times 100 \qquad (4)$$

gdje *L* označava postotak disperzivnosti u vodenom mediju omjera alikvota i supernatanta, *a* označava masu uzorka, dok *b* predstavlja masu supernatanta.

3.3.6.3. Mjerenje zeta potencijala

Zeta potencijal (*ζ*-potencijal) vodenih suspenzija CQD određivao se metodom elektroforetskog raspršenja svjetlosti na instrumentu Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Površinski naboj čestica CQD (*ζ*-potencijal) određen je mjerenjem elektroforetske pokretiljivosti čestica primjenom jednadžbe Smoluchowskog (f(*κa*) = 1,5). Rezultati su obrađeni uz pomoć programskog paketa *Zetasizer software 7.13* (Malvern Instruments, Malvern, UK) te su prikazani kao srednje vrijednosti najmanje triju uzastopna mjerenja. Sva

mjerenja su provedena pri temperaturi od 25 °C. Mjerenja su provedena na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu (Zavod za fizičku kemiju, Laboratorij za biokoloide i površinsku kemiju).

3.3.7. Strukturna i morfološka karakterizacija CQD

3.3.7.1. Karakterizacija uzoraka CQD AFM metodom

Za vizualizaciju i karakterizaciju površina i određenih površinskih procesa koji se odvijaju na nanoskali primijenjena je mikroskopija atomskih sila (AFM). Snimke AFM dobivene su koristeći se instrumentom NanoWizard 4 AFM Ultra Speed proizvođača JPK (Berlin, Njemačka) u AC modu (engl. *Alternating Contact Mode*). Pretražne probe su nabavljene od Nano World (ARROW-NCR s radijusom zakrivljenosti vrha šiljka od < 10 nm, konstantom opruge od 42 N/m te rezonatnom frekvencijom od 285 kHz). Uzorci za analizu su pripremljeni dokapavanjem uzorka CQD na SiO_2 „*wafer*“. Analiza je provedena na Institutu za fiziku u Zagrebu.

3.3.7.2. Karakterizacija uzoraka CQD HR-TEM metodom

Morfologija nanočestica CQD analizirana je pomoću transmisijske elektronske mikroskopije visoke rezolucije (HR-TEM) na instrumentu FEI Tecnai G2 20 X Twin (FEI, Hillsboro, OR, SAD) pri akcelerirajućem naponu od 200 kV. Priprema uzorka za analizu uključivala je dokapavanje CQD vodene suspenzije na bakrenu mrežicu (engl. *grid*) presvučenu filmom ugljika (EMR Carbon support grids, Micro to Nano Ltd., Haarlem, The Netherlands). Uzorak se sušio u vakuum eksikatoru pri sobnoj temperaturi. Analiza je provedena na Faculty of Science and Informatics, Department of Applied and Environmental Chemistry (Sveučilište u Segedinu, Mađarska). Dio uzoraka je snimljen na instrumentu JEOL JEM 2200FS FEG HR (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) pri akcelerirajućem naponu od 200 kV (University of Bordeaux, Francuska).

3.3.7.3. Karakterizacija uzoraka CQD PXRD metodom

Pripremljeni uzorak praha CQD (otparen uzorak do suhoga na SpeedVac uređaju (Savant™ SpeedVac™, Thermo Fisher Scientific, SAD)) ispitao se na strukturalnu prirodu pomoću PXRD metode. Difraktogrami su snimljeni na instrumentu PANalytical Aeris Research Diffractometer u θ-θ geometriji (Malvern PANalytical, Malvern, UK) koristeći monokromatizirano CuKα rendgensko zračenje (λ = 1,5406 Å) pri 298 K. Mjerenja su provodena u rasponu kutova 2θ od 8 do 80 ° s korakom snimanja od 0,005 ° (25 sekundi po koraku, divergentni prorez (engl. *slit*) 1/2 °). Dobiveni difraktogram prikazao se grafički, dok je za dodatno razumijevanje

materijala izračunat parametar interplanarni razmak (engl. *d-spacing*). Analiza je provedena na Daegu Gyeongbuk Institute of Science & Technology (DGIST) u Južnoj Koreji.

3.3.7.4. Karakterizacija uzoraka CQD FTIR-ATR metodom

Usitnjeni prah CQD analizirao se FTIR-ATR metodom kako bi se potvrdila prisutnost funkcijskih skupina na površini nanočestica CQD. Snimanje IR spektara provedeno je u valnom području od 4000 do 600 cm^{-1} pomoću Cary 630 FTIR spektrometra (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD) pri spektralnoj rezoluciji od 4 cm^{-1}.

3.3.8. Ispitivanje biološke i farmakološke aktivnosti uzoraka

Biološka i farmakološka aktivnost uzoraka CQD podrazumijeva određivanje antiradikalne aktivnosti pomoću standardne DPPH metode kako bi se utvrdila antioksidacijska aktivnost uzoraka, određivanje biokompatibilnosti/citotoksičnosti uzoraka na različite stanične linije kako bi se potvrdila potencijalna primjena u biološkim sustavima te ispitivanje protuupalnog učinka na inhibiciju denaturacije proteina.

3.3.8.1. Određivanje antiradikalne aktivnosti

Antiradikalna aktivnost pripremljenih uzoraka CQD određena je metodom DPPH sukladno istraživanju Sachdev i Gopinath (2015) uz manje modifikacije. Uzorci CQD su otpareni na SpeedVac-u te im podešena masena koncentracija na γ = 120 µg/mL. Pripremanje reagensa za analizu uključivalo je pripremu svježe otopine DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; c(DPPH) = 50 µM) u metanolu. Zatim je pripremljen niz serijskih razrjeđenja uzoraka CQD u rasponu koncentracija od 0 – 100 µg/mL (0,2 mL) s naknadnim dodatkom 1 mL otopine DPPH u metanolu. Krajnji volumen smjese iznosio je 1,2 mL. Nakon dodatka DPPH, uzorci su inkubirani u tamnom tijekom 30 min prije mjerenja absorbancije. Konačno, mjerenja vrijednosti absorbancije provedena su na λ = 517 nm u tri paralele koristeći se UV-Vis spektrofotometar (uniSPEC 2; LLG Labware, Češka Republika). Antiradikalna aktivnost izračunata je prema jednadžbi (4):

$$\%\ DPPH_{aktivnost} = \frac{(A_{DPPH} + A_B) - A_S}{A_{DPPH}} \times 100 \qquad (4)$$

gdje A_{DPPH} predstavlja absorbanciju pripremljene DPPH otopine, A_B absorbanciju uzorka te A_S absorbanciju uzorka nakon dodatka pripremljene otopine DPPH.

Konačni rezultati prikazani su kao postotak (%) neutraliziranog DPPH radikala u ispitivanom koncentracijskom rasponu CQD.

3.3.8.2. Ispitivanje biokompatibilnosti/citotoksičnosti CQD uzoraka

Kako bi se utvrdila potencijalna primjena u biološkim sustavima, a posebice u svrhe primjene CQD kao fluorescentne boje u staničnom oslikavanju tumorskih stanica, bilo je potrebno odrediti biokompatibilnost uzoraka CQD na stanične linije. Ispitivanje biokompatibilnosti je provedeno prema sljedećem protokolu:

Stanice su nasađene na ploču s 96 jažica ravnog dna (Greiner, Frickenhausen, Austrija) u koncentraciji od 2 x 10^4 stanica/mL. Broj živih stanica određen je bojenjem stanica tripan plavilom prije svakog testa. Eksperimenti su uključivali ispitivanja na sljedećim staničnim linijama: HeLa (humane epitelne stanice adenokarcinoma vrata maternice), CaCo-2 (epitelne stanice humanog karcinoma debelog crijeva), NCI-H358 (epitelne humane stanice bronhioalveolarnog karcinoma) i D54 (humane stanične linije glioblastoma).

Stanice su inkubirane na 37 °C kroz 24 sata u CO_2 inkubatoru. Prvi dan testa stanice su tretirane s ispitivanim suspenzijama CQD (50, 100 i 200 ug/mL). Nakon 72 sata tretmana medij je uklonjen sa stanica i na stanice je dodano 5 mg/mL MTT (3-(4,5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin bromid) otopine. Nakon inkubacije od 4 sata na 37 °C MTT-formazan kristalići otopljeni su u DMSO-u. Intenzitet nastalog obojenja izmjeren je na ELISA čitaču mikroploča (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, SAD) na 595 nm. Svi eksperimenti izvedeni su tri puta u tri paralele. Ispitivanja na biološkim uzorcima provedena su na Medicinskom fakultetu u Osijeku, Sveučilišta u Osijeku.

3.3.8.3. Analiza inhibicije denaturacije proteina

Za određivanje inhibicije denaturacije proteina korištena su dva proteina: goveđi serumski albumin (engl. *Bovine Serum Albumin*; BSA) te albumin kokošjeg jajeta (ovalbumin).

1) Denaturacija proteina s BSA provedena je uz manje modifikacije prema radu autora Gambhire i sur., 2009 i Gunathilake i sur., 2018. Uzorak sveukupnog volumena od 5 mL se sastojao 0,2 mL 1 %-tne otopine BSA, 4,78 mL fosfatnog pufera s dodatkom soli pH = 6,4 (1X PBS (engl. *Phosphate Buffered Saline*)), i 0,02 mL suspenzije CQD u koncentracijskom rasponu od 50 µg/mL do 750 µg/mL. Nakon što je smjesa homogenizirana, postavljena je na inkubaciju pri 37 °C kroz 15 min, a zatim zagrijana na 70 °C kroz 5 min. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, turbiditet uzoraka je mjeren UV-Vis spektroskopom (uniSPEC 2; LLG Labware, Češka Republika) pri valnoj duljini λ = 660 nm. Krajnji rezultat, odnosno postotak inhibicije denaturacije proteina izračunat je prema jednadžbi (5):

$$\%\ inhibicije\ denaturacije\ proteina = 100\ \times \left(1 - \frac{A_2}{A_1}\right) \quad (5)$$

gdje A_1 označava izmjerenu absorbanciju kontrolnog uzorka (ibuprofen) i A_2 označava absorbanciju ispitivanog uzorka s CQD.

2) Analiza denaturacije proteina ovalbumina provedena je s manjim modifikacijama prema Ibrahim i sur. (2018) i Chandra i sur. (2012)) na sljedeći način: reakcijska smjesa od 5 mL pripravljena je uz dodatak 0,2 mL 5 %-tne otopine ovalbumina, 2,8 mL pufera PBS pH=6,4 (1X PBS, pH namješten HCl otopinom) i 2 mL uzorka CQD u koncentracijskom rasponu od 50 µg/mL do 750 µg/mL. Kao kontrolni uzorak koristio se ibuprofen istog koncentracijskog raspona kao i ispitivani uzorak. Uzorci su inkubirani pri 37 °C kroz 15 min te zatim pri 70 °C kroz 5 min. Nakon hlađenja, uzorcima je izmjerena absorbancija pri valnoj duljini λ = 660 nm. Postotak inhibicije denaturacije proteina ovalbumina uz prisutnost CQD izračunat je uporabom relacije (6):

$$\%\ inhibicije\ denaturacije\ proteina = 100\ \times \left(1 - \frac{A_2}{A_1}\right) \quad (6)$$

gdje A_1 označava izmjerenu absorbanciju kontrolnog uzorka (ibuprofen) i A_2 označava absorbanciju ispitivanog uzorka s CQD.

3.3.9. Primjena CQD u detekciji metalnih iona

Kako bi se utvrdila potencijalna primjena CQD u selektivnoj detekciji metalnih iona, provedeno je ispitivanje selektivnosti na različitim ionima. Nakon utvrđivanja selektivnog odziva CQD na pojedini ion, razvijena je metoda za metalni ion selektivnog odziva u širem koncentracijskom rasponu. Ispitivanje je provedeno na sustavima vodenih otopina metalnih iona i u realnim uzorcima bunarske vode.

3.3.9.1. Ispitivanje CQD na selektivnost metalnih iona

U analizi ispitivanja selektivnosti CQD na pojedine metalne ione koristili su se sljedeći kationi metalnih soli: Ca^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{3+}, K^{+}, Hg^{2+}, Mg^{2+}, Al^{3+}, Mn^{2+} i Na^{+}. Prvenstveno, priredile su se vodene otopine odgovarajućih metalnih soli klorida konačne koncentracije c = 100 µmol/mL. Kako bi se ispitala selektivnost i osjetljivost uzoraka CQD kao fluorescentne nanoprobe za detekciju metalnih iona u modelnim sustavima, uzorci su prvo otpareni na SpeedVac-u kako bi se mogla podesiti masena koncentracija CQD na γ = 25 µg/mL. Reakcijska smjesa od 1 mL se sastojala od dodatka 950 µL suspenzije CQD i 50 µL vodene otopine soli. Mjerenja su provedena na Cary Eclipse fluorescencijskom spektrofotometru pri λ_{EXmax} za svaki uzorak CQD.

3.3.9.2. Razvoj modela za detekciju Fe^{3+} iona u modelnim sustavima

Razvoj modela za detekciju Fe^{3+} iona u različitim uzorcima proveden je na sljedeći način: u 900 µL vodene otopine $FeCl_3$ x $6H_2O$ različitih koncentracija (u koncentracijskom rasponu od 0,01 – 500 (ili 700 za $CQD_{CA+KK+Leu}$) µmol/dm^3) dodano je 100 µL suspenzije CQD za ukupni volumen od 1 mL suspenzije za analizu. Na taj način pripremljen je niz razrijeđenja otopina Fe^{3+} iona i suspenzije CQD te je razvijen model za detekciju Fe^{3+} u vodenom mediju. Također, mjerenja su provedena na Cary Eclipse fluorescencijskom spektrofotometru pri λ_{EXmax} za svaki uzorak CQD.

3.3.9.3. Primjena nanoprobe CQD za detekciju Fe^{3+} iona u sustavu bunarske vode

Kao što je već spomenuto u sekciji **3.2.1. Popis kemikalija i materijala**, tri uzorka bunarske vode prikupljeni su i analizirani od strane Hrvatskog veterinarskog instituta - Veterinarski zavod Vinkovci. Prethodno, koncentracija Fe^{3+} iona određena je standardnom ISO metodom HRN ISO 6332:1998 Kakvoća vode – Određivanje željeza – Spektrofotometrijska metoda s 1,10 fenantrolinom (ISO 6332:1988) te je određeno da koncentracija Fe^{3+} iona u uzorku 16 iznosi γ = 1338 µg/L, u uzorku 17 iznosi γ = 2036 µg/L, dok u uzorku 18 koncentracija Fe^{3+} iona iznosi γ = 4960 µg/L. Kako bi se validirala razvijena metoda za određivanje Fe^{3+} iona u realnim uzorcima bunarske vode s CQD, uzorci bunarske vode su razrijeđeni za određeni faktor razrjeđenja (D = 1,50 i 3,50) te je dodano 100 µL razrjeđenog uzorka bunarske vode i 900 µL suspenzije CQD (γ = 25 µg/mL). Mjerenja su provedena na Cary Eclipse fluorescencijskom spektrofotometru pri λ_{EXmax} za svaki uzorak CQD u tri paralele te je rezultat prikazan kao srednja vrijednost mjerenja uz standardne devijacije. Također, kako bi se procijenila valjanost primjenjivosti analitičke metode, određeni su parametri analitičkog prinosa (engl. *Recovery*) i relativna standardna devijacija (%RSD).

3.3.10. Statistička analiza i obrada podataka

Statistička analiza i obrada podataka provedena je primjenom programa MS Excel koristeći se statističkim funkcijama ili alatom "Analiza podataka". Izračuni srednje vrijednosti podataka i standardnih devijacija provedeni su pomoću statističkih funkcija, uključujući i izračune korelacije između podataka. Za analizu utjecaja parametara na odziv QY provedenoj na uzorku $CQD_{CA+KK+Leu}$ korištena je metoda odzivnih površina primjenom CCF dizajna. Procjena koeficijenata modela nelinearnom regresijskom analizom, statistička analiza (ANOVA) značajnosti nezavisnih varijabli na promatrani odziv te numerička optimizacija procesa je primjenom programskog paketa Design-Expert®, v.7 (Stat Ease, Minneapolis, USA). Test statističkih razlika temeljio se na ukupnim kriterijima pogreške s razinom pouzdanosti od 95,0 %. Grafička obrada i prikaz rezultata provedene su pomoću programa OriginPro v2023 (studentska licenca; OriginLab, Northampton, MA, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati istraživanja ovog doktorskog rada podijeljeni su kroz 8 potpoglavlja koji sadrže optičku karakterizaciju modelnih CQD, CQD na bazi kore klementine te optimiranje procesa dobivanja visoko-učinkovitih hibridnih CQD uzoraka $CQD_{CA+KK+Leu}$. Uzorci najboljih karakteristika analizirani su na detaljna strukturalna i kemijska svojstva, dok je ispitana i njihova primjenjivost u biološke i farmakološke svrhe. Konačno, na temelju rezultata selektivnosti, razvijeni su modeli za detekciju metalnog iona selektivnog odziva u modelnim i realnim sustavima.

4.1. Karakterizacija modelnih CQD uzoraka

Sintetska (hidrotermalna) procedura za dobivanje *N*-CQD iz limunske kiseline uključivala je pripremu reakcijske smjese koja se sastojala od limunske kiseline monohidrata i dodatka jedne od 12 aminokiseline navedenih u **Tablici 5.** Daljnji korak u pripremi je bilo termalno tretiranje reakcijske smjese pri 180 °C tijekom 9 sati. Nakon hlađenja, uzorak se pročistio postupkom dijalize (kroz 24 sata) te se skladištio u hladnjaku pri +4 °C do daljnje uporabe.

Prvi korak u karakterizaciji uzoraka je bilo određivanje QY pri pH = 3 i pH = 7 te su rezultati prikazani u **Tablici 6**. Određivanje QY pri nižem pH (pH = 3) provedeno je kako bi se ustanovila mogućnost primjene u detekciji metalnih iona, a pri fiziološkom pH (pH = 7) za primjene u biomedicini. Prema navodima različitih publikacija (Wu i sur., 2017; Chan i sur., 2019; Issa i sur., 2020), izrazito kiseli uvjeti mogu utjecati na stabilnost *N*-CQD i smanjenje intenziteta emisije fluorescencije uzrokujući manju osjetljivost detekcije metalnih iona. No, potencijalni problem u detekciji metalnih iona pri neutralnim uvjetima može stvarati smanjena topljivost pojedinih metalnih iona pri pH = 7, gdje pri višim pH vrijednostima može doći do reakcije s OH^- ionima i do stvaranja taloga hidroksida. Sve navedeno može onemogućiti interakcije *N*-CQD s metalnim ionima koje bi rezultirale prigušenjem fluorescencijskog signala *N*-CQD u razvoju analitičke metode. Stoga je od iznimne važnosti pripraviti CQD koje su izrazito stabilne u širem pH rasponu.

Tablica 6. Optičke karakteristike te QY modelnih CQD pri pH = 3 i pH = 7.

		pH = 3			**pH = 7**		
Uzorak CQD	*N*-dopant	QY / %	λ_{EX} / nm	λ_{EMmax} / nm	QY / %	λ_{EX} / nm	λ_{EMmax} / nm
CQD_{CA+Leu}	Leu	35,75	335	398	36,43	340	406
CQD_{CA+Trp}	Trp	32,95	373	450	33,17	365	423
CQD_{CA+Arg}	Arg	21,39	338	407	23,92	335	415
CQD_{CA+Lys}	Lys	10,84	345	411	16,94	335	401
CQD_{CA+Ala}	Ala	15,99	334	398	16,42	340	408
CQD_{CA+His}	His	15,17	332	404	12,97	340	398
CQD_{CA+Gln}	Gln	9,03	340	410	9,37	340	405
CQD_{CA+Ser}	Ser	8,27	340	422	8,54	340	415
CQD_{CA+Asn}	Asn	8,23	340	406	8,44	340	405
CQD_{CA+Gly}	Gly	7,22	340	434	8,13	343	411
CQD_{CA+Glu}	Glu	5,84	343	422	5,75	335	406
CQD_{CA+Phe}	Phe	5,5	339	394	5,11	340	411
CQD_{CA}	-	2,12	335	415	2,02	320	405

* sintetiziran bez dodatka aminokiseline

Vrijednosti izmjerenog površinskog naboja na površini modelnih CQD (ζ-potencijala) prikazane su u **Tablici 7.**

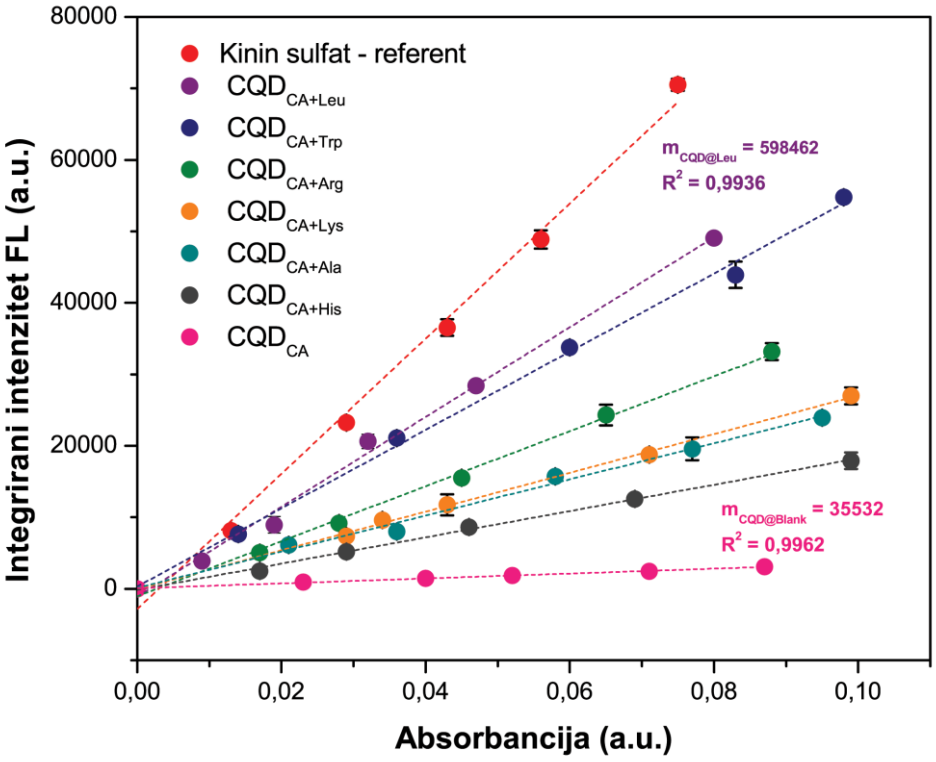
Tablica 7. *ζ*-potencijal svih modelnih uzoraka CQD pri pH = 3 i pH = 7.

***N*-dopirani uzorak CQD**	***ζ*-potencijal (mV)**	
	pH = 3	**pH = 7**
CQD_{CA}	-5,25 ± 1,12	-36 ± 3,4
CQD_{CA+Leu}	-0,91 ± 2,68	-47,7 ± 3,2
CQD_{CA+Trp}	-12,70 ± 0,85	-24,2 ± 2,3
CQD_{CA+Arg}	-13,87 ± 1,38	-14,7 ± 1,7
CQD_{CA+Lys}	-5,37 ± 0,21	-16,87 ± 2,61
CQD_{CA+Ala}	-7,86 ± 0,94	-15,8 ± 1,3
CQD_{CA+His}	-9,85 ± 1,01	-26,9 ± 2
CQD_{CA+Gln}	-5,43 ± 0,34	-9,29 ± 0,71
CQD_{CA+Ser}	5,73 ± 0,25	-14,18 ± 0,85
CQD_{CA+Asn}	-9,26 ± 0,26	-10,25 ± 1,12
CQD_{CA+Gly}	-7,08 ± 0,26	-13,5 ± 1,43
CQD_{CA+Glu}	4,17 ± 0,99	-37,47 ± 2,18
CQD_{CA+Phe}	2,18 ± 1,13	-18,92 ± 2,29

Na temelju već poznatih *pK* vrijednosti za svaku pojedinu aminokiselinu (ili samo limunsku kiselinu kao što je na primjer CQD_{CA} sustava), može se objasniti priroda naboja na površini čestica. Kao što je prikazano u **Tablici 7**, za CQD_{CA} sustav, pri pH = 3, *ζ*-potencijal iznosi (-5,25 ± 1,12) mV, dok za pH = 7, izmjeren je *ζ*-potencijal od (-36 ± 3,4) mV. Limunska kiselina je trikarboksilna s pKa_3 = 6,40, što objašnjava veliki pomak ka izrazito negativnim vrijednostima *ζ*-potencijala. Pri nižim pH vrijednostima od pH = 3, većina karboksilnih skupina je protonirana te su vrijednosti *ζ*-potencijala više usmjerene ka manje negativnim vrijednostima. Kod uzorka dopiranog s Leu (CQD_{CA}), može se vidjeti slučaj izrazito negativne površine pri pH = 7. Analogno prošlom objašnjenju, pri pH = 7 prisutne su funkcijske skupine koje su već deprotonirane, dok se naglo smanjenje vrijednosti *ζ*-potencijala uočava ispod vrijednosti *pI* (izoelektrične točke).

Obzirom na QY i površinski naboj na površini nanočestica koji upućuje na stabilnost čestica, za daljnju analizu potencijalne primjenjivosti dobivenih CQD, odabrani su uzorci CQD visokog QY: CQD_{CA} (kao referentni sustav; QY = 2,02 %), CQD_{CA+Leu} (QY = 36,43 %), CQD_{CA+Trp} (QY = 33,17 %), CQD_{CA+Arg} (QY = 23,92 %), CQD_{CA+Lys} (QY = 16,94 %), CQD_{CA+Ala} (QY = 16,42 %), CQD_{CA+His} (QY = 12,97 %). Na **Slici 4**, prikazana je ovisnost integrirane površine fotoluminescencije o absorbanciji uzorka pri pH = 7. Kao referentni uzorak korišten je kinin

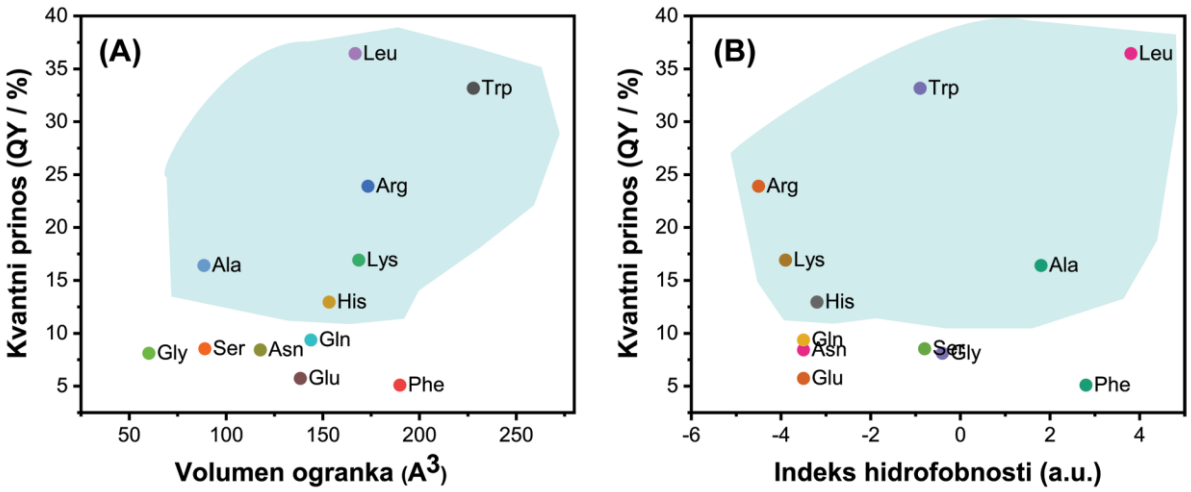
sulfat koji pri zadanim uvjetima iskazuje kvantni prinos od QY = 54 %. Vidljivo je da svi modelni CQD prate trend kinin sulfata, a iz nagiba pravaca može se uočiti da se nakon kinin sulfata nalazi CQD_{CA+Leu} (QY = 36,43 % pri pH = 7), dok je najmanji QY iskazao uzorak CQD_{CA} s određenim QY od 2,02 %. Parametar QY vrlo je važan za procjenu primjenjivosti CQD u različite svrhe, primjerice kao senzorskog materijala ili kao fluorescentne boje za potrebe staničnog oslikavanja. Uzorak s višim QY emitira snažnu fotoluminescenciju i pri vrlo niskim koncentracijama (Sadjadi, 2021), što ujedno pridonosi i široj primjenjivosti u biološkim sustavima s pozitivnim učincima na ekonomskoj razini.



Slika 4. Ovisnost absorbancije i integriranog intenziteta fotoluminescencije modelnih CQD – određivanje QY za modelne uzorke CQD.

Da bi se zapravo u potpunosti shvatilo ponašanje aminokiseline i njezin potencijalni utjecaj na QY, potrebno je prvo promotriti kemijsku prirodu svake od 12 aminokiseline posebno. Na **Slici 5** grafički je prikazana ovisnost volumena ogranka aminokiseline o određenom QY (**Slika 5A**) te se može uočiti kako povećanje QY može potencijalno biti rezultat dodatka aminokiseline većeg volumena. S obzirom da CQD_{CA+Ala} pokazuje relativno visok QY u odnosu na CQD_{CA+His}, ovakva pojava može upućivati na dodatne parametre koje potencijalno imaju utjecaja na proces osim volumena ogranka. Na **Slici 5B**, prikazana je ovisnost određenog QY uzoraka dopiranih aminokiselinama o hidrofilnosti/hidrofobnosti aminokiselina. Vidljivo je da uzorci

dopirani aminokiselinama koje su hidrofobne (Trp, Ala i Leu) pokazuju viši QY u odnosu na uzorke dopirane neutralnim ili hidrofilnim aminokiseline. Stoga, za zaključiti je da QY uzoraka ovisi o mnogo čimbenika i u ovom slučaju postoji kombinirani učinak volumena aminokiseline i kemijske prirode aminokiseline, dok je još poznato da QY ovisi o tipu medija u kojima se odvija sinteza (ili su čestice samo suspendirane u tom mediju), a važnu ulogu igra i sam pH medija (Pandit i sur., 2019).



Slika 5. Ovisnost QY o karakteristikama aminokiselina; A) volumena ogranka i B) indeksa hidrofobnosti.

U znanstvenom radu Pandit i sur. (2019), navedena je sintetska procedura dobivanja *N*-CQD iz limunske kiseline i aminokiselina u formamidu. Dobivene čestice su lako dispergirane u organskom mediju te je opisan potencijalni utjecaj kemijske prirode aminokiselina na QY. Navedeno je da hidrofobne aminokiseline uzrokuju povećanje QY u usporedbi s hidrofilnim, dok se kao potencijalno objašnjenje dobivanja čestica izvrsnih optičkih svojstava navodi ovisnost polimerne strukture aminokiseline i njihove sposobnosti samoudruživanja u kompleksnije molekularne strukture kojima pogoduju hidrofobne interakcije.

Spektroskopskom energetskom disperzijom (EDS) određen je maseni i atomski udio C, O, N elementa u uzorcima CQD. Iz **Tablice 8** je vidljivo kako CQD_{CA}, pripremljenog bez dodatka aminokiseline, nije detektirana prisutnost dušika, što je bilo i za očekivati obzirom na kemijski sastav limunske kiseline ($C_6H_8O_7$). U slučaju CQD pripremljenih uz dodatak aminokiselina, može se zamijetiti prisustvo dušika u uzorcima (**Tablica 8**). Kada se usporedi QY (**Tablica 7**) i udio N u modelnim uzorcima CQD (**Tablica 8**), tada se može zamijetiti da ne postoji značajna korelacija između ova dva parametra ($r = 0{,}151$; $p < 0{,}05$).

Tablica 8. Maseni i atomski udio ugljika (C), kisika (O) i dušika (N) u modelnim uzorcima CQD.

	Maseni udio %			Atomski udio %		
Uzorak	**C (%)**	**O (%)**	**N (%)**	**C (%)**	**O (%)**	**N (%)**
CQD_{CA}	28,31	50,05	-	46,55	35,07	-
CQD_{CA+Leu}	40,48	46,44	1,60	45,11	38,85	1,53
CQD_{CA+Trp}	34,31	42,60	3,23	43,19	40,26	3,49
CQD_{CA+Arg}	37,83	46,14	5,69	42,18	38,62	5,44
CQD_{CA+Lys}	24,01	30,14	2,04	42,42	39,98	3,09
CQD_{CA+Ala}	37,22	49,52	3,33	41,18	41,14	3,16
CQD_{CA+His}	39,82	42,63	6,21	45,50	36,57	6,09

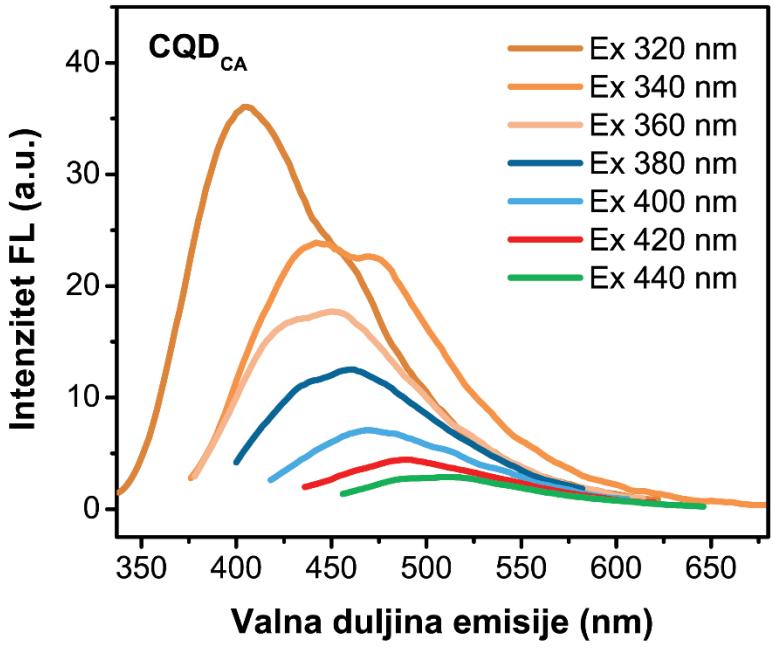
Liang i sur. (2014) sintetizirali su seriju uzoraka *N*-CQD varirajući prekursore (ksilan, kitozan, škrob i *β*-ciklodekstrin) i dopante (NH_4OH, etilendiamin, NaOH i octena kiselina). Rezultati su pokazali da kontrolni uzorak BDCs (CQD bez modifikacije) iskazuje vrlo nizak QY od 2,06 %, dok je najveći QY pokazao uzorak NCDs (QY = 16,18 %) dobiven korištenjem ksilana kao prekursora ugljika te 25 %-tne vodene otopine NH_4OH kao *N*-dopanta. Zanimljivo, iz rezultata se mogao uočiti linearan porast QY s dodatkom više koncentracije NH_4OH u reakcijsku smjesu. Prisutnost dušika u NCDs uzorku s najvećim QY utvrđena je XPS analizom (%N = 6,37 %). Pandit i sur. (2019) sintetizirali su *N*-CQD iz limunske kiseline s različitim aminokiselinama primjenom solvotermalne metode sinteze s formamidom. Uočeno je kako prisutnost aromatskih aminokiselina poput Phe, His (*%N* = 14,21 %) i Trp (*%N* = 14,43 %), ali i prisutnost aminokiseline Arg (*%N* = 17,37 %) pridaju povećanju postotka heteroatoma u uzorcima CQD, što se slaže s rezultatima navedenim u **Tablici 8**. Također je zaključeno da udio dušika u uzorku ne mora značiti i linearni porast QY uzorka CQD (QY (CQD@Phe) = 62,1 %).

U **Tablici 9** prikazani su rezultati disperzivnosti modelnih CQD prije i poslije pročišćavanja kako bi se uvidjela učinkovitost pročišćavanja. U slučaju uzoraka dobivenih iz limunske kiseline, uočeno je da su razlike između stupnja disperzivnosti uzoraka prije i poslije pročišćavanja, iako statistički značajne (p = 0,038), vrlo male. Prije pročišćavanja, najmanji stupanj disperzivnosti pokazao je uzorak CQD_{CA+Trp} s (98,46 ± 0,66) %, dok je najveći stupanj zabilježen kod uzorka CQD_{CA} s (100,05 ± 0,50) %. Pročišćavanje uzoraka i disperzivnost CQD u vodenom mediju od iznimne je važnosti za procjenu potencijalne primijenjivosti uzoraka u biološke svrhe.

Tablica 9. Stupanj disperzivnosti za modelnih uzoraka CQD.

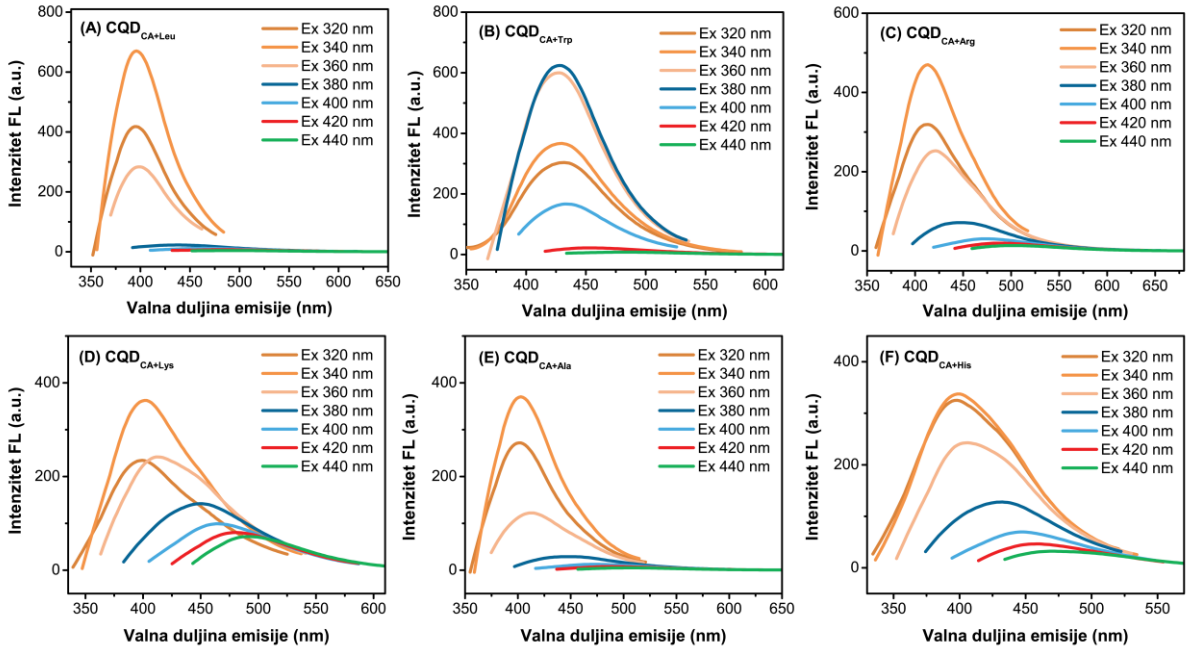
***N*-dopirani uzorak CQD**	**Prije pročišćavanja**	**Poslije pročišćavanja**
	Srednje vrijednosti stupnja disperzivnosti / %	
CQD_{CA}	100,05 ± 0,50	99,72 ± 0,49
CQD_{CA+Leu}	99,00 ± 1,26	99,54 ± 1,33
CQD_{CA+Trp}	98,46 ± 0,66	99,67 ± 1,49
CQD_{CA+Arg}	99,56 ± 0,43	99,68 ± 0,55
CQD_{CA+Lys}	99,74 ± 0,75	99,88 ± 0,44
CQD_{CA+Ala}	100,04 ± 0,64	100,27 ± 0,76
CQD_{CA+His}	98,92 ± 0,55	99,80 ± 1,04

Kako bi se pokazala primjenjivost modelnih uzoraka CQD za određene analitičke i biomedicinske primjene, bilo je potrebno provesti spektrofluorimetrijske analize koje su uključivale ispitivanja ovisnosti valne duljine emisije o valnoj duljini ekscitacije, utjecaj otapala (aceton, DMSO, etanol, metalnol) i pH medija na intenzitet fotoluminescencije. Istraživanja utjecaja otapala i pH medija na intenzitet fotoluminescencije na CQD_{CA} uzorku nisu bila moguća zbog niske osjetljivosti uzrokovane niskim QY (QY = 2,02 % pri pH = 7).



Slika 6. Fluorescencijski spektar emisije CQD_{CA} uzorka u ovisnosti o valnoj duljini ekscitacije od 320 nm do 440 nm.

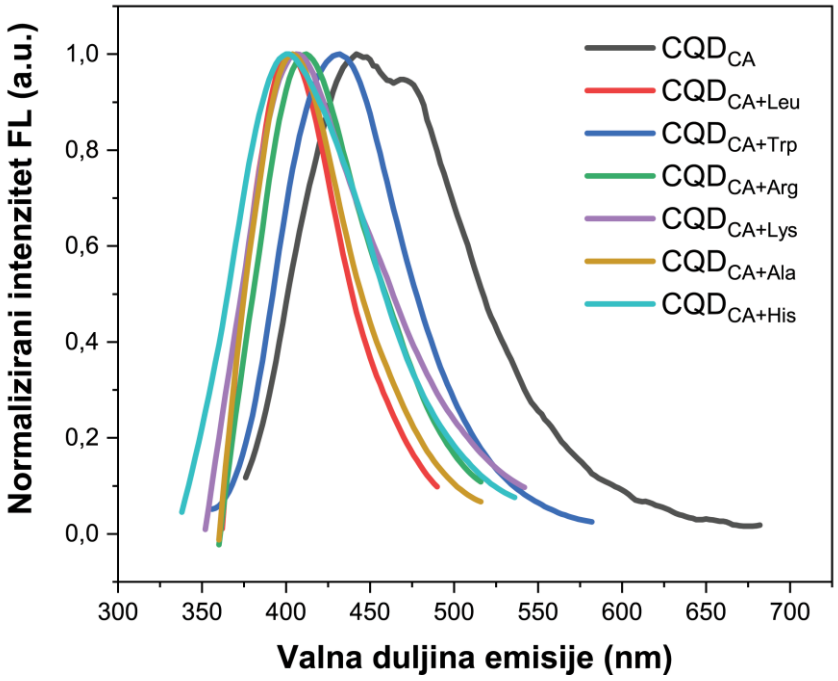
Iz **Slike 6** se može iščitati da je maksimum emisije λ_{EMmax} za uzorak CQD_{CA} ostvaren pri valnoj duljini od 405 nm nakon pobude pri λ_{EX} = 320 nm.



Slika 7. Fluorescencijski spektri emisije modelnih uzoraka CQD (A) CQD_{CA+Leu}, (B) CQD_{CA+Trp}, (C) CQD_{CA+Arg}, (D) CQD_{CA+Lys}, (E) CQD_{CA+Ala} i (F) CQD_{CA+His} u ovisnosti o valnoj duljini ekscitacije od 320 nm do 440 nm.

Utjecaj *N*-dopiranja CQD_{CA} aminokiselinama na optičke karakteristike prikazan je **Slikom 7**. Vidljivo je da CQD_{CA+Leu} koji pokazuje najveći QY pri pH = 7 ima maksimum valne duljine emisije λ_{EMmax} = 406 nm pri valnoj duljini ekscitacije od λ_{EXmax} = 340 nm. Optičkom karakterizacijom ostalih modelnih CQD uzoraka analiziranim pri pH = 7 i prikazanih na **Slici 7** i u **Tablici 6** iskazani su maksimumi valnih duljina emisije o ovisnosti valne duljine ekscitacije kako slijedi:

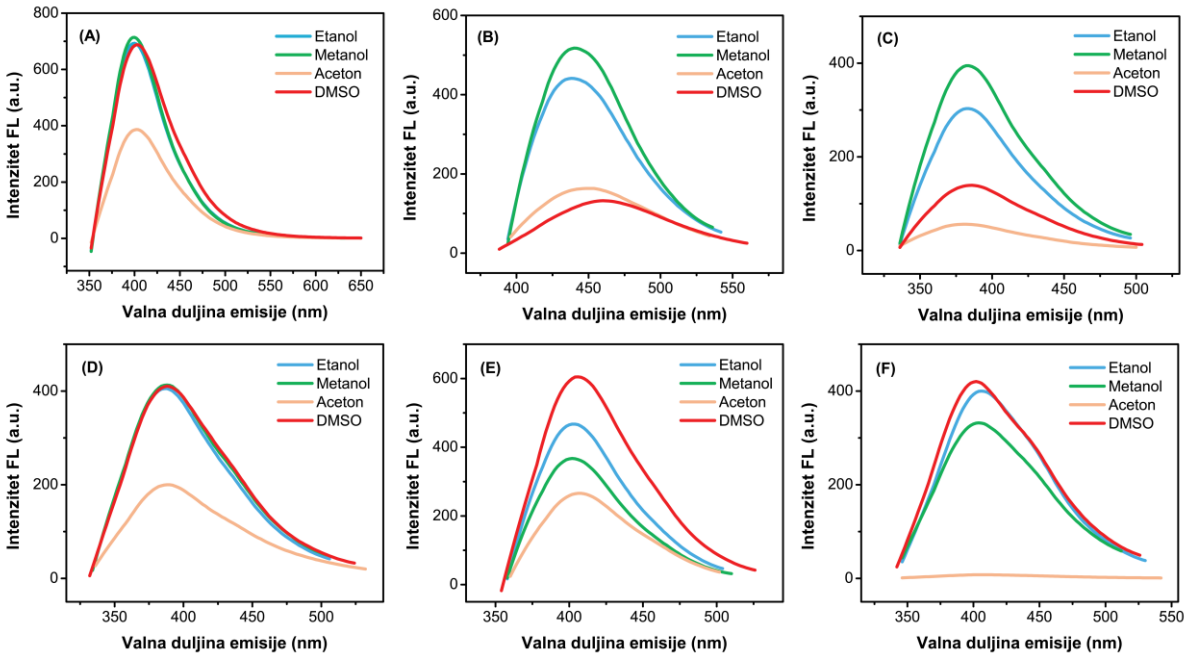
1. Maksimum valne duljine emisije za CQD_{CA+Trp} uzorak određen je λ_{EMmax} = 423 nm pri λ_{EXmax} = 365 nm;
2. Maksimum valne duljine emisije za CQD_{CA+Arg} uzorak određen je λ_{EMmax} = 415 nm pri λ_{EXmax} = 335 nm;
3. Maksimum valne duljine emisije za CQD_{CA+Lys} uzorak određen je λ_{EMmax} = 401 nm pri λ_{EXmax} = 335 nm;
4. Maksimum valne duljine emisije za CQD_{CA+Ala} uzorak određen je λ_{EMmax} = 408 nm pri λ_{EXmax} = 340 nm;
5. Maksimum valne duljine emisije za CQD_{CA+His} uzorak određen je λ_{EMmax} = 398 nm pri λ_{EXmax} = 340 nm.



Slika 8. Normalizirani fluorescencijski spektri modelnih CQD pri λ_{EX} = 340 nm i pH = 7.

Kako bi se lakše usporedio utjecaj *N*-dopiranja CQD_{CA} aminokiselinama na intenzitet fotoluminescencije, intenziteti fluorescencije određeni pri 340 nm ekscitacije su normalizirani (**Slika 8**).

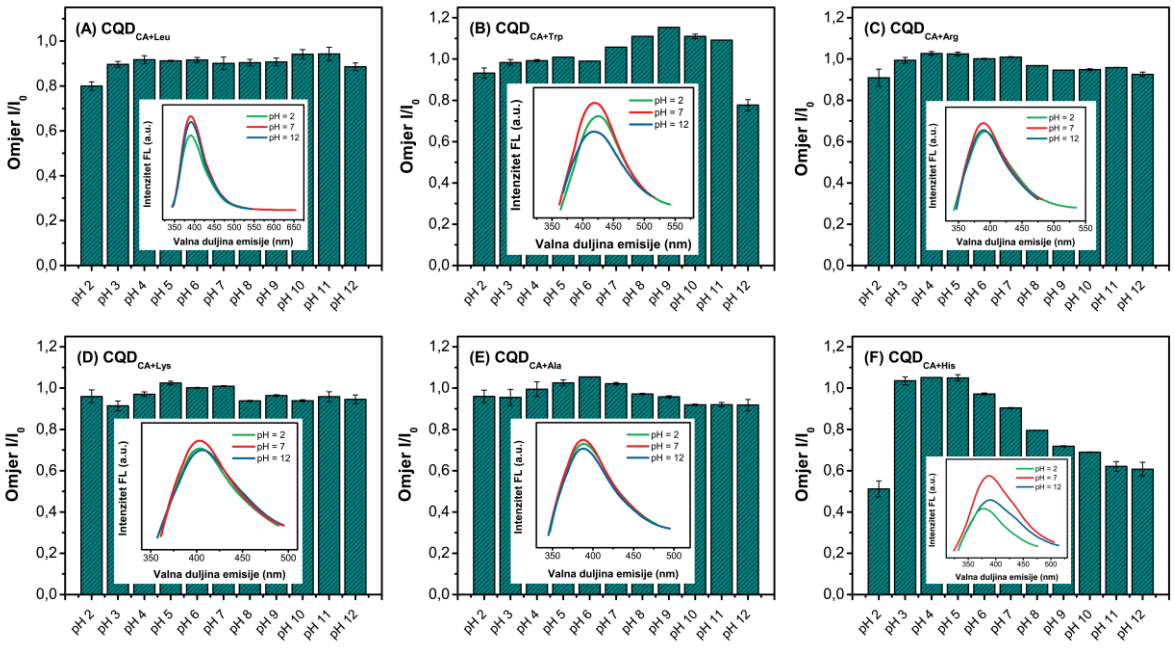
Iz **Slike 8** se može uočiti najveći pomak valne duljine prema višim vrijednostima za uzorak CQD_{CA} (λ_{EM} = 445 nm i λ_{EM} = 473 nm). U odnosu na uzorak CQD_{CA}, svi ostali uzorci CQD pokazuju pomak ka nižim valnim duljinama, što upućuje da N-dopirani uzorci CQD pri zadanim sintetskim uvjetima i uporabom prekursora limunske kiseline ne iskazuju povoljna svojstva za primjenu u biološkim ispitivanjima i u staničnom oslikavanju. Naime, poznato je da su nizak QY, valne duljine emisije u nižim područjima spektra te kompleksni postupci sinteze i pročišćavanje uzoraka ograničavajući čimbenici za biološke analize i stanično oslikavanje (Zhang i sur., 2022). Slične zaključke iznijeli su i Chahal i sur., 2020 u znanstvenom radu gdje je opisana priprema *N*-CQD hidrotermalnom sintezom (200 °C, 8 h) iz limunske kiseline i aminokiseline Phe. Spektrofluorimetrijskom metodom određen je maksimum emisije od λ_{EMmax} = 413 nm pri valnoj duljini ekscitacije od λ_{EMmax} = 350 nm. Daljnjim analizama ovisnosti valnih duljina emisije o valnim duljinama ekscitacije utvrđeno je da izvan područja maksimuma emisije i ekscitacije intenzitet fotoluminescencije naglo opada te nije uočena značajna ovisnost valne duljine emisije pomakom valne duljine ekscitacije prema višim vrijednostima valnog područja.



Slika 9. Fluorescencijski spektri emisije modelnih uzoraka CQD obzirom na vrstu otapala. (A) CQD_{CA+Leu}, (E) CQD_{CA+Ala} i (F) CQD_{CA+His} pri λ_{EXmax} = 340 nm, (C) CQD_{CA+Arg} i (D) CQD_{CA+Lys} pri λ_{EXmax} = 335 nm te (B) CQD_{CA+Trp} pri λ_{EXmax} = 365 nm.

Utjecaj otapala (aceton, DMSO, etanol, metanol) na fotoluminescencijska svojstva te na samu disperzivnost uzoraka prikazan je na **Slici 9**. U slučaju CQD_{CA+Leu}, uočeno je da uzorak suspendiran u DMSO, etanolu i metanolu iskazuje podjednaka optička svojstva u usporedbi s acetonom gdje je uočen najveći pad intenziteta fluorescencije. Može se zaključiti da je uzorak CQD_{CA+Leu} pokazao izvrsnu disperzivnost u polarnim protičnim otapalima kao što je etanol i metanol te u polarnom aprotičnom otapalu DMSO. Značajnije razlike u intenzitetima fluorescencije uočene su kod uzoraka CQD_{CA+Ala} i CQD_{CA+His}. Najveći intenzitet fotoluminescencije uočen je u disperziji s DMSO, a slijede etanol, metanol i aceton. U oba slučaja, uzorci su pokazali dobru disperzivnost u polarnim protičnim otapalima i u DMSO, dok je u acetonu disperzivnost bila otežana, što se može zaključiti i po niskim intenzitetima fluorescencije. Pokazalo se da je intenzitet fluorescencije niži u alkoholima i zasigurno u acetonu u odnosu na vodeni medij, dok je nešto veći s DMSO. Potencijalno objašnjenje utjecaja otapala na fluorescencijska svojstva CQD leži u samoj prirodi CQD i ispitivanog otapala te mogućnosti sudjelovanja otapala kao donora/akceptora vodika u stvaranju vodikovih veza (Wang i sur., 2020b). U znanstvenom radu Pal i sur. (2018) provedeno je ispitivanje ovisnosti fluorescencije CQD o otapalu u kojem su nanočestice dispergirane (voda, DMF, DMSO i metanol). Nanočestice CQD dobivene su hidrotermalnom metodom iz kurkumina. Najveća disperzivnost nanočestica CQD uočena je s DMF, dok je najmanji intenzitet fluorescencije pokazan s otapalom DMSO. Kao potencijalno objašnjenje najvećeg povećanja

intenziteta fluorescencije s DMF otapalom je prisutnost amidnih skupina na površini nanočestica CQD. Wei i sur. (2019) ispitali su utjecaj šest različitih otapala (voda, etilen-glikol, etanol, DMSO, aceton i toluen) na optičke karakteristike CQD te su ustanovili pojavu pomaka valne duljine emisije CQD prema crvenom području s povećanjem polarnosti otapala. Slične zaključke navode i Hu i sur., 2022 gdje je ispitan utjecaj polarnosti, intramolekularnog prijenosa naboja i utjecaja vodikovih interakcija na svojstva kvantnih točaka. Ispitivanjem 10 protičnih i aprotičnih otapala različite polarnosti, zaključeno je da mehanizam fotoluminescencije kvantnih točaka ovisi o polarnosti, prisutnosti vodikovih interakcija te o procesima intramolekularnog prijenosa naboja koji se odvijaju na kvantnoj razini. Znanstvena studija Liu i sur., 2019 ukazuje na važan utjecaj vodikovih veza na optička svojstva CQD u otapalima različite protičnosti (voda, etanol, metanol, DMF, aceton, acetonitril, dioksan, toluen, diklormetan, etilacetat, tetrahidrofuran, etilen glikol) te je uočeno kako je valna duljina emisije CQD pomaknuta ka nižim vrijednostima s aprotičnim otapalima, dok je za protična otapala (voda, etanol, metanol) emisija pomaknuta ka višim vrijednostima valnih duljina. Kao potencijalno objašnjenje navodi se stabilizacija intramolekularnog prijenosa naboja putem vodikove veze CQD (preko amino i hidroksilnih kao elektron-donorskih skupina te karboksilnih skupina kao elektron-odvlačećih skupina) i protičnog otapala uzrokujući veće Stokesove pomake.



Slika 10. Ovisnost omjera intenziteta fluorescencije modelnih CQD o pH medija: (A) CQD_{CA+Leu}, (E) CQD_{CA+Ala} i (F) CQD_{CA+His} pri λ_{EXmax} = 340 nm, (C) CQD_{CA+Arg} i (D) CQD_{CA+Lys} pri λ_{EXmax} = 335 nm te (B) CQD_{CA+Trp} pri λ_{EXmax} = 365 nm.

Utjecaj pH vrijednosti na stabilnost CQD i njihov intenzitet fluorescencije vidljiv je iz **Slike 10**. U slučaju CQD_{CA+Ala}, nisu uočene značajne razlike u intenzitetu fluorescencije obzirom na ispitani raspon pH medija (pH = 2-12). U ostalim slučajevima, pri ekstremnim pH vrijednostima pH = 2 i pH = 12, uočen je pad intenziteta fluorescencije, dok u rasponu od pH = 3-11 nisu uočene značajne razlike u promjeni intenziteta fluorescencije. U kiselim uvjetima CQD čestice su protonirane, dok u lužnatim uvjetima CQD imaju negativan naboj na površini (**Tablica 7**), odnosno, dolazi do deprotoniranja karboksilnih skupina na površini CQD. Literatura ukazuje da je ovisnost pH i promjene intenziteta fluorescencije usko povezana s protoniranjem/deprotoniranjem hidroksilnih i karboksilnih skupina na *N*-dopiranim CQD (Chan i sur., 2019; Issa i sur., 2020).

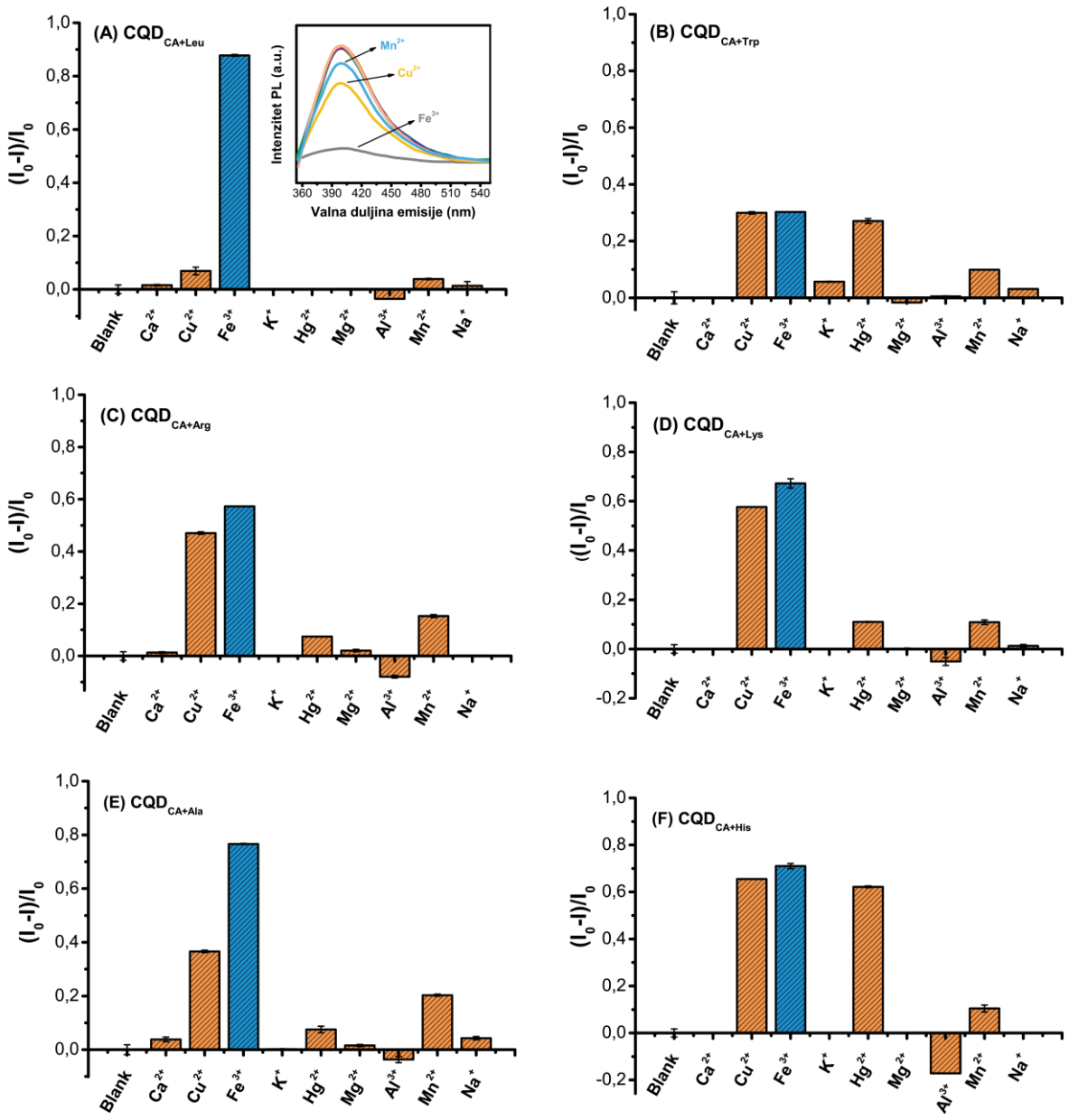
4.2. Ispitivanje selektivnosti modelnih CQD na metalne ione

Sveukupno šest modelnih uzoraka CQD je ispitano na odziv fotoluminescencijskog intenziteta u prisutnosti različitih metalnih iona: Ca^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{3+}, K^{+}, Hg^{2+}, Mg^{2+}, Al^{3+}, Mn^{2+} i Na^{+}. Masene koncentracije u reakcijskoj smjesi podešene su na 25 μg/mL za modelne CQD uzorke, dok je masena koncentracija vodenih otopina metalnih soli iznosila 100 μmol/dm^3. Cilj je bio postići što izraženiji afinitet CQD prema jednom ionu. Na **Slici 11** prikazan je grafički prikaz odziva svih uzoraka prema ispitanim metalnim ionima.

Uzorci CQD_{CA+Trp} (**Slika 11B**) i CQD_{CA+His} (**Slika 11F**) ne pokazuju značajan odziv niti na jedan od ispitanih iona selektivno. Podjednako prigušenje signala fluorescencije za uzorak CQD_{CA+Trp} u odnosu na Blank (uzorak CQD bez dodatka metalnog iona; intenzitet referenta označen kao I_0) uočeno je u prisutnosti iona Cu^{2+} (29,96 %) i Fe^{3+} (30,27 %), dok je nešto manji postotak uočen kod K^{+} i Mn^{2+} (< 10 %). Nadalje, vrlo slična pojava uočena je i kod uzorka CQD_{CA+His} (**Slika 11F**) gdje je prigušenje signala za Cu^{2+} ione jednako 65,54 %, za Fe^{3+} 71,04 % te za Hg^{2+} 62,19 %. Također, slabija prigušenja signala intenziteta fluorescencije su uočena kod Mn^{2+} iona s 10,44 %, dok je pojačanje signala uočeno kod Al^{3+} iona za 17,17 %.

Upravo se iz prikaza **Slika 11A** može vidjeti visoki afinitet, gotovo selektivni odziv CQD_{CA+Leu} prema Fe^{3+} ionu s gotovo 90 % prigušenja signala fluorescencije u odnosu na Blank uzorak. Zanemarivi odziv pokazuju ioni Cu^{2+} (1,58 %) i Mn^{2+} (3,90 %).

Iz prikazanih rezultata koji se također mogu vidjeti na **Slici 11A; umetak**, jasno je vidljivo da uzorak CQD_{CA+Leu} pokazuje najveći afinitet prema Fe^{3+} ionima u odnosu na ostale ispitane uzorke te je najpogodniji za daljnja ispitivanja i karakterizaciju. Primjerice, u znanstvenom radu Chahal i sur., 2020, *N*-CQD su dobivene hidrotermalnom sintezom iz limunske kiseline i Phe. Ispitivanje selektivnosti CQD prema kationima i anionima provedeno je na sveukupno 22 iona (Li^{+}, Na^{+}, K^{+}, Cs^{+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Ba^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Co^{2+}, Pd^{2+}, Cu^{2+}, Ag^{+}, Au^{3+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Cl^{-}, Br^{-}, CH_3COO^{-}, ClO_4^{-}, NO_3^{-}). Pri koncentraciji od 1000 μmol/dm^3, prigušenje fluorescencijskog signala uočeno je u prisutnosti Fe^{2+}, Fe^{3+}, Co^{2+}, Pd^{2+}, Cu^{2+}, Ag^{+} i Au^{3+} iona, dok je potpuno prigušenje uočeno kod iona Fe^{3+} i Pd^{2+} iona. Literatura upućuje da prisutnost različitih funkcijskih skupina na površini CQD koje mogu stvarati interakcije s ionima imaju presudnu ulogu u selektivnoj detekciji (Dimos, 2016; Chahal i sur., 2020; Issa i sur., 2020).



Slika 11. Odziv fluorescentnih nanoproba (A) CQD_{CA+Leu}; umetak: fluorescencijski spektri CQD u prisutnosti metalnih iona, (B) CQD_{CA+Trp}, (C) CQD_{CA+Arg}, (D) CQD_{CA+Lys}, (E) CQD_{CA+Ala} i (F) CQD_{CA+His} na odziv intenziteta fotoluminescencije u prisutnosti različitih metalnih iona (λ_{EXmax} = 380 nm). Oznaka na ordinati $(I_0\text{-}I)/I_0$ označava omjer intenziteta fluorescencije CQD kao referentnog sustava bez dodatka metalnih iona (I_0) te sustava s dodatkom metalnih iona (I).

4.3. Pročišćavanje i karakterizacija CQD uzoraka na bazi kore klementine

Uzorci na bazi kore klementine pripremljeni su na temelju rezultata dobivenim karakterizacijom modelnih CQD uzoraka. Izdvojenih šest aminokiselina (Leu, Trp, Arg, Lys, Ala, His) koje su u modelnim sustavima pokazali visoku učinkovitost, korištene su u sintezama CQD na bazi kore klementine. Međutim, kako bi se pobliže razumio potencijalni doprinos kemijskih komponenti u sintetskoj proceduri CQD uzoraka, vodeni ekstrakt kore klementine ispitan je na kemijski sastav metodom tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti u sprezi masene spektrometrije visoke djelotvornosti s elektrosprej ionizacijom (UHPLC-ESI-HRMS).

Tablica 10. Kvalitativna i kvantitativna analiza vodenog ekstrakta kore klementine metodom UHPLC-ESI-HRMS.

t_R(min)	Naziv spoja	Struktura spoja	Monoizotopna masa	$[M-H]^-$	Promjena mase (ppm)	Površina pika (n)
0,660	Kvininska kiselina	$C_7H_{11}O_6$	192,06339	191,05611	2,5	650380
0,985	*p*-kumarinska kiselina	$C_9H_8O_3$	164,04734	163,04007	6,6	1067853
1,138	Limunska kiselina	$C_6H_7O_7$	192,02700	191,01882	-4,7	1333375
1,426	p-hidroksibenzojeva kiselina	$C_7H_6O_3$	138,03169	137,02442	5,4	140954
2,105	Vanilinska kiselina	$C_8H_8O_4$	168,04226	167,03498	6,6	246330
6,288	Kofeinska kiselina	$C_9H_8O_4$	180,04226	179,03498	2,6	272060
6,476	Apigenin	$C_{15}H_{10}O_5$	270,05282	269,04555	8,6	692304
6,543	Ferulinska kiselina	$C_{10}H_{10}O_4$	194,05791	193,05063	5,5	9957770
7,002	Rutin	$C_{27}H_{30}O_{16}$	610,15338	609,14611	5,9	1675304
7,853	*o*-kumarinska kiselina	$C_9H_8O_3$	164,04734	163,04007	3,9	1511159
8,194	Sinapinska kiselina	$C_{11}H_{12}O_5$	224,06847	223,0612	5,2	1225482
8,687	Luteolin	$C_{15}H_{10}O_6$	286,04774	285,04046	9,7	71207
8,823	Hesperidin	$C_{28}H_{34}O_{15}$	610,18977	609,18249	6,6	24896422
9,164	Hesperetin	$C_{16}H_{14}O_6$	302,07904	301,07176	7,4	93124
9,469	Katehin	$C_{15}H_{14}O_6$	290,07904	289,07176	8,4	27821
11,169	Naringenin	$C_{15}H_{12}O_5$	272,06847	271,0612	6,5	139361
12,393	Limonin	$C_{26}H_{30}O_8$	470,19407	469,18679	9,1	1148317
12,953	Nomilin	$C_{28}H_{34}O_9$	514,22028	513,21301	9,1	261815
15,941	Linolenska kiselina	$C_{18}H_{30}O_2$	278,22458	277,2173	6,2	27820230
16,450	Linolna kiselina	$C_{18}H_{32}O_2$	280,24023	279,23295	6,1	22305546
16,806	Palmitinska kiselina	$C_{16}H_{32}O_2$	256,24023	255,23295	7,0	11337122
17,043	Oleinska kiselina	$C_{18}H_{34}O_2$	282,25588	281,2486	6,5	7770794

Iz **Tablice 10** se može iščitati da je hesperidin jedna od najzastupljenijih bioaktivnih komponenti u kori klementine te su rezultati u skladu s dostupnom literaturom (Cheigh i sur., 2012; Lachos-Perez i sur., 2018; Jokić i sur., 2019; Jokić i sur., 2020; Šafranko i sur., 2021). Najzastupljenija komponenta je linolenska kiselina nakon koje slijede druge masne kiseline (palmitinska, oleinska), te fenolne kiseline poput ferulinske, *o*-kumarinske, limunske i sinapinske kiseline. Također, detektirane su i polifenolne komponente poput već navedenog hesperidina, zatim rutin, apigenin te su nešto slabije zastupljenije komponente naringenin i hesperetin. Iako je već poznato da biomasa poput kore klementine može predstavljati bogat izvor ugljika, te isto tako da može poslužiti kao dobar prekursor u sintezi CQD, postoje i znanstveni navodi koji objašnjavaju pozitivan utjecaj prisutnosti različitih polifenola i minerala na pripravu visoko-učinkovitih CQD (Meng i sur., 2019; Sharma i sur., 2019). Kora klementine može poslužiti kao jeftina i netoksična alternativa kemikalijama, dok su kemijska i fizikalna svojstva usporediva s onima dobivenim iz vrlo često skupih kemikalija na bazi teških metala. Najveći izazov u pripremi uzoraka CQD s biomasom općenito je izrazito nizak QY što potencijalno može limitirati njihovu primjenu u bioanalitičke svrhe (Meng i sur., 2019).

Prvi korak pripreme CQD na bazi kore klementine u ovoj disertaciji uključivao je pripremu vodenog ekstrakta kore klementine te dodatak aminokiseline. Kao i u prethodnom slučaju, hidrotermalna sinteza se odvijala pri 180 °C kroz 9 sati. Zatim je uslijedilo pročišćavanje uzorka centrifugiranjem, filtriranjem i dijalizom preko membrana (MWCO = 1 kDa). Naime, problematika pročišćavanja CQD uzoraka postupkom dijalize i isticanje nedosljednosti dostupne literature na tu tematiku obrađena je u nekoliko znanstvenih radova (Gong i sur., 2016; Essner i sur., 2018; Chen i sur., 2019). Upravo su znanstvenici Chen i sur. (2019) proveli opsežno istraživanje o utjecaju vremena na učinkovitost dijalize te je također razvijen protokol kojim se može ispitati stupanj pročišćenosti CQD uzoraka HPLC tehnikom. Iz preliminarnih rezultata (Šafranko i sur., 2021), prilagođen je protokol (metoda modificirana prema Chen i sur., 2019) za potrebe eksperimenata koji je uključivao pripremu Blank uzorka CQD (bez dodatka aminokiseline) kako bi se ispitalo potrebno vrijeme za adekvatno pročišćavanje uzoraka. Tehnikom HPLC-DAD snimljeni su HPLC kromatogrami te je uočeno kako se u uzorku prije dijalize pojavljuju višestruki i oštri pikovi oko približno ~30–50 min, potencijalno zbog prisutnosti nečistoća i neizreagiranih kemijskih nusprodukata nastalih uslijed termalne razgradnje. Nadalje, vidljivi su bili i apsorpcijski pikovi na približno 5,89–17,20 min koji su potencijalno posljedica prisutnosti nusprodukata različitih strukturnih karakteristika. Nakon 24 sata dijalize, uočena je značajna redukcija broja pikova na kromatogramu, posebice na retencijskim vremenima od ~30–50 min, dok se nakon 48 sati značajno smanjio šum na vrpci što je upućivalo na uspješnost postupka pročišćavanja te se period od 48 sati uzeo kao adekvatan vremenski period za pročišćavanje CQD na bazi kore klementine. Upravo se i

odabir vremenskog perioda dijalize za pročišćavanje uzoraka CQD na bazi kore klementine u ovom doktorskom radu temelji na gore navedenim saznanjima.

Uzorci CQD na bazi kore klementine pripravljeni su sukladno pripremi modelnih CQD. Kao prekursor ugljika korištena je liofilizirana i usitnjena kora klementine, dok su kao dopanti dušika korištene sljedeće aminokiseline: Leu, Trp, Arg, Ala, Lys te His. Svi uzorci (uključujući i CQD_{KK}) pripravljeni su pri 180 °C kroz 9 sati hidrotermalnom sintezom te su uzorci analizirani pri pH = 7.

U **Tablici 11**. prikazani su rezultati optičke karakterizacije i *ζ*-potencijala CQD uzoraka na bazi kore klementine.

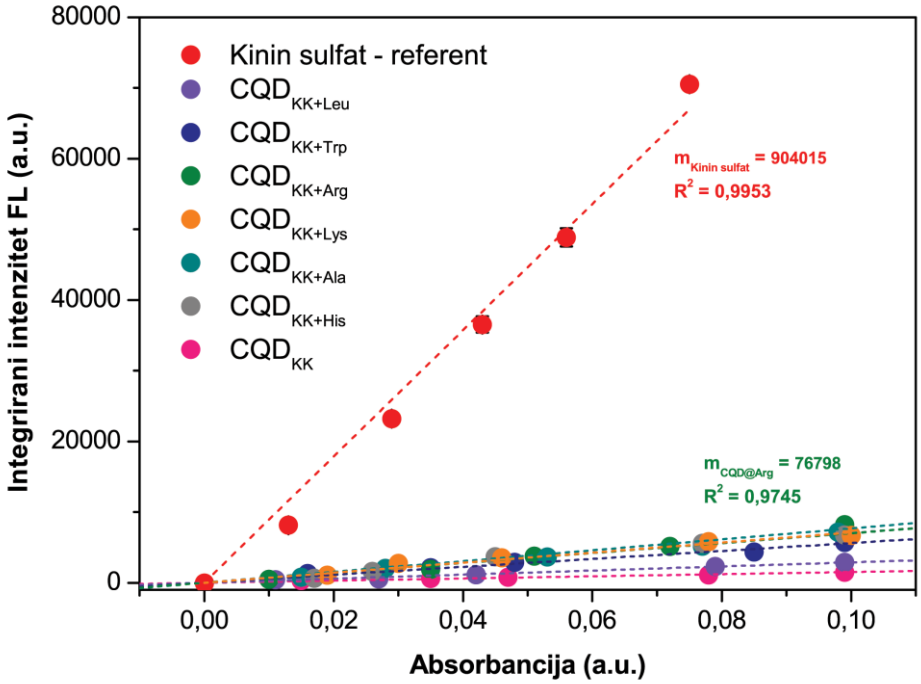
Tablica 11. Optička karakterizacija i *ζ*-potencijal CQD na bazi kore klementine pri pH 7.

Uzorak CQD	QY / %	λ_{EX} / nm	λ_{EMmax} / nm	*ζ*-potencijal / mV
CQD_{KK+Arg}	4,59	380	436	-6,24 ± 2,00
CQD_{KK+Lys}	4,25	340	421	-21,40 ± 4,90
CQD_{KK+Ala}	4,20	380	440	-23,77 ± 1,42
CQD_{KK+His}	4,19	380	437	-19,12 ± 0,50
CQD_{KK+Trp}	3,35	380	453	-23,28 ± 1,25
CQD_{KK+Leu}	1,72	380	460	-27,92 ± 4,26
CQD_{KK}	0,91	380	465	-24,67 ± 2,26

Iz rezultata prikazanih u **Tablici 11**, može se uočiti kako se uzorak CQD_{KK+Arg} odlikuje najvećim QY od 4,59 %, dok je najmanji QY određen za CQD_{KK} od 0,91 %. Za razliku od QY modelnih CQD (**Tablica 6**), biomasa *N*-dopirana ispitivanim aminokiselinama pokazala je vrlo nizak QY. Da biomasa, iako dopirana dušikom, može iskazivati vrlo nizak QY koji ograničava njenu uporabu u CQD tehnologiji govore podatci Jing i sur., 2019. te Meng i sur., 2019. **Slikom 12** prikazana je usporedba QY referenta kinin sulfata i QY pripravljenih uzoraka CQD iz kore klementine. S obzirom na nagibe pravaca za svaki odgovarajući uzorak, jasno se može razaznati da je QY pripremljenih uzoraka kore klementine puno niži u odnosu na kinin sulfat kao i u odnosu na modelne *N*-dopirane CQD (**Slika 4**).

Površinski naboj CQD uzoraka na bazi kore klementine izmjeren pri pH = 7, upućuje na moguću pojavu deprotoniranja prisutnih funkcijskih skupina na površini uslijed negativnih vrijednosti *ζ*-potencijala. Naime, uzorku CQD_{KK} dobivenom iz ekstrakta kore klementine bez dodatka aminokiseline izmjeren je *ζ*-potencijal od (-24,67 ± 2,26) mV, dok su vrijednosti za CQD_{KK+Leu} pomaknute prema negativnijim vrijednostima u usporedbi sa svim uzorcima CQD dobivenih na bazi kore klementine (-27,92 ± 4,26 mV). Uzorku s najvećim QY od 4,59 %,

CQD_{KK+Arg}, vrijednosti *ζ*-potencijala su pomaknute prema manje negativnim vrijednostima od (-6,24 ± 2,00) mV što upućuje na moguće promjene na površini čestica CQD uslijed modifikacije prisutnih funkcijskih skupina. Literatura upućuje da se odabirom vrste aminokiseline kao *N*-dopanta, pH medija i načina priprave CQD može utjecati na površinski naboj čestica (Pandit i sur., 2019).



Slika 12. Prikaz ovisnosti absorbancije i integriranog intenziteta fluorescencije – određivanje QY za uzorke CQD na bazi kore klementine.

U **Tablici 12.** prikazani su atomski udjeli elemenata C, O i N u uzorcima CQD na bazi kore klementine. Za razliku od modelnih uzoraka CQD, u slučaju kore klementine, postoji određeni trend ovisnosti udjela dušika o QY (r = 0,913; p <0,05). Naime, najmanji QY određen je kod CQD_{KK} od QY = 0,91 % gdje EDS analizom nije detektiran dušik. Štoviše, najveći QY od 4,59 % zabilježen je kod uzorka CQD_{KK+Arg} s najvećim postotkom dušika od 11,60 % te je *ζ*-potencijal bio pomaknut prema manje negativnim vrijednostima. Iako se ovaj trend ne može primijeniti na sve uzorke, potrebno je naglasiti da veće razlike između QY uzoraka CQD_{KK+His}, CQD_{KK+Ala} i CQD_{KK+Lys} nisu uočene. Usporedbom rezultata s modelnim sustavima CQD (r = 0,151; p <0,05), u slučaju uzoraka CQD dobivenih na bazi kore klementine uočena je korelacija između QY i udjela dušikova elementa u uzorcima CQD.

Tablica 12. Rezultati EDS analize za uzorke CQD na bazi kore klementine.

	Maseni udio %			**Atomski udio %**		
Uzorak CQD	**C (%)**	**O (%)**	**N (%)**	**C (%)**	**O (%)**	**N (%)**
CQD_{KK+Arg}	57,84	26,69	11,60	63,99	24,66	11,01
CQD_{KK+Lys}	57,00	31,22	10,81	63,29	26,03	10,29
CQD_{KK+Ala}	57,87	31,40	7,17	65,09	26,51	6,91
CQD_{KK+His}	56,25	28,96	9,77	63,54	24,55	9,46
CQD_{KK+Trp}	60,13	28,83	3,56	68,74	24,74	3,49
CQD_{KK+Leu}	67,79	24,13	3,23	74,96	20,03	3,23
CQD_{KK}	66,83	29,50	-	74,05	24,45	-

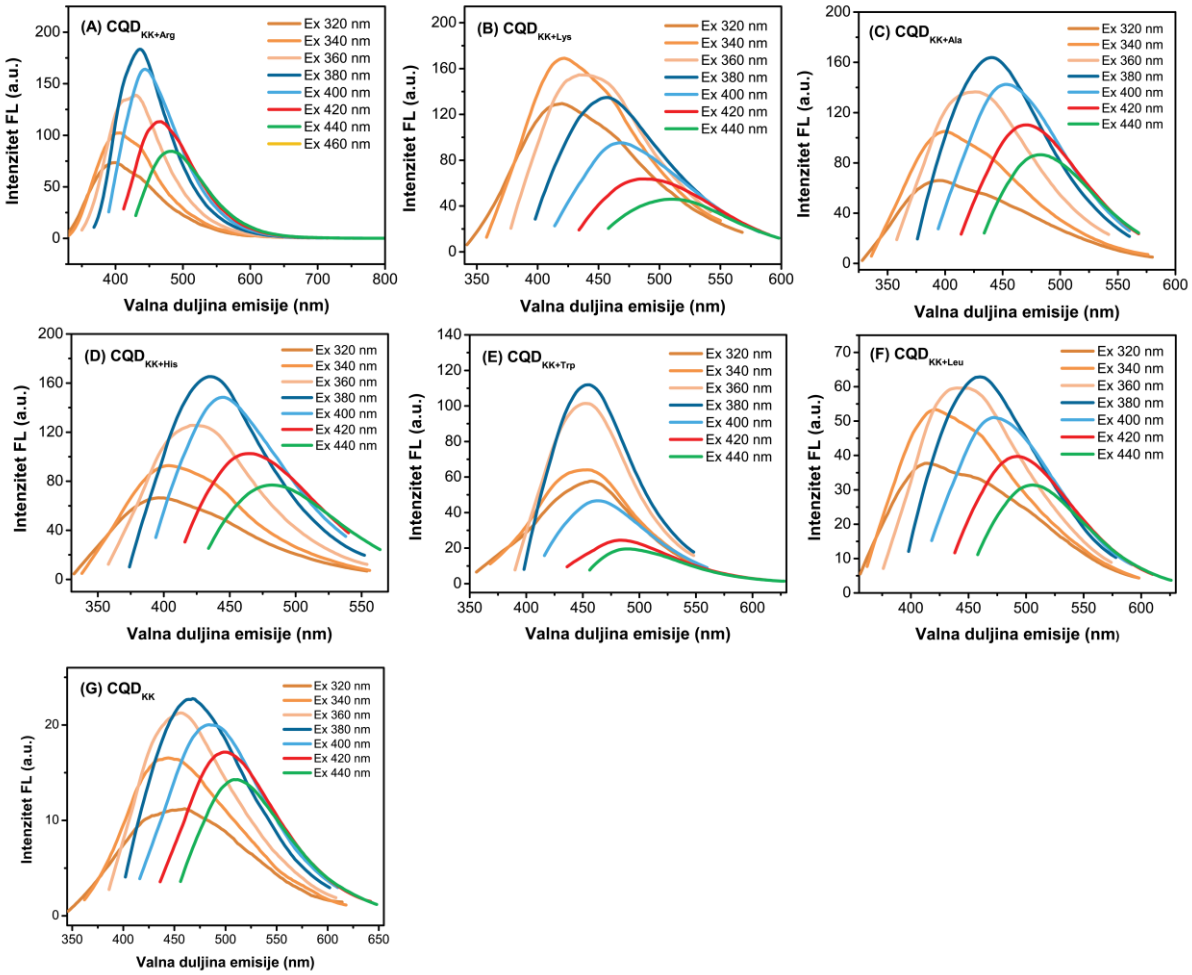
Istraživanje stupnja disperzivnosti CQD u vodenom mediju prije i nakon pročišćavanja prikazano je **Tablicom 13**. U slučaju modelnih CQD na bazi limunske kiseline mogle su se uočiti neznatne razlike u disperzivnosti prije i poslije pročišćavanja (**Tablica 9**). Međutim, u slučaju kore klementine, ove razlike su znatno veće (**Tablica 13**). Tako je u slučaju svih ispitanih uzoraka stupanj disperzivnosti prije pročišćavanja značajno niži u odnosu na uzorke nakon pročišćavanja. To se može protumačiti činjenicom da termalnim tretiranjem kore klementine nastaje značajna količina nusprodukata razgradnje koja stajanjem u vodenom mediju sedimentira te se, nakon centrifugiranja i filtriranja kroz filter špricu pora 0,2 μm, veliki udio nečistoća otkloni.

Tablica 13. Stupanj disperzivnosti CQD na bazi kore klementine.

Uzorak	**Prije pročišćavanja**	**Poslije pročišćavanja**
	Srednje vrijednosti stupnja disperzivnosti / %	
CQD_{KK+Arg}	69,37 ± 6,10	96,06 ± 1,57
CQD_{KK+Lys}	74,33 ± 5,68	97,23 ± 1,24
CQD_{KK+Ala}	70,78 ± 6,72	99,31 ± 3,42
CQD_{KK+His}	72,25 ± 7,84	99,28 ± 3,16
CQD_{KK+Trp}	78,36 ± 2,88	96,98 ± 2,16
CQD_{KK+Leu}	78,08 ± 4,60	98,39 ± 0,94
CQD_{KK}	70,38 ± 7,75	98,06 ± 1,53

Uzorci CQD na bazi kore klementine ispitani su na ovisnost valne duljine emisije o valnoj duljini ekscitacije, utjecaj pojedinog otapala na sposobnost fotoluminescencije, utjecaj pH medija na intenzitet fotoluminescencije te na odziv u prisutnosti određenih metalnih iona.

Zbog vrlo niskog QY, uzorak CQD_{KK} ispitan je samo na utjecaj valne duljine ekscitacije na valnu duljinu emisije te je uočen maksimum valne duljine emisije λ_{EMmax} = 465 nm pri valnoj duljini ekscitacije od 380 nm (**Slika 13**). U usporedbi s CQD_{CA} (λ_{EX} = 320 nm, λ_{EM} = 405 nm; **Slika 6A**), može se uočiti značajan pomak emisije ka crvenom području kod uzorka CQD_{KK} (λ_{EX} = 380 nm; λ_{EX} = 465 nm).



Slika 13. Fluorescencijski spektri emisije CQD na bazi kore klementine (A) CQD_{KK+Arg}, (B) CQD_{KK+Lys}, (C) CQD_{KK+Ala}, (D) CQD_{KK+His}, (E) CQD_{KK+Trp}, (F) CQD_{KK+Leu} i (G) CQD_{KK} u ovisnosti o valnoj duljini ekscitacije od 320 nm do 440 nm.

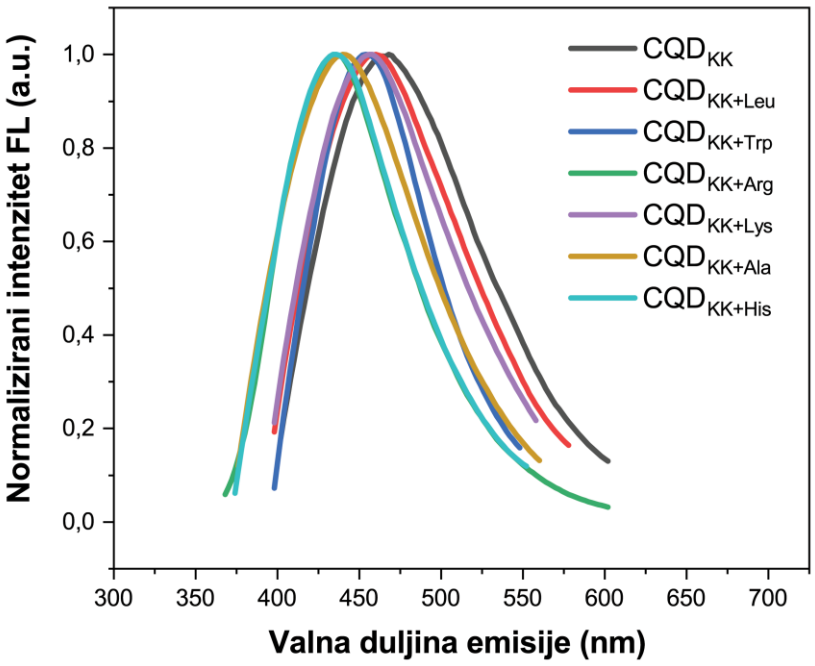
Optičkom karakterizacijom ostalih uzoraka CQD na bazi kore klementine analiziranim pri pH = 7 i prikazanih na **Slici 13 i u Tablici 11** iskazani su maksimumi valnih duljina emisije o ovisnosti valne duljine ekscitacije kako slijedi:

1. Maksimum valne duljine emisije za CQD_{KK+Arg} uzorak određen je λ_{EMmax} = 436 nm pri λ_{EXmax} = 380 nm;
2. Maksimum valne duljine emisije za CQD_{KK+Lys} uzorak određen je λ_{EMmax} = 421 nm pri λ_{EXmax} = 340 nm;

3. Maksimum valne duljine emisije za CQD_{KK+Ala} uzorak određen je λ_{EMmax} = 440 nm pri λ_{EXmax} = 380 nm;
4. Maksimum valne duljine emisije za CQD_{KK+His} uzorak određen je λ_{EMmax} = 437 nm pri λ_{EXmax} = 380 nm;
5. Maksimum valne duljine emisije za CQD_{KK+Trp} uzorak određen je λ_{EMmax} = 453 nm pri λ_{EXmax} = 380 nm;
6. Maksimum valne duljine emisije za CQD_{KK+Leu} uzorak određen je λ_{EMmax} = 465 nm pri λ_{EXmax} = 380 nm.

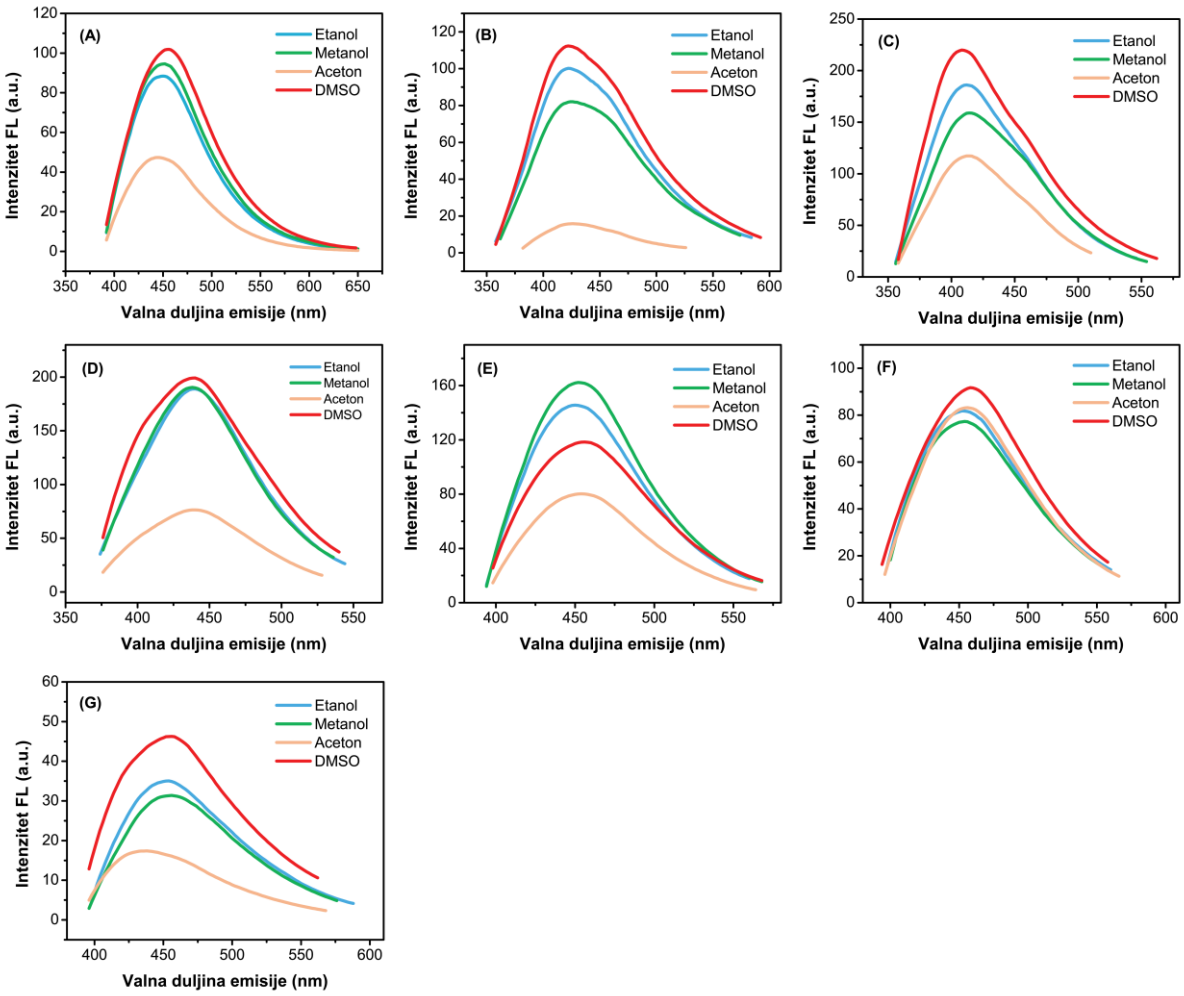
Kada se CQD_{KK} usporedi sa svojim aminokiselinama *N*-dopiranim analozima, tada se može zamijetiti da svi uzorci *N*-dopiranih CQD na bazi kore klementine pokazuju plavi pomak, pri čemu CQD_{KK+Arg} i CQD_{KK+His} pokazuju najveći plavi pomak (**Slika 13** i **Slika 14**). Ono što se može izdvojiti kao bitno zajedničko svojstvo svim uzorcima dobivenim iz kore klementine jest izrazita postojanost fluorescencijskih svojstava čak i pri višim valnim duljinama ekscitacije od λ_{EX} = 440 nm.

Usporedbom s modelnim CQD sustavima, uočena je značajnija razlika u optičkim karakteristikama između pripremljenih serija N-CQD. Naime, kod uzoraka CQD na bazi kore klementine (**Slika 13**), pojava fluorescencije je i dalje prisutna i pri višim valnim duljinama ekscitacije (λ_{EX} > 380 nm) te je vidljiv pomak valne duljine emisije prema višim vrijednostima valnih duljina. Ovakva pojava može biti uzrok prisutnih defekata u strukturi, promjena na površini i veličini CQD čestica (Meng i sur., 2019). U znanstvenom radi Tyagi i sur., 2016, opisana je hidrotermalna sinteza CQD iz kore limuna te priprema nanokompozita CQD s titanijevim dioksidom (TiO_2) s potencijalnim fotokatalitičkim djelovanjem. Optičkom karakterizacijom CQD na bazi kore limuna određen je QY od 14 %, dok je utvrđena λ_{EMmax} = 441 nm pri λ_{EX} = 360 nm. Utvrđena je i prilagodljiva fotoluminescencijska priroda CQD s obzirom na promjene u vrijednostima valnih duljina ekscitacija λ_{EX} (pomaci ka višim vrijednostima valnih duljina emisije s većom λ_{EX} ≤ 540 nm) čime je pokazano višebojno svojstvo CQD i potencijal za primjenu u staničnom oslikavanju (λ_{EX} = 488 nm, λ_{EM} = 535 nm).



Slika 14. Normalizirani emisijski spektri fluorescencije CQD na bazi kore klementine pri λ_{EX} = 380 nm i pH = 7.

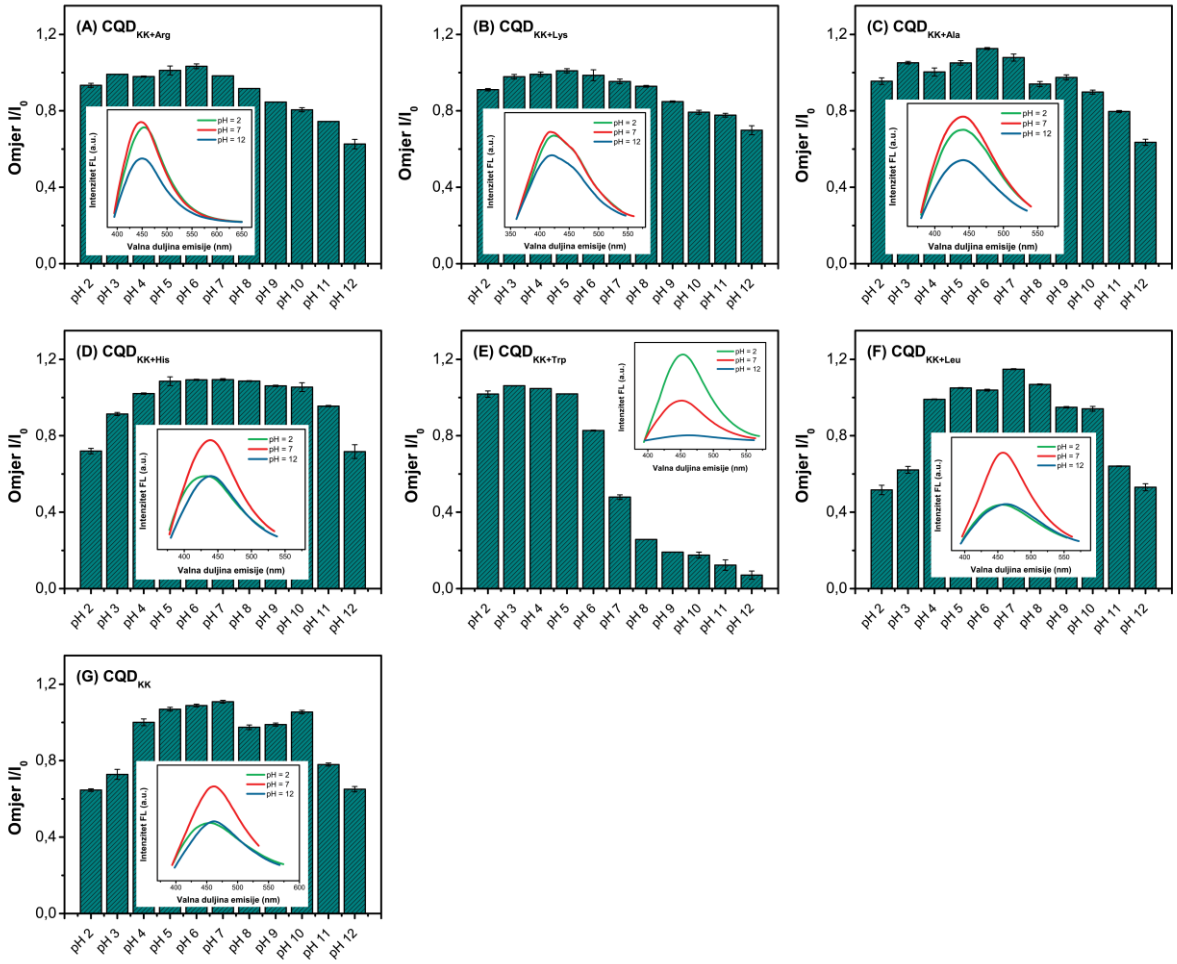
Razlike CQD na bazi kore klementine uočavaju se i kod utjecaja otapala na intenzitet fluorescencije gdje je najveće odstupanje zabilježeno kod acetona, kao i u slučaju modelnih CQD (**Slika 15**), gdje je iskazan najniži intenzitet fluorescencije ispitanih CQD. To dodatno upućuje na nemogućnost acetona za dispergiranje CQD čestica i stvaranje stabilnih interakcija što za rezultat ima prigušenje signala fluorescencije. U uzorcima CQD na bazi kore klementine, osim u slučaju CQD_{KK+Trp}, uočen je trend pojačanja signala intenziteta fluorescencije u DMSO otapalu. U alkoholnim otapalima, etanolu i metanolu, nisu uočene značajne razlike u promjeni intenziteta fluorescencije niti kod jednog ispitanog uzorka CQD.



Slika 15. Fluorescencijski spektri emisije modelnih uzoraka CQD u ovisnosti o vrsti otapala za (A) CQD_{KK+Arg}, (B) CQD_{KK+Lys}, (C) CQD_{KK+Ala}, (D) CQD_{KK+His} i (E) CQD_{KK+Trp}, (F) CQD_{KK+Leu} te (G) (B) CQD_{KK} pri λ_{EXmax} = 380 nm.

Kako bi se objasnio potencijalni mehanizam pojačanja signala intenziteta fotoluminescencije ispitivanih CQD, moguće je pretpostaviti da se stvaraju određene intermolekularne interakcije između CQD i samog otapala. Ako se pobliže pogleda priroda navedenih otapala, usporede se njihovi indeksi relativne polarnosti (aceton – 0,355; DMSO – 0,444; etanol – 0,654; metanol – 0,762) i mogućnosti stvaranja interakcija, može se zaključiti da kemijska priroda otapala uvelike može utjecati na disperzivnost CQD uzoraka i na njihova luminescentna svojstva (Chang i sur., 2022). Također, svojstvo protičnosti nekog otapala ovisi o dostupnosti protona koji se može donirati u vodikovu vezu. Zanimljivo je da postoji dovoljno znanstvenih studija o mogućnostima utjecaja otapala na fotoluminescentna svojstva (Zhang i sur., 2017; Chao i sur., 2018; Zhao i Zhu 2018; Chang i sur., 2022), dok se potencijalno objašnjenje stvaranja interakcija između otapala i CQD gotovo nigdje ne pronalazi. Zapravo se može reći da

molekule otapala mogu imati značajan utjecaj na sposobnost fotoluminescencije CQD uzoraka tvoreći interakcije između molekula otapala i funkcijskih skupina na površini CQD kroz učinak vodikovih veza, dipol-dipol interakcija, konformacijskih promjena te unutarnjeg prijenosa naboja (Zhang i sur., 2017; Chang i sur., 2022). S obzirom da su hidrofilne CQD bogate hidroksilnim i amino skupinama na površini čestica, u ovom slučaju polarna protična otapala (kao što je voda, etanol, metanol) mogu olakšano stvarati vodikove veze. Upravo se iz studije Chang i sur., 2022 moglo zaključiti da se uslijed prisustva hidroksilnih i amino skupina na površini čestica, mogu stvoriti vodikove interakcije između CQD i vode kao otapala stvarajući stabilnu suspenziju i uzrokujući plavu fotoluminescenciju. Kod metanola, osim što je uočeno slabije prigušenje intenziteta fotoluminescencije, moglo se uočiti i nestabilnost suspenzije nakon kratkog vremena stajanja što je rezultat stvaranja slabijih vodikovih veza. Zapravo se DMSO smatra polarnim aprotičnim otapalom s visokim dipolnim momentom (3,96 D) koji zbog svojih kemijskih karakteristika može biti i pogodno otapalo za organske materijale (Venkataramanan i sur., 2018). Zbog prisutnosti hidroksilnih i karboksilnih skupina na površini CQD (skupine koje su ujedno proton donori), DMSO može stvarati dipol-dipol interakcije, odnosno slabe vodikove veze. Primjerice, karboksilna skupina se sastoji od hidroksilne (-OH) i karbonilne (C=O) i upravo ovakva kombinacija pridaje skupini polarnost, elektronegativnost i mogućnost stvaranja različitih interakcija. Prema studiji Ren i sur. (2022) takve funkcijske skupine imaju sposobnost stvaranja vodikovih veza (kao proton donor/akceptor) i mogu stvarati jake vodikove veze s aprotičnim otapalom kao što je DMSO. Sumirano, sama fotoluminescencijska svojstva CQD u određenom otapalu će ovisiti o kombinaciji čimbenika kao što su polarnost, dipolni moment, elektronegativnost i općenito mogućnost stvaranja interakcija otapala. Može se potencijalno pretpostaviti da je prigušenje signala u acetonu rezultat izrazito niske polarnosti u odnosu na ostala testirana otapala, dok postojanje polarizabilnijeg i elektronegativnijeg sumpora (elektronegativniji je od ugljika) DMSO molekule omogućuje stvaranje jačih interakcija.



Slika 16. Ovisnost omjera intenziteta fluorescencije CQD na bazi kore klementine o pH vrijednosti medija. (A) CQD_{KK+Arg}, (B) CQD_{KK+Lys}, (C) CQD_{KK+Ala}, (D) CQD_{KK+His} i (E) CQD_{KK+Trp}, (F) CQD_{KK+Leu} te (G) CQD_{KK} pri λ_{EXmax} = 380 nm.

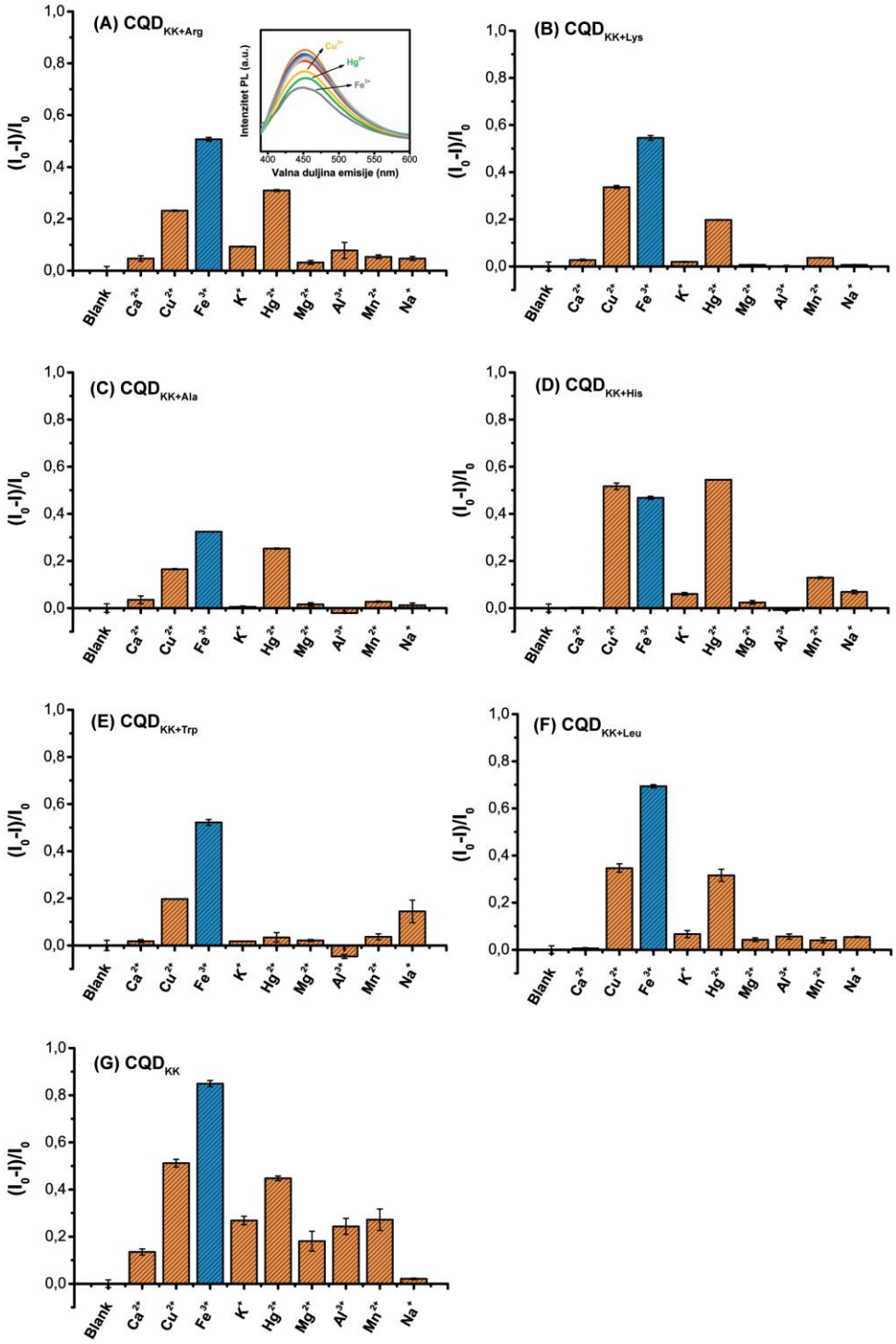
Ovisnost fluorescencije CQD na bazi kore klementine o pH otopine prikazana je na **Slici 16**. Za CQD_{KK+Arg} (**Slika 16A**) uočava se stabilnost uzorka u kiselim uvjetima (pH = 2 – 7), dok se pri višim pH vrijednostima od pH = 8 – 12 uočava značajniji pad intenziteta fluorescencije (**Slika 16D**). Nešto drugačija promjena intenziteta fluorescencije može se zamijetiti za CQD_{KK+Trp} gdje intenzitet fluorescencije postepeno opada s povećanjem pH medija, iskazujući nestabilnost u bazičnim uvjetima (**Slika 16E**), dok ostali uzorci CQD na bazi kore klementine pokazuju karakteristična ponašanja stabilnosti unutar slabo kiselih i slabo bazičnih uvjeta, gdje u rasponu od pH = 4 - 10 nisu uočene značajne razlike u intenzitetu fotoluminescencije što ujedno upućuje na dobru stabilnost suspenzija pripremljenih CQD. U znanstvenom radu Sachdev i Gopinath (2015), pripremljene su CQD iz lista korijandera gdje je uočen porast intenziteta fluorescencije sa porastom pH suspenzije CQD. Pri tome je u lužnatim uvjetima

(pH = 12), intenzitet fluorescencije dosegnuo maksimum i nije se mijenjao s daljnjim povećanjem pH vrijednosti suspenzije. Kao potencijalno objašnjenje proporcionalne ovisnosti pH medija i intenziteta fluorescencija, navodi se promjena naboja na površini uslijed ionizacije hidroksilnih i karboksilnih funkcijskih skupina. S druge strane, Issa i sur. (2020) za *N*-CQD iz karboksimetilceluloze i polietilenimina navode značajnije promjene u izrazito kiselim uvjetima gdje se intenzitet fluorescencije povećava, u području od pH = 6 – 12 je uglavnom nepromijenjen, dok naglo pada povećanjem pH medija iznad pH = 12. Kao i u prethodnom slučaju, navedeno se tumači protoniranjem/deprotoniranjem hidroksilnih i karboksilnih skupina koje su prisutne na površini *N*-dopiranih CQD.

4.4. Ispitivanje selektivnosti CQD_{KK} na metalne ione

CQD iz kore klementine ispitane su na odziv na ione metalnih soli Ca^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{3+}, K^{+}, Hg^{2+}, Mg^{2+}, Al^{3+}, Mn^{2+} i Na^{+} u svrhu potencijalne uporabe kao fluorescetnih nanoprobi u selektivnoj detekciji metalnih iona.

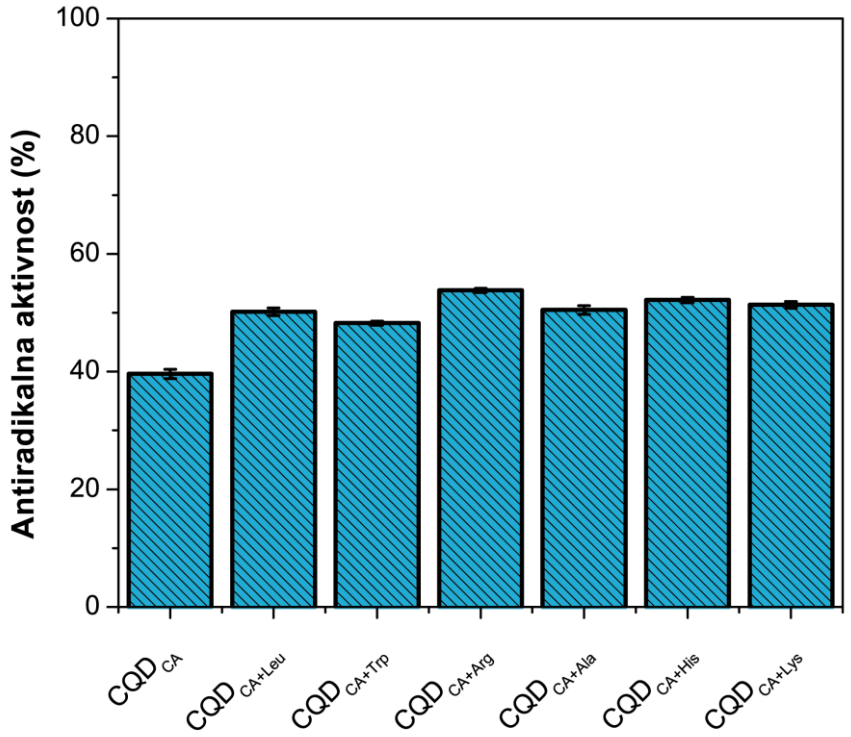
Na **Slici 17** prikazani su grafički prikazi ovisnosti omjera $(I_0\text{-}I)/I_0$ gdje I_0 označava referentni sustav bez dodatka metalnih iona, a I sustav s dodatkom metalnih iona. Iako CQD_{KK} sustav pokazuje visok afinitet prema Fe^{3+} ionima, vidljivo je i značajno prigušenje signala kod drugih iona poput Cu^{2+}, Hg^{2+} i Mn^{2+} (> 20 %). Kod uzorka s najvećim određenim QY, CQD_{KK+Arg}, uočen je također visok afinitet prema Fe^{3+} ionima, ali i prema Hg^{2+} i Cu^{2+} ionima. Vrlo slična situacija je u slučaju CQD_{KK+Leu} i CQD_{KK+His} te se može zaključiti da s obzirom da većina ispitanih CQD ne pokazuje visoki afinitet (između 80 do 90 %) prema jednom od ispitanih metalnih iona kao i selektivan odziv na pojedinačni ion, da CQD na bazi kore klementine nisu pogodni za razvoj analitičke metode detekcije pojedinačnih metalnih iona.



Slika 17. Odziv fluorescentnih nanoprobi (A) CQD_{KK+Arg}; umetak: izdvojeni spektri s Fe^{3+}, Hg^{2+} i Cu^{2+} ionima , (B) CQD_{KK+Lys}, (C) CQD_{KK+Ala}, (D) CQD_{KK+His} i (E) CQD_{KK+Trp}, (F) CQD_{KK+Leu} te (G) CQD_{KK} na odziv intenziteta fotoluminescencije u prisutnosti različitih metalnih iona (λ_{EXmax} = 380 nm).

4.5. Ispitivanje antiradikalne aktivnosti sintetiziranih CQD – biološka aktivnost

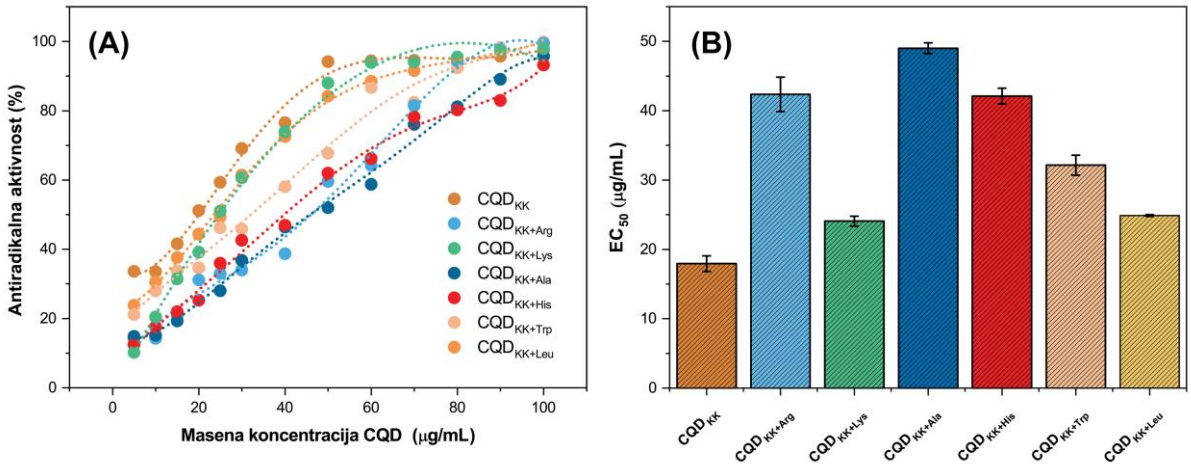
Kako bi se ispitala potencijalna biološka primjena obje serije uzoraka, modelnih CQD i CQD na bazi kore klementine, provelo se ispitivanje antiradikalne aktivnosti CQD korištenjem DPPH metode. Na **Slici 18** prikazan je grafički prikaz antiradikalnih aktivnosti svih odabranih modelnih uzoraka CQD pri najvišim testiranim koncentracijama CQD od γ = 100 μg/mL.



Slika 18. Antiradikalna aktivnost modelnih CQD.

Iz **Slike 18** se može uočiti da su pri najvišim testiranim koncentracijama CQD od 100 μg/mL, modelni uzorci CQD pokazali zanemarivu antiradikalnu aktivnost. Najnižu antiradikalnu aktivnost pokazao je uzorak CQD_{CA} s aktivnošću od (39,62 ± 0,79) %, dok najvišu CQD_{CA+Arg} od (53,81 ± 0,34) %.

Međutim, nešto drugačija situacija je uočena s CQD dobivenih iz kore klementine (**Slika 19**). Za razliku od modelnih CQD, CQD dobiveni iz kore klementine pokazuju znatno višu antiradikalnu aktivnost.



Slika 19. Antiradikalna aktivnost CQD na bazi kore klementine. (A) Utjecaj masene koncentracije CQD na antiradikalnu aktivnost, (B) EC_{50}.

Svi CQD uzorci na bazi kore klementine su pri najvišoj koncentraciji (γ = 100 μg/mL) pokazali izrazito visoku antiradikalnu aktivnost veću od 93 % (**Slika 19 (A)**), pri čemu je najniži EC_{50} određen u slučaju CQD_{KK} s EC_{50} = (17,94 ± 1,12) μg/mL (**Slika 19 (B)**). S druge strane, najviši EC_{50} određen je u slučaju CQD_{KK+Ala} s vrijednosti EC_{50} = (49,01 ± 0,77) μg/mL (**Slika 19 (B)**). U znanstvenom radu Šafranko i sur. 2021c, koji se temelji na inovativnoj ekstrakcijskoj tehnici pomoću supkritične vode (SWE, engl. *Subcritical Water Extraction*), pokazalo se da termalno tretiranje ekstrakata kore mandarine pri vrlo visokim temperaturama između 130 °C i 220 °C pogoduje antiradikalnoj aktivnosti određenoj DPPH metodom. Zanimljivo je da pri vrlo visokim temperaturama iznad 160 °C dolazi do degradacije kompleksnih polifenolnih spojeva koji su nositelji antiradikalne aktivnosti te nastaju fragmenti koji se vežu na površinu CQD. Obzirom da je hidrotermalni postupak sinteze CQD iz ekstrakata kore klementine provođen pri 180 °C, povećana antiradikalna aktivnost ne iznenađuje, ukoliko se uzme u obzir da se degradacijski fragmenti nositelja antiradikalne aktivnosti vežu na površinu CQD. Svakako je zanimljivo da u u CQD_{KK} koji pokazuje najvišu antiradikalnu aktivnost prevladavaju funkcijske skupine poput hidroksilnih, karboksilnih i karbonilnih, a prisustvo dušika nije detektirano EDS analizom (**Tablica 14**). S druge strane u aminokiselinama *N*-dopiranim CQD na bazi kore klementine, gdje je detektirana prisutnost dušika, uočava se nešto manja antiradikalna aktivnost. Sukladno literaturnim navodima uzorci CQD s visokim postotkom hidroksilnih i karboksilnih skupina omogućuju antiradikalnu aktivnost preko mehanizma prijenosa vodikovog atoma (HAT). Nadalje, znanstveni radovi (Chen i sur., 2006; Sordon i sur., 2019; Ji i sur., 2019) čak ukazuju na važnost izračuna parametara poput energije disocijacije veze (BDE), ionizacijskog potencijala i drugih kako bi se predvidjela sposobnost doniranja vodika. Ukoliko su energija disocijacije veze i ionizacijski potencijal niži, inaktivacija radikala bi trebala biti brža i lakša. U

znanstvenom radu Chen i sur. (2006), provele su se teoretske kalkulacije različitih parametara poput BDE te je zaključeno da niži BDE imaju O-H skupine u usporedbi s N-H skupinama, što upućuje na veći doprinos O-H skupina antiradikalnoj aktivnosti u određenim spojevima. Također, veliku ulogu igra i stereokemija molekula te pozicija pojedinih funkcijskih skupina koje mogu biti nositelji antiradikalne aktivnosti (Chen i sur., 2006; Sordon i sur., 2019). Smatra se da prisutnost amino skupina također ima pozitivan učinak na antiradikalnu aktivnost CQD čestica preko HAT mehanizma doniranjem vodika preko O-H ili COOH skupine. Sudjelovanje amino skupine se može objasniti indirektnim HAT mehanizmom gdje -NH_2 skupina donira elektrone, stvara se aminium radikal te DPPH anion. Drugi korak uključuje deprotoniranje aminium radikala i nastajanje stabilnog DPPH-H kompleksa žute boje. Također se navodi da reakciji pripomaže solvatacija metanolom koja dodatno stabilizira ionske vrste (Ji i sur., 2019). Međutim, rezultati ove disertacije pokazuju da prisustvo amino skupina u CQD ne mora obavezno podrazumijevati i njihovu bolju antiradikalnu aktivnost.

Na temelju navedenih rezultata, može se zaključiti kako *N*-CQD na bazi kore klementine posjeduju izvrsnu disperzivnost u vodenom mediju nakon pročišćavanja uzorka te iskazuju izvrsna antioksidacijska svojstva. Međutim, kora klementine ne predstavlja pogodnu sirovinu za proizvodnju CQD i *N*-dopiranih analoga koji bi se mogli primijeniti u biomedicini i razvoju analitičkih metoda za detekciju iona metala. Naime, nizak QY ograničava primjenu *N*-CQD u staničnom oslikavanju, dok ujedno uz neselektivan odziv prema pojedinom ionu ograničava i razvoj analitičkih metoda za detekciju metalnih iona.

4.6. Priprema i karakterizacija hibridnog uzorka – optimiranje procesa

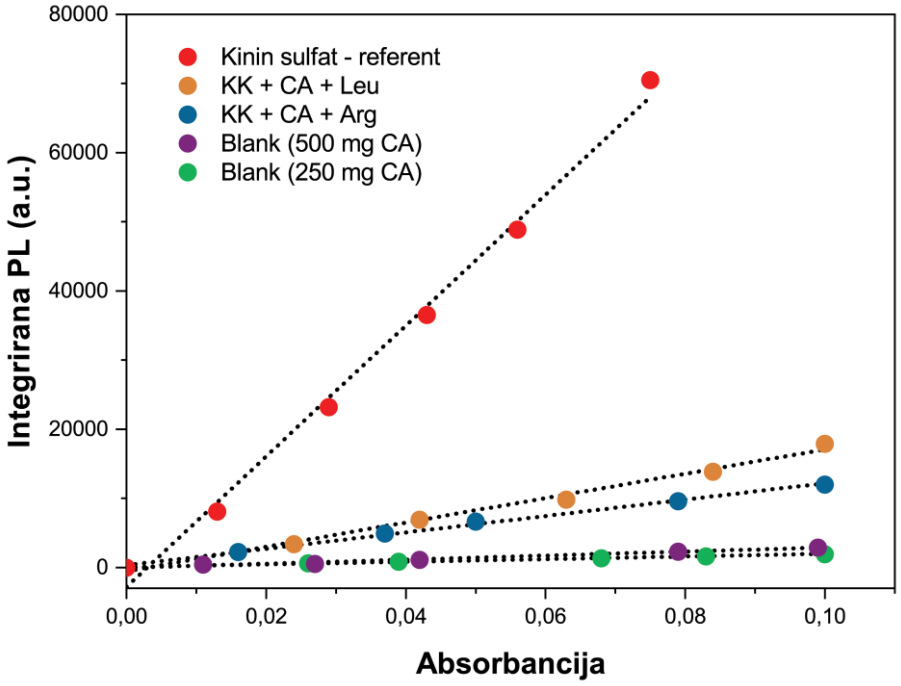
Na temelju rezultata dobivenih pripravom modelnih CQD i CQD na bazi kore klementine, uočene su sljedeće značajke: modelne CQD iskazuju vrlo visok QY s najvećim određenim QY od 36,43 % za CQD_{CA+Leu}, dok je najveći QY za uzorak CQD_{KK+Arg} na bazi kore klementine određen u vrijednosti od 4,59 %. Zanimljivo je također da za uzorke modelnih CQD pri višim valnim duljinama pobude λ_{EX} > 400 nm sposobnost fluorescencije značajno opada, dok kod uzoraka CQD na bazi kore klementine je pojava fluorescencije prisutna čak i do λ_{EX} > 440 nm s vidljivim pomacima valnih duljina emisije prema crvenom području. Također se pokazalo da uzorak CQD_{CA+Leu} pokazuje visoko selektivan odziv prema Fe^{3+} ionima u odnosu na sve testirane ione, dok kod CQD na bazi kore klementine nije uočen niti visoki afinitet prema pojedinom ionu niti selektivan odziv. Ispitivanjem antiradikalne aktivnosti obje serije uzoraka, uočava se da modelni CQD uzorci pokazuju vrlo nisku, gotovo zanemarivu, antiradikalnu aktivnost, dok uzorci CQD na bazi kore klementine iskazuju vrlo visoku aktivnost s najnižim određenim EC_{50} = (17,94 ± 1,12) μg/mL za CQD_{KK}.

Na bazi gore navedenog, u daljnjoj potrazi za „idealnim“ CQD provedena je sinteza hibridnog uzorka CQD ($CQD_{CA+KK+Leu}$) kako bi se dobili CQD uzorci koji će poprimiti kombinaciju svih ovih poželjnih svojstava, slijedeći principe iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije (kore klementine) i s minimalnim mogućim dodatkom limunske kiseline. U te svrhe, provedena je predoptimizacija procesa gdje se procjenjivala efikasnost procesa koristeći se vodenim ekstraktom klementine, varirajući masu limunske kiseline (250 – 500 mg) te vrstu aminokiseline (leucin i arginin; 175 mg). Plan pokusa i rezultati kvantnog prinosa su prikazani u **Tablici 14**.

Tablica 14. Plan pokusa predoptimizacije za $CQD_{CA+KK+Leu}$.

Ekstrakt (1:30) / mL	Masa limunske kiseline (mg) u 5 mL	Masa leucin / mg	Masa arginin / mg	QY / %
15	250	-	-	1,25
15	500	-	-	2,05
Poslije određivanja kvantnog prinosa Blank sustava				
15	500	175	-	10,04
15	500	-	175	7,36

Iz **Tablice 14** vidljivo je da se reakcijska smjesa za sintezu CQD hibrida najboljeg QY sastojala od 15 mL vodenog ekstrakta kore klementine (omjera kruto:tekuće 1:30), limunske kiseline od 500 mg te 175 mg leucina, pri čemu je QY $CQD_{CA+KK+Leu}$ iznosio 10,04 %. Variranjem samo u masi limunske kiseline bez dodatka aminokiseline uočen je vrlo nizak QY i varirao je između QY = 1,25 – 2,05 %. Niži QY od onoga uz dodatak Leu dobiveno je dodatkom aminokiseline Arg pri čemu je QY iznosio 7,36 %. Ovisnost absorbancije hibridnih CQD o integriranom intenzitetu fluorescencije prikazana je na **Slici 20**.



Slika 20. Ovisnost absorbancije i integriranog intenziteta fotoluminescencije hibridnih uzoraka CQD.

Također, iz rezultata prikazanih u **Tablici 14** i usporedbom već dobivenih rezultata modelnih sustava CQD i CQD dobivenih iz kore klementine, moguće je zaključiti da dodatak ekstrakta kore klementine može uzrokovati značajni pad u QY. U slučaju modelnih sustava, QY uzoraka nakon dodatka odgovarajuće aminokiseline određen je u rasponu od 5,11 % (CQD_{CA+Phe}) do 36,43 % (CQD_{CA+Leu}). Kod uzoraka *N*-CQD na bazi kore klementine QY je određen u rasponu od 1,72 % (CQD_{KK+Leu}) do 4,59 % (CQD_{KK+Arg}) što upućuje na značajni pad QY u odnosu na modelne sustave. Slično ponašanje uočeno je kod predoptimizacije hibridnih uzoraka CQD (**Tablica 14**). Postupnim dodatkom limunske kiseline zabilježen je rast u QY, dok je značajni rast uočen nakon dodatka aminokiseline. Potencijalno rješenje problema nižeg QY nalazi se u ispitivanju i promjenama uvjeta sinteze (temperatura, vrijeme reakcije, omjeri prekursor : *N*-dopant, pH medija,…) te također može ovisiti o kompleksnosti ugljikova prekursora korištenog u sintezi CQD (Wu i sur., 2015; Issa i sur., 2020).

Na temelju gore navedenog, limunska kiselina, vodeni ekstrakt kore klementine te aminokiselina Leu kao *N*-dopant, izabrani su za daljnje optimiranje procesa s ciljem dobivanja maksimalnog QY uzorka $CQD_{CA+KK+Leu}$. Daljnji koraci uključuju optimizaciju procesa RSM metodom primjenom plošno centralnog kompozitnog plana pokusa (CCF dizajn) s kojim je dobiveno sveukupno 11 eksperimenata. U eksperimentu su se promatrale dvije nezavisne varijable: X_1: temperatura (160 – 200 °C) i X_2: vrijeme sinteze (9 – 12 h), dok je zavisna varijabla ili odziv označen kao y_1: QY (%) (**Tablica 15 i 16**). Nakon provedbe eksperimenata, rezultati QY za svaki pokus pojedinačno prikazani su tablično (**Tablica 16 i Tablica 17**).

Tablica 15. Nezavisne varijable u CCF dizajnu za ispitivanje odziva QY.

Nezavisne varijable	**Simbol**	**Razina**		
		Najniža (-1)	Centralna (0)	Najviša (+1)
Temperatura (°C)	X_1	160	180	200
Vrijeme reakcije (h)	X_2	6	9	12

Tablica 16. CCF plan pokusa s eksperimentalnim rezultatima QY za uzorak $CQD_{CA+KK+Leu}$.

	X_1	X_2	y_1
Rb. pokusa	**Temperatura / °C**	**Vrijeme reakcije / h**	**QY / %**
1	160	9	2,03
2	180	9	12,79
3	200	9	16,30
4	180	6	7,82
5	180	9	12,47
6	200	6	14,10
7	200	12	17,04
8	160	12	2,50
9	180	9	13,14
10	180	12	13,75
11	160	6	1,54

Aproksimacijom eksperimentalnih rezultata matematičkim modelima koji odgovara polinomu drugog reda, ispitan je utjecaj nezavisnih varijabli promatranih u sintezi $CQD_{CA+KK+Leu}$ (temperatura i vrijeme reakcije) na zavisnu varijablu QY te je također ispitana i prikladnost razvijenog modela primjenom CCF plana pokusa. Koeficijenti procjene dobiveni su statističkim izračunima nelinearne regresije eksperimentalnih podataka te se ispitala statistička značajnost utjecaja pojedinih parametara ili njihovih interakcija na sam proces.

U **Tablici 17** prikazani su koeficijenti procjene adekvatnosti modela i značajnosti varijabli koja se određuje na temelju *p*-vrijednosti, *F*-vrijednosti, koeficijenta determinacije R^2 i nedostatka modela. Iz **Tablice 17** može se uočiti kako je model polinoma drugog reda značajan s dobivenom *p*-vrijednosti od 0,0004. Nadalje, značajni utjecaj na proces pokazale su obje varijable temperature (X_1) i vrijeme reakcije (X_2), dok je samo kvadrat varijable temperature (X_1^2) pokazao značajan utjecaj na proces.

Tablica 17. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za QY uzorka $CQD_{CA+KK+Leu}$.

Izvor varijabilnosti	**Suma kvadratnih odstupanja**	**Stupnjevi slobode (df)**	**Varijanca MS**	***F*-vrijednost**	***p*-vrijednosti**
Model	328,77	5	65,75	45,51	0,0004
X_1-Temperatura	285,07	1	285,07	197,31	< 0,0001
X_2-Vrijeme	16,07	1	16,07	11,12	0,0207
X_1X_2	0,9919	1	0,9919	0,6865	0,4451
X_1^2	18,13	1	18,13	12,55	0,0165
X_2^2	2,81	1	2,81	1,95	0,2217
Ostatak	7,22	5	1,44		
Nedostatak modela	6,75	3	2,25	9,4	0,0976
Pogreška	0,4783	2	0,2391		
Ukupno	336	10			
R²	**0,9785**				

$p < 0,01$ visoko značajno; $0,01 \leq p < 0,05$ značajno; $p \geq 0,05$ nije značajno.

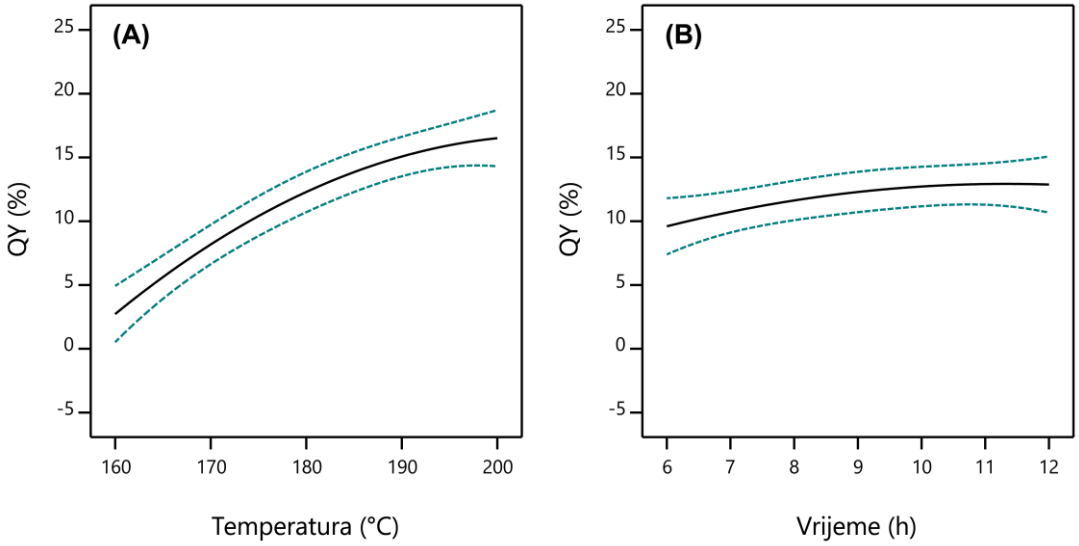
Nedostatak modela s *p*-vrijednosti od 0,0976 te koeficijent determinacije od $R^2 = 0,9785$ također pokazuje primjenjivost i adekvatnost razvijenog modela.

Model je opisan jednadžbom (7):

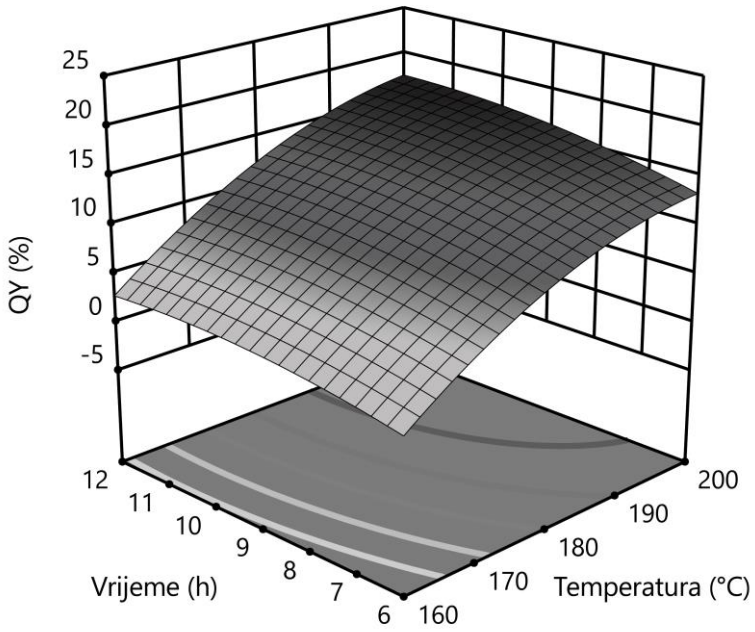
$$y = 12,29 + 6,89X_1 + 1,63X_2 + 0,49X_1X_2 - 2,67X_1^2 - 1,06X_2^2 \quad (7)$$

gdje *y* označava odziv QY, koeficijenti X_1 i X_2 označavaju varijable temperature i vremena reakcije. Jednadžba je prilagođena kodiranim vrijednostima nezavisnih varijabli. Ispitivanjem utjecaja pojedinih parametara na QY, uočeno je kako povišenje temperature i vrijeme reakcije imaju pozitivan i značajan učinak na QY uzoraka $CQD_{CA+KK+Leu}$ (**Slika 21A i 21B**). Na **Slici 22** je prikazan 3D prikaz utjecaja parametara temperature i vremena reakcije na QY koji su proporcionalnog i sinergističkog odnosa. Najveći QY određen je za uzorak 7 gdje je primijenjena temperatura od 200 °C tijekom 12 sati. Potencijalno objašnjenje leži u stupnju polimerizacije i karbonizacije koja dovodi do konačnog produkta CQD s visokim QY. U radu Issa i sur. (2020), sintetizirane su CQD iz karboksimetilceluloze i polietilenimina (LPEI) hidrotermalnom sintezom te je ispitan utjecaj temperature, vremena reakcije i udjela LPEI na

QY. Zaključeno je da povišenje temperature i vrijeme reakcije imaju pozitivan učinak na QY, dok nakon svega 2 sata reakcije (gdje QY doseže svoj maksimum), QY naglo pada. Parametar interakcije varijabli temperature i vremena imao je značajan utjecaj na proces upućujući na to da što je kraće vrijeme tretiranja, potrebna je primjena viših temperatura reakcije.



Slika 21. 2D dijagram ovisnosti pojedine nezavisne varijable – (A) temperature i (B) vremena reakcije na odziv procesa – QY.



Slika 22. 3D dijagram utjecaja temperature i vremena reakcije na QY u procesu sinteze uzorka $CQD_{CA+KK+Leu}$.

Pretpostavka se zapravo temelji na tome da ukoliko se primijene niže temperature, dominantan proces je polimerizacija koja se odvija na nanoskali te vrlo vjerojatno ne dolazi do dovoljne karbonizacije uzorka. Ukoliko se primijene više temperature, tada dolazi do potpune karbonizacije, ali i do nastajanja neželjenih nusprodukata termalne razgradnje i uslijed visokog stupnja karbonizacije, *N*-CQD imaju tendenciju agregacije (Zhang i sur., 2015; Issa i sur., 2019). Skupina znanstvenika Zhang i sur. (2016) ispitivali su utjecaj temperature na optička svojstva i QY *N*-CQD dobivenih iz limunske kiseline i amonijeve otopine. Promjene u QY su se promatrale u temperaturnim intervalima od 120, 140, 160, 180, 200 and 220 °C. Predložen je mehanizam nastajanja *N*-CQD koji se odvija u tri koraka:

1) Kondenzacija – poznato je da ni limunska kiselina niti amonijak nemaju fluorescentna svojstva. Međutim, pri nižoj temperaturi od 120 °C, karboksilne, hidroksilne i amino skupine podliježu reakciji kondenzacije (u ovom koraku do karbonizacije još ne dolazi te se odvijaju i intermolekularne kondenzacije) prilikom čega nastaju manje fluorescentne molekule. Daljnjim povećanjem temperature, dolazi do stvaranja fluorescentnih polimernih lanaca. Kako se temperatura povisuje do 160 °C, tako nastaje sve veći broj manjih lanaca i umrežavanjem nastaju veći lanci koji nemaju ugljikovu jezgru (ali imaju fluorescentna svojstva) te je omjer kisik/ugljik veći u uzorku.
2) Stvaranje ugljikove jezgre – između 160°C i 180 °C, nastali polimerni lanci se karboniziraju te nastaje karbogena jezgra s dijelovima polimernih lanaca. Dio nastalih polimernih lanaca se „troši“ na stvaranje ugljikove jezgre koja dalje raste povišenjem temperature. S obzirom da je brzina nastajanja većih polimernih lanaca veća u odnosu na „trošenje“ za stvaranje ugljikove jezgre u ovom koraku, QY naglo raste.
3) Rast ugljikove jezgre – odvija se u rasponu temperatura između 180 °C i 220 °C kada ugljikova jezgra naglo raste. Broj se polimernih lanaca (funkcijskih skupina) na površini smanjuje te se ubrzanim procesom kondenzacije i karbonizacije manje molekule brže „troše“ za stvaranje ugljikove jezgre što rezultira nižim QY.

Iz gore navedenog, može se zaključiti da QY ovisi o broju nastalih polimernih molekula nositelja funkcijskih skupina te da kompeticija između brzine stvaranja tih polimernih molekula i brzine stvaranja ugljikove jezgre definira svojstva CQD.

Nadalje, optimiranjem procesa po principu ukupne željene funkcije s maksimiziranjem odziva QY, dobiju se optimalni uvjeti za dobivanje QY od 17,16 % hidrotermalnom sintezom koja se provodi pri temperaturi od 199,2 °C kroz 10 h i 29 min (**Tablica 18**). Ovi rezultati su i eksperimentalno potvrđeni s dobivanjem srednje vrijednosti dvaju ponavljanja od QY = (17,52 ± 0.59) %, što bi značilo da je postotak pogreške, odnosno odstupanje od predviđene vrijednosti modela manje od 10 %.

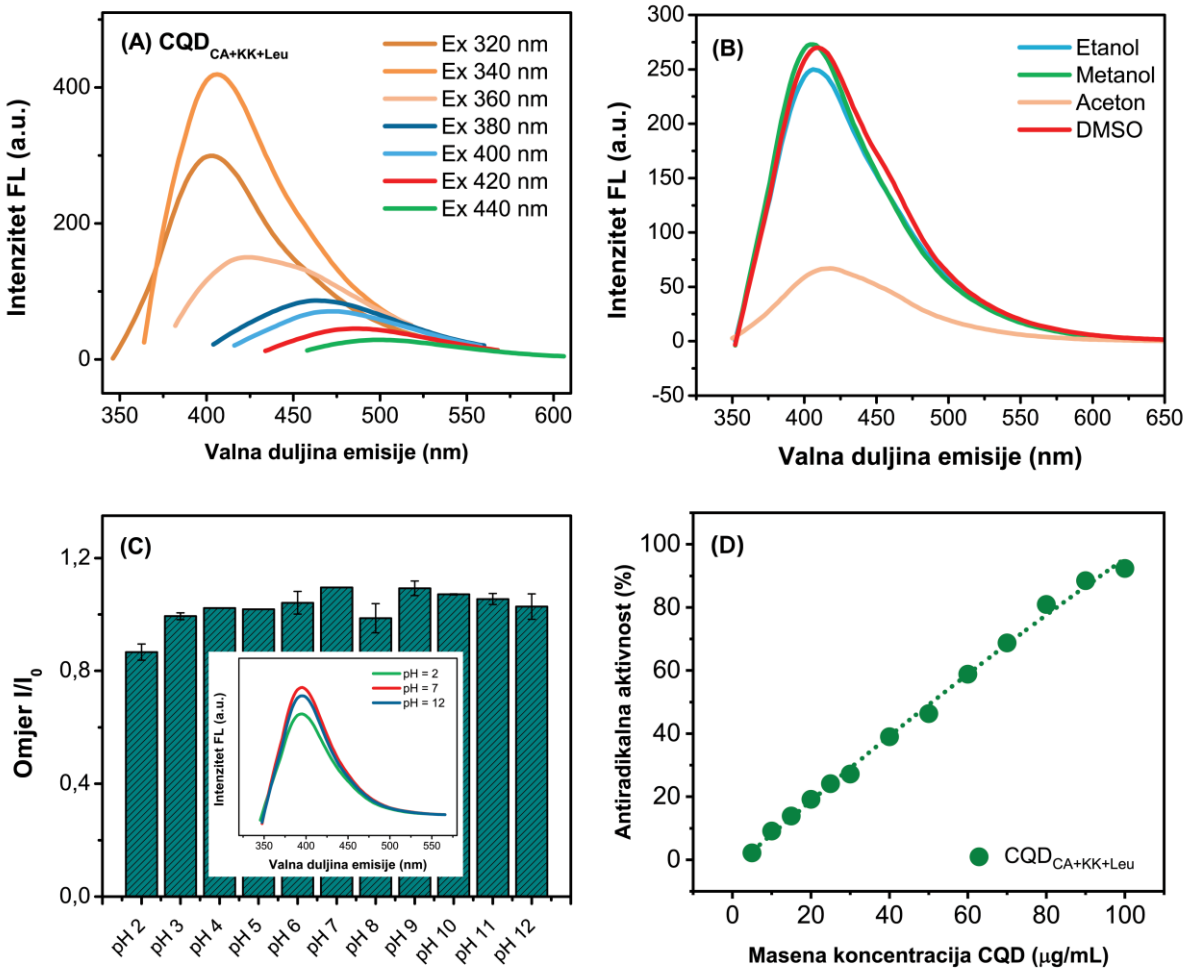
Tablica 18. Optimalni uvjeti procesa sinteze $CQD_{CA+KK+Leu}$.

Promatrani parametar	Uvjeti
Temperatura / °C	199,2 °C
Vrijeme / h	10 h i 29 min
Rezultati optimiranja procesa	
Predviđeni postotak QY / %	17,16
Ukupna željena funkcija (D)	1,000
QY dobiven eksperimentima / %	17,52 ± 0,59

4.6.1. Karakterizacija optimalnog hibridnog uzorka

Ovisnost valnih duljina emisije o valnoj duljini ekscitacije optimalnog hibridnog uzorka CQD prikazana je na **Slici 23A** i **Slika 23B**. Iz grafičkog prikaza se može uvidjeti da je emisija fotoluminescencije prisutna duž ispitanih valnih duljina pobude čak i pri λ_{EX} = 440 nm, no značajni pad intenziteta emisije zabilježen je nakon λ_{EX} = 380 nm te su vidljiviji značajniji pomaci prema crvenom području u odnosu na CQD_{CA+Leu}. S obzirom na najbolji uzorak iz serije s korom klementine CQD_{KK+Arg} (**Slika 13A**), uzorak $CQD_{CA+KK+Leu}$ ipak pokazuje nešto slabiju prilagodljivost valne duljine emisije o valnoj duljini ekscitacije. Što se tiče utjecaja otapala, svim opisanim uzorcima je zajedničko da se intenzitet fotoluminescencije izrazito smanjuje u acetonu te da se upravo ta ovisnost o otapalu vrlo vjerojatno temelji na razlikama u kemijskoj prirodi hidrofilnih $CQD_{CA+KK+Leu}$ i polarnog aprotičnog otapala niže polarnosti kao što je aceton (**Slika 23C**).

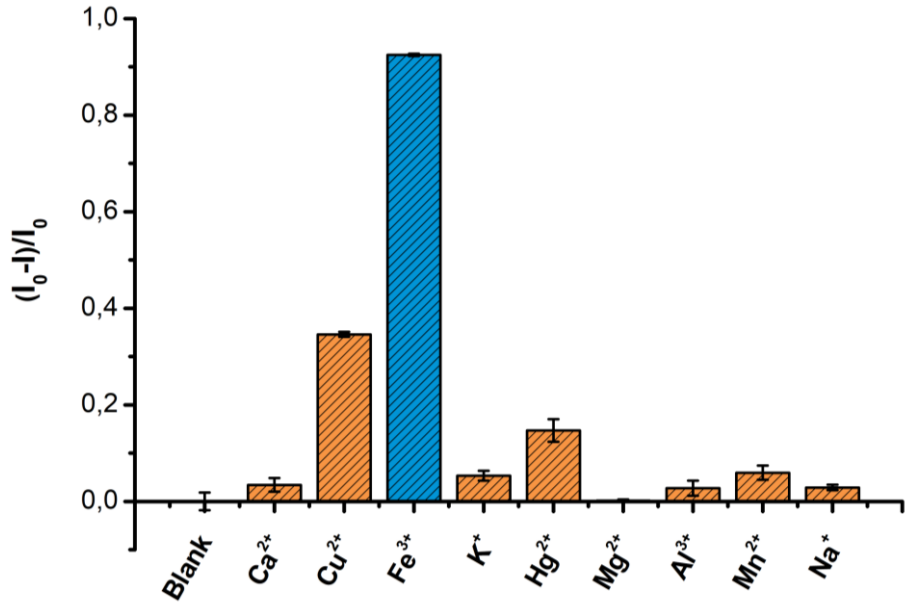
Bitno je napomenuti da se provelo i ispitivanje uzorka $CQD_{CA+KK+Leu}$ na stupanj disperzivnosti prije i poslije pročišćavanja te je prije pročišćavanja stupanj iznosio 82,14 ± 1,66 %, a nakon 96,17 ± 2,51 %. Veća razlika u vrijednostima stupnja disperzivnosti prije i poslije pročišćavanja CQD je zapravo uzrok korištenja biomase u reakcijskoj smjesi iz koje se uslijed ekstremnog termalnog tretiranja pri visokim temperaturama, stvaraju nusprodukti termalne razgradnje u obliku crnog taloga kojeg je potrebno ukloniti.



Slika 23. Prikaz (A) fluorescencijskog spektra emisije $CQD_{CA+KK+Leu}$ uzorka u ovisnosti o valnoj duljini ekscitacije od 320 nm do 440 nm, (B) ovisnost intenziteta fotoluminescencije o vrsti otapala, (C) ovisnost fotoluminescencije o pH medija; umetak: izdvojene krivulje za točke: pH = 2, pH = 7 i pH = 12 i (D) antiradikalna aktivnost hibridnih CQD.

Što se tiče ovisnosti intenziteta fotoluminescencije $CQD_{CA+KK+Leu}$ o pH medija i vidljiva je relativno dobra stabilnost čestica u rasponu pH = 2 - 12 (**Slika 23C**). Najveće razlike se uočavaju pri niskom pH = 2 s najmanje iskazanim intenzitetom fotoluminescencije. U odnosu na pH = 7, vidljiv je ipak pad intenziteta fotoluminescencije i pri pH = 2 i pri pH = 12 (**Slika 23C; umetak**). U odnosu na zanemarive vrijednosti antiradikalne aktivnosti modelnih CQD koje su dosegnule aktivnosti < 55 % pri najvišoj testiranoj koncentraciji uzorka od 100 μg/mL (**Slika 18**) te visoke vrijednosti kod uzoraka CQD na bazi kore klementine (**Slika 19**), uzorci hibridnih CQD iskazuju usporedivu antiradikalnu aktivnost s uzorcima CQD na bazi kore klementine s određenim EC_{50} = (51,35 ± 1,38) μg/mL (**Slika 23D**).

Selektivnost $CQD_{CA+KK+Leu}$ nanoprobe na različite metalne ione prikazani su **Slikom 24**. Može se uočiti kako $CQD_{CA+KK+Leu}$ ima visok afinitet prema Fe^{3+} ionima, dok je prigušenje signala također uočeno kod Hg^{2+} te Cu^{2+} iona. U slučaju Hg^{2+} možemo reći da je odziv zanemariv (prigušenje je < 20 %), dok kod Cu^{2+} postoji određeni afinitet CQD (~ 36 % prigušenje signala) prema ispitanom ionu. S obzirom da je prigušenje signala intenziteta fotoluminescencije kod Fe^{3+} primjenom $CQD_{CA+KK+Leu}$ nanoprobe veći od 90 %, u nastavku ovoga rada biti će prikazan razvoj metode za detekcije Fe^{3+} iona i primjena nanoprobe u realnim uzorcima. Usporedbom s modelnim CQD_{CA+Leu} uzorkom (**Slika 11A**), gdje je zabilježeno snažno i selektivno prigušenje signala intenziteta fotoluminescencije u prisutnosti Fe^{3+} iona, u slučaju $CQD_{CA+KK+Leu}$ odziv nije u potpunosti selektivan te je također uočen značajniji afinitet $CQD_{CA+KK+Leu}$ prema Cu^{2+} i Hg^{2+} ionima. Rezultatima za uzorke CQD na bazi kore klementine zaključeno je da niti jedan uzorak CQD ne pokazuje značajniji afinitet prema pojedinačnom ionu (**Slika 17**) i da uz nizak QY, uzorci CQD ne bi bili pogodni za razvoj analitičke metode.



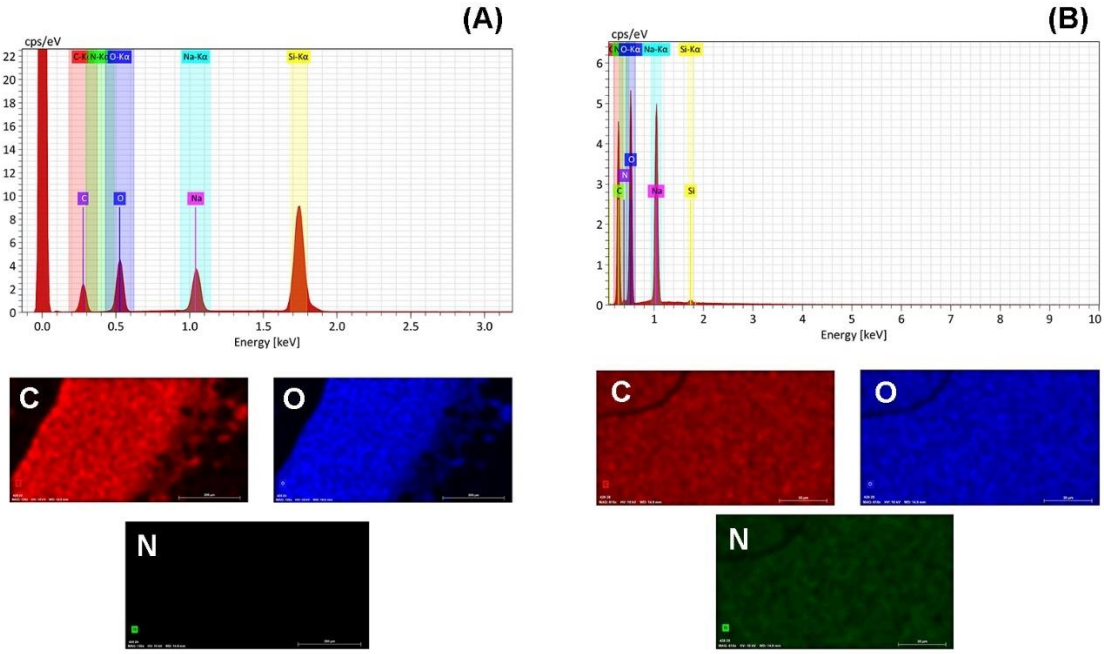
Slika 24. Odziv fluorescentne nanoprobe $CQD_{CA+KK+Leu}$ u ovisnosti o promjeni intenziteta fotoluminescencije u prisutnosti različitih metalnih iona.

4.7. Fizikalno-kemijska i optička karakterizacija odabranih uzoraka CQD

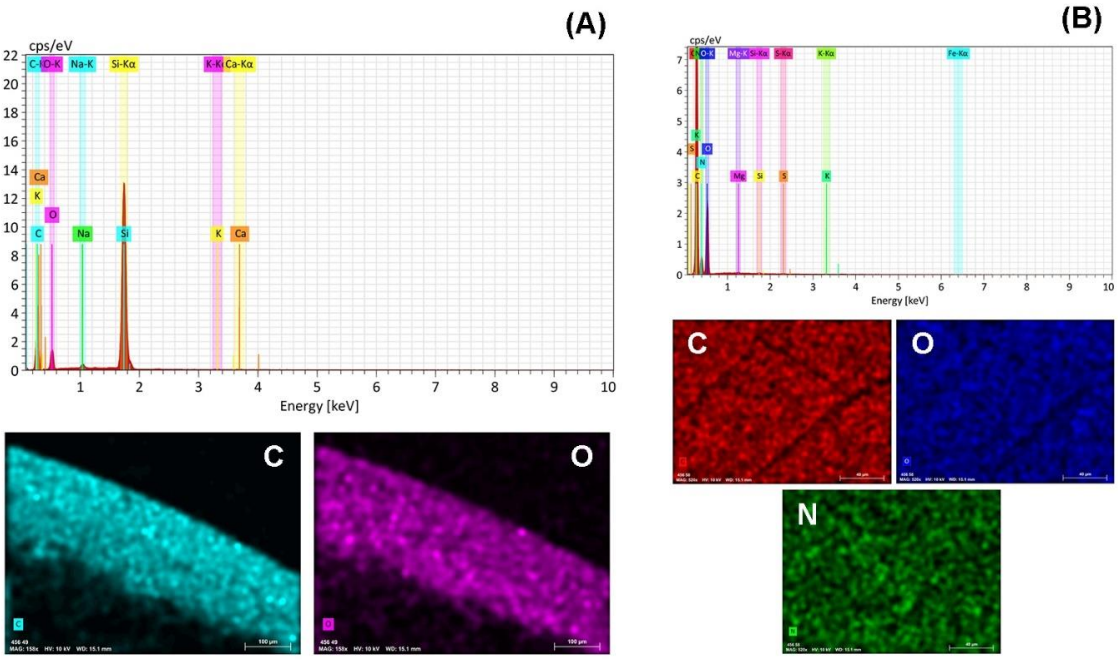
Odabrani uzorci CQD (CQD_{CA+Leu}, CQD_{KK+Arg} i $CQD_{CA+KK+Leu}$) koji su pokazivali najpoželjnija svojstva detaljnije su ispitani na fizikalno-kemijska svojstva te optička svojstva koja određuju, odnosno usmjeravaju primjenu CQD u određenu svrhu.

Na **Slici 25A** prikazan je EDS spektar i mapiranje površina za prisutne elemente u uzorku CQD_{CA}, a na **Slici 25B** za CQD_{CA+Leu}. Vidljivo je da u CQD_{CA} nije uočeno prisustvo dušika, dok se *N*-dopiranjem pomoću Leu uzrokuje inkorporacija dušika na površinu čestica CQD_{CA+Leu} s atomskim udjelom od 1,53 % (**Slika 25B**; **Tablica 8**). Visoki udjeli natrija (Na) u uzorcima prisutni su zbog podešavanja pH vrijednosti na pH = 7 pomoću NaOH. Jedna od mogućih pretpostavki je da se natrijevi ioni kompleksiraju s funkcijskim skupinama na površini čestica CQD te da dio Na^+ nisu bili u potpunosti u obliku natrijevih soli koje bi se trebale ukloniti postupkom dijalize.

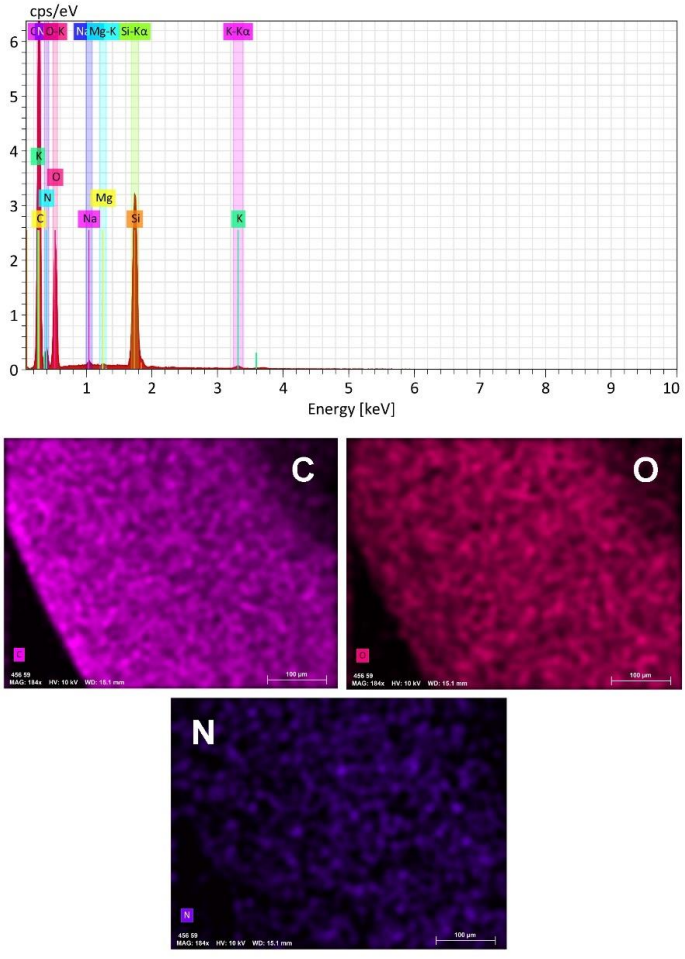
U uzorku CQD_{KK} nije detektiran dušik (**Slika 26, Tablica 12**), dok se *N*-dopiranjem aminokiselinom Arg u uzorku CQD_{KK+Arg} može uočiti atomski udio dušika od 11,01 %. EDS spektri kod uzoraka na bazi klementine pokazuju prisutnost i elemenata (minerala) poput kalija (K), magnezija (Mg) i kalcija (Ca) koji se prirodno nalaze u sastavu biomase kore klementine (De i Karak 2013). U **Tablici 19** i **Slici 27**, prikazani su maseni i atomski udjeli C, O, N za uzorak $CQD_{CA+KK+Leu}$ dobiveni EDS analizom. Detektiran je atomski udio dušika od 8,01 % što ukazuje na uspješnost inkorporiranja dušikovih atoma na površinu CQD.



Slika 25. EDS spektri i mapiranje za CQD uzorke – (A) CQD_{CA} i (B) CQD_{CA+Leu}.



Slika 26. EDS spektri i mapiranje za CQD uzorke – (A) CQD_{KK} i (B) CQD_{KK+Arg}.



Slika 27. EDS spektri i mapiranje za CQD uzorak $CQD_{CA+KK+Leu}$.

$CQD_{CA+KK+Leu}$ uzorak sadrži zanemariv udio natrija (atomski udio je jednak 0,18 %), kao i kod uzorka CQD dobivenom iz kore klementine, dok je udio dušika u uzorku 8,01 %. Iako je moguće kompleksiranje natrijevih iona na površinske fragmente limunske kiseline, to je manje izgledno kod primjera CQD na bazi kore klementine prema dobivenim rezultatima udjela natrija u uzorku. Potencijalno objašnjenje se može temeljiti na razlikama između veličine ionskih radijusa Na^+ (116 pm) i Fe^{3+} iona (78 pm) za koje je dokazano moguće kompleksiranje te većom steričkom zasjenjenosti na površini čestica zbog prisutnosti kompleksnijih polimera funkcijskih skupina nastalih fragmentacijom složenijih polifenola prisutnih u kori klementine. U tom slučaju, kompleksiranje manjih iona je više vjerojatno.

Također, zbog dodatka ekstrakta kore klementine u reakcijsku smjesu, detektirane su i mineralne tvari u uzorcima (Mg, K, Ca). Kao što je već pojašnjeno na primjeru rada Zhang i sur. (2016), mehanizam nastajanja CQD je zaista kompleksan i do sada je izvučeno nedovoljno zaključaka jer je praćenje reakcije gotovo pa nemoguće. Na primjeru $CQD_{CA+KK+Leu}$, može se pretpostaviti da je granica polimerizacije/karbonizacije pomaknuta u više temperaturno područje zbog kompleksnosti sustava i nedovoljnog stupnja karbonizacije pri nižim temperaturama od 200 °C te QY za uzorke na bazi kore klementine značajno ovisi o sadržaju dušika na površini čestica. Ta ovisnost nije uočena kod uzoraka na bazi limunske kiseline (**Tablica 19**).

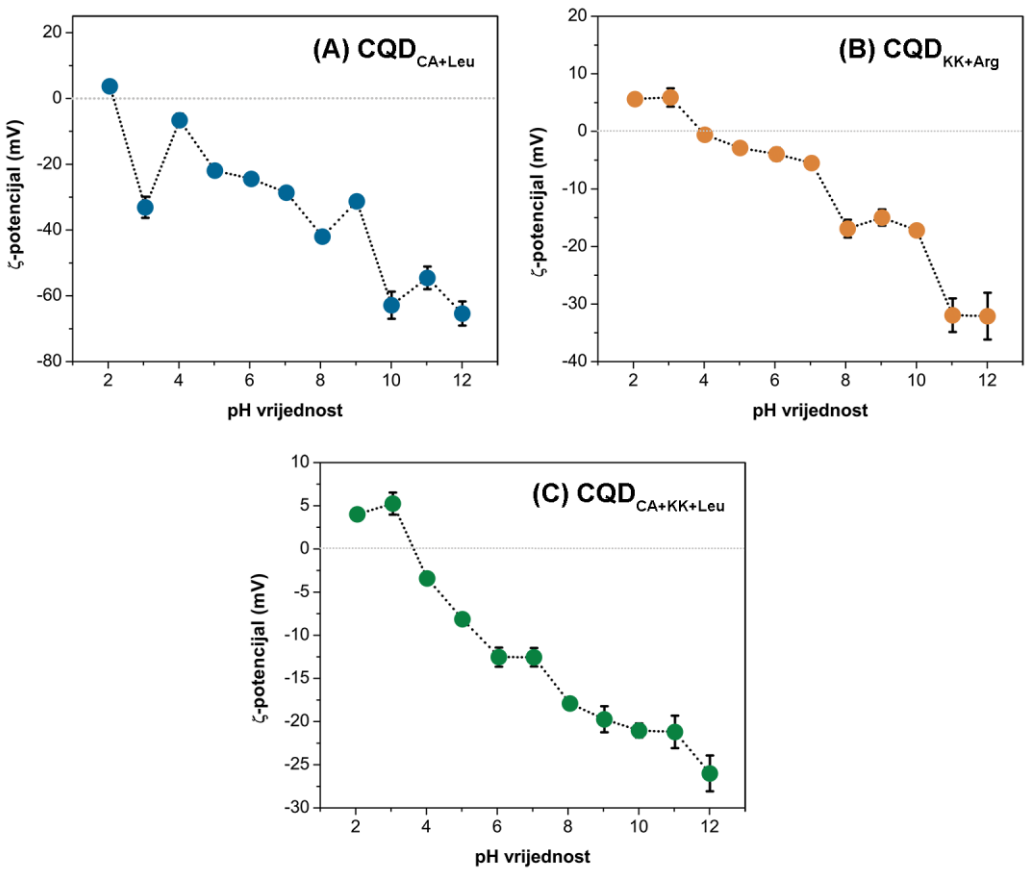
Table 19. Elementarna analiza pripremljenih uzoraka CQD.

	Maseni udio %			**Atomski udio %**		
Uzorak CQD	**C / %**	**O / %**	**N / %**	**C / %**	**O / %**	**N / %**
CQD_{CA}	28,31	50,05	-	46,55	35,07	-
CQD_{CA+Leu}	40,48	46,44	1,60	45,11	38,85	1,53
CQD_{KK}	66,83	29,50	-	74,05	24,45	-
CQD_{KK+Arg}	57,84	26,69	11,60	63,99	24,66	11,01
$CQD_{CA+KK+Leu}$	88,72	38,64	13,11	63,20	20,66	8,01

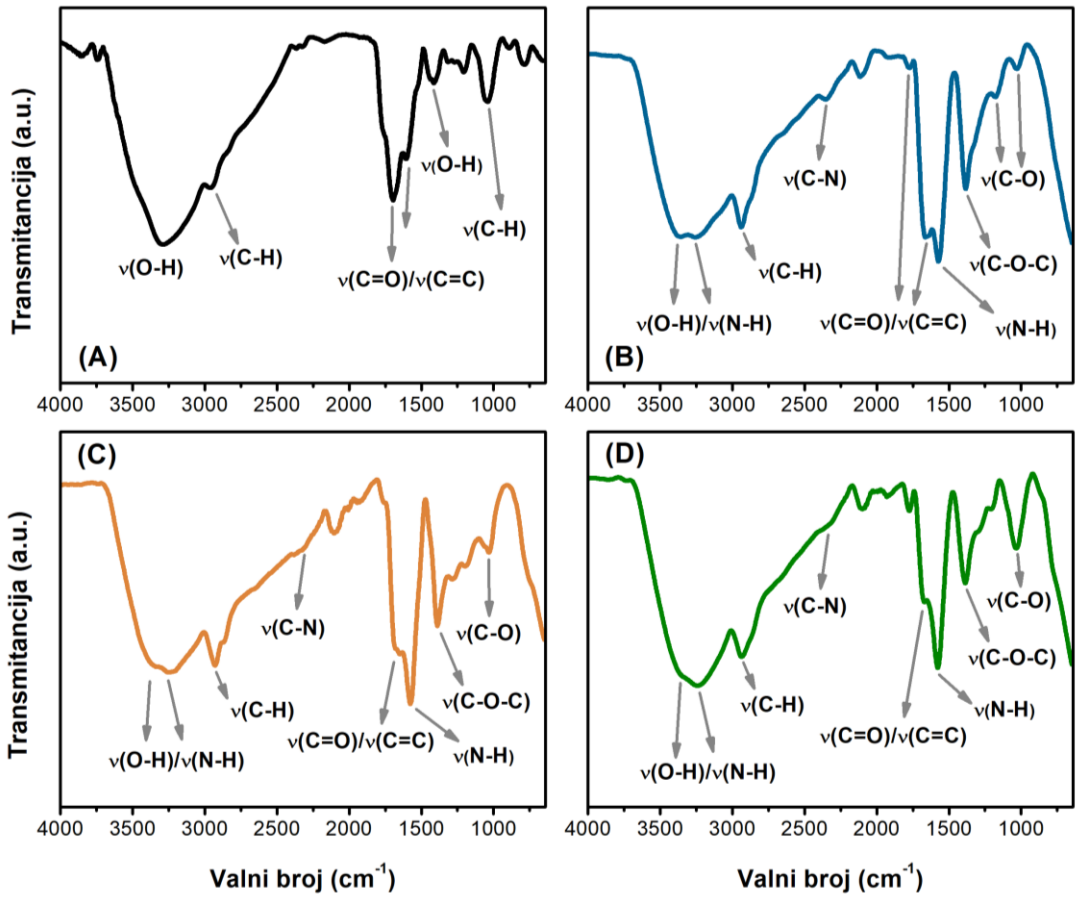
Iako u pojedinačnoj optičkoj karakterizaciji CQD uzoraka za sve serije sinteza nisu objašnjena ponašanja CQD u mediju s različito podešenim pH vrijednostima (**Slika 10**, **Slika 16** i **Slika 23C**), vrijednosti ζ-potencijala pri svakom ispitanom pH potencijalno mogu dati odgovore na pitanja što se zapravo događa na površini čestica CQD s promjenom pH vrijednosti medija (**Slika 28**).

Promatranjem kretanja ζ-potencijala za CQD_{CA+Leu} (**Slika 28A**) uočeno je kako se raspon izmjerenog ζ-potencijal kretao od (3,71 ± 1,1) mV do (-65,37 ± 3,68) mV. Ova pojava zapravo

upućuje na površinske promjene na česticama, vrlo vjerojatno zbog ionizacije površine funkcijskih skupina. U kiselim uvjetima pri pH = 2, prisutan je pozitivan naboj na površini te su funkcijske skupine protonirane. Deprotoniranje funkcijskih skupina se vrlo vjerojatno kreće od pH > 3 što se primjećuje i po padu vrijednosti *ζ*-potencijala. Najveće razlike, ali ne toliko značajne, primijećene su pri kiselim uvjetima od pH = 2 i pH = 12. Iz grafičkog prikaza ovisnosti *ζ*-potencijala o pH medija, izoelektrična točka (neto naboj jednak nuli), pH_{iep} je određen kao pH_{iep} = 2,18 za CQD_{CA+Leu}. Nadalje, slično ponašanje uočeno je i na primjeru CQD_{KK+Arg} (**Slika 28B**), gdje su najveće promjene zabilježene pri pH vrijednostima od pH = 2 i pH = 12. Vrijednosti *ζ*-potencijala za uzorak CQD_{KK+Arg} kretale su se u rasponu od (5,62 ± 0,37) mV sve do (-32,10 ± 4,07) mV. Vrijednost pH_{iep} za uzorak CQD_{KK+Arg} određen je kao pH_{iep} = 4,05. Zanimljivo, kod uzorka $CQD_{CA+KK+Leu}$ ne pronalazi se karakteristično ponašanje ovisnosti intenziteta fluorescencije o pH medija koje bi ovisilo o protoniranju ili deprotoniranju funkcijskih skupina na površini CQD (**Slika 23C**), dok je raspon određenih *ζ*-potencijala bio od (4,01 ± 0,24) mV do (-26,00 ± 2,07) mV s pH_{iep} = 3,62 (**Slika 28C**). S obzirom da značajnije razlike u promjeni intenziteta fotoluminescencije o podešenom pH nisu uočene, moglo bi se zaključiti da su $CQD_{CA+KK+Leu}$ čestice stabilnije duž šireg pH raspona, kao i CQD_{CA+Leu}.

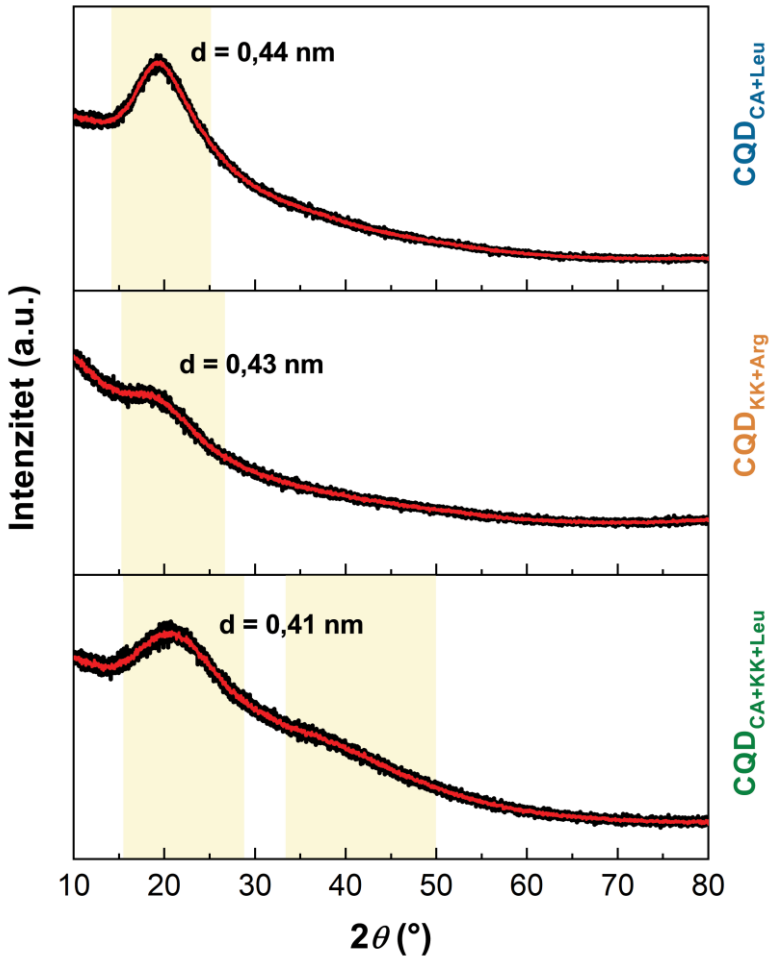


Slika 28. Varijacije u površinskom naboju (*ζ*-potencijala) u ovisnosti o pH vrijednosti za uzorke (A) CQD_{CA+Leu}, (B) CQD_{KK+Arg} i (C) $CQD_{CA+KK+Leu}$.



Slika 29. FTIR spektri za uzorke A) CQD_{KK}, (B) CQD_{CA+Leu}, (C) CQD_{KK+Arg} i (D) $CQD_{CA+KK+Leu}$.

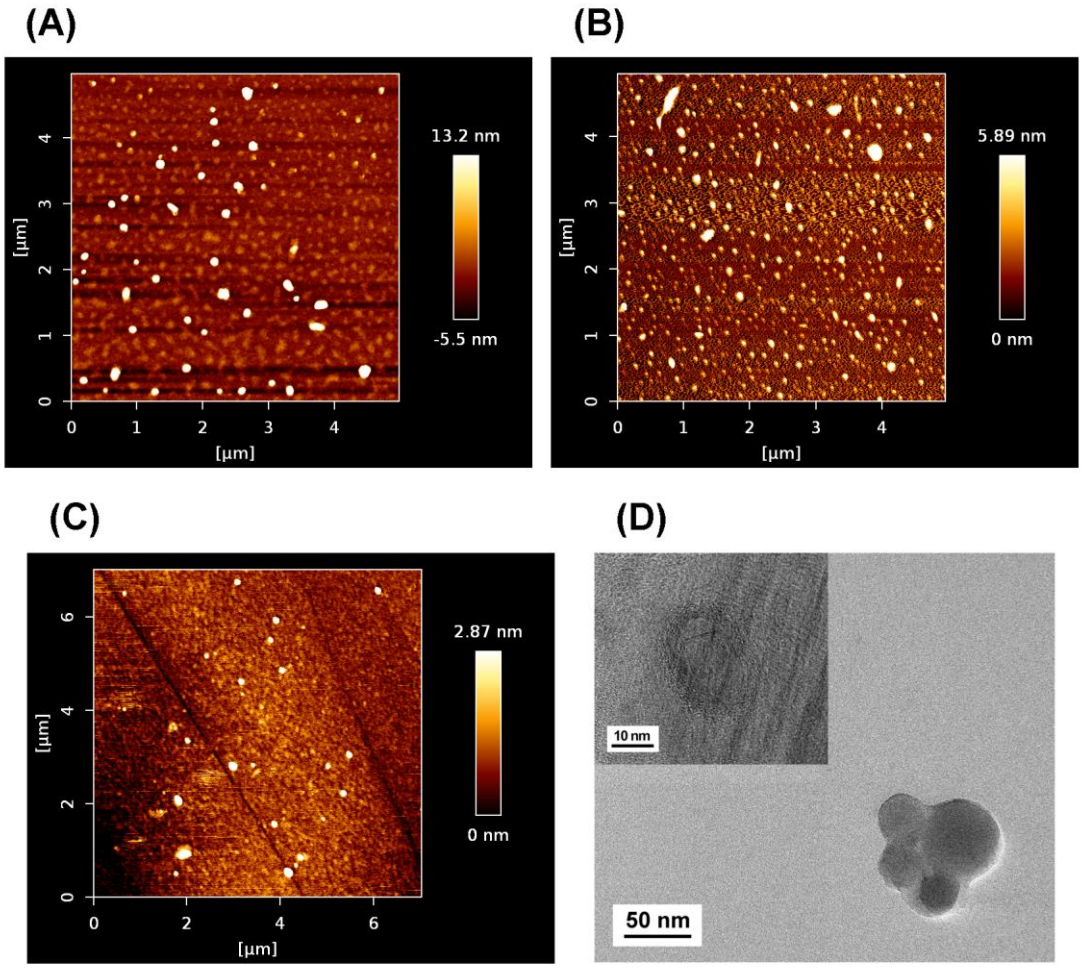
Prisutnost pojedinih funkcijskih skupina pretpostavljena je na temelju rezultata FTIR spektroskopije te su rezultati za odabrane uzorke prikazani na **Slici 29**. Glavna karakteristika svih ispitanih uzoraka je prisutnost široke vrpce na otprilike 3267–3305 cm^{-1} što upućuje na postojanje O-H i N-H vibracijskih veza. Oštri pikovi na približno 1680 cm^{-1} i na 1041 cm^{-1} se mogu pridodati postojanju C=O and C-O veza, dok oštar pik na otprilike 1580 cm^{-1} potencijalno upućuje na prisutnost nezasićenih C-N vibracija. Pikovi na 1417 cm^{-1}, 1400 cm^{-1} i 1380 cm^{-1} mogu se objasniti prisutnošću O-H, C-N skupina i C-H savijanju veza. Upravo se iz ove interpretacije rezultata može potencijalno pretpostaviti da se na površini čestica nalaze funkcijske skupine na bazi kisika i dušika (osim kod CQD_{KK}) u obliku hidroksilnih, karboksilnih, karbonilnih, amino i amidnih skupina (Zhang i sur., 2016; Feng i sur., 2017; Sun i sur., 2019).



Slika 30. PXRD difraktogrami za uzorke (A) CQD_{CA+Leu}, (B) CQD_{KK+Arg} i (C) $CQD_{CA+KK+Leu}$.

Rendgenskom difrakcijom na prahu (PXRD) može se pojasniti sama fizikalna priroda sintetiziranih čestica. Na **Slici 30** prikazani su difraktogrami za sve odabrane uzorke te se može uočiti kako ne postoje značajnije razlike između mjerenih uzoraka. U sva tri slučaja prisutan je široki difrakcijski pik na otprilike 2θ = 21°-22° koji potvrđuje amorfnu prirodu sintetiziranih CQD. Vrpca niske gustoće (na otprilike 2θ = 42°) i vrlo niskog intenziteta jedino je prisutna kod optimalnog uzorka $CQD_{CA+KK+Leu}$ (dobiven pri uvjetima od 200 °C kroz 12 sati) koji potencijalno odgovara (100) ravnini i koji upućuje na moguću prisutnost karakteristika grafitnog ugljika. Ovaj podatak bi također potvrđivao da se pri nižim temperaturama tretiranja manjim od 180 °C nisu odvili svi stupnjevi potrebnih koraka kako bi se dobile čestice karakterističnih svojstava CQD. Da postoje odstupanja od grafitne strukture, izračunat je i međuslojni razmak od d = 0,44 nm za CQD_{CA+Leu}, d = 0,43 nm za CQD_{KK+Arg} te d = 0,41 nm za $CQD_{CA+KK+Leu}$. Uspoređujući ih s razmakom grafita koji iznosi d = 0,34 nm, može se pretpostaviti da su u samoj strukturi CQD prisutni defekti (mogući različiti omjeri sp^2 i sp^3 hibridiziranih ugljikovih atoma) uslijed funkcionalizacije površine, ponovno upućujući na amorfnu strukturu i

nisku kristaličnost CQD čestica. Osim toga, postoje literaturni navodi da upravo ove veličine međuslojnog razmaka odgovaraju dopiranju dušika u samu jezgru ugljika uzrokujući „nered“ u samoj strukturi ugljika (Dsouza i sur., 2021).

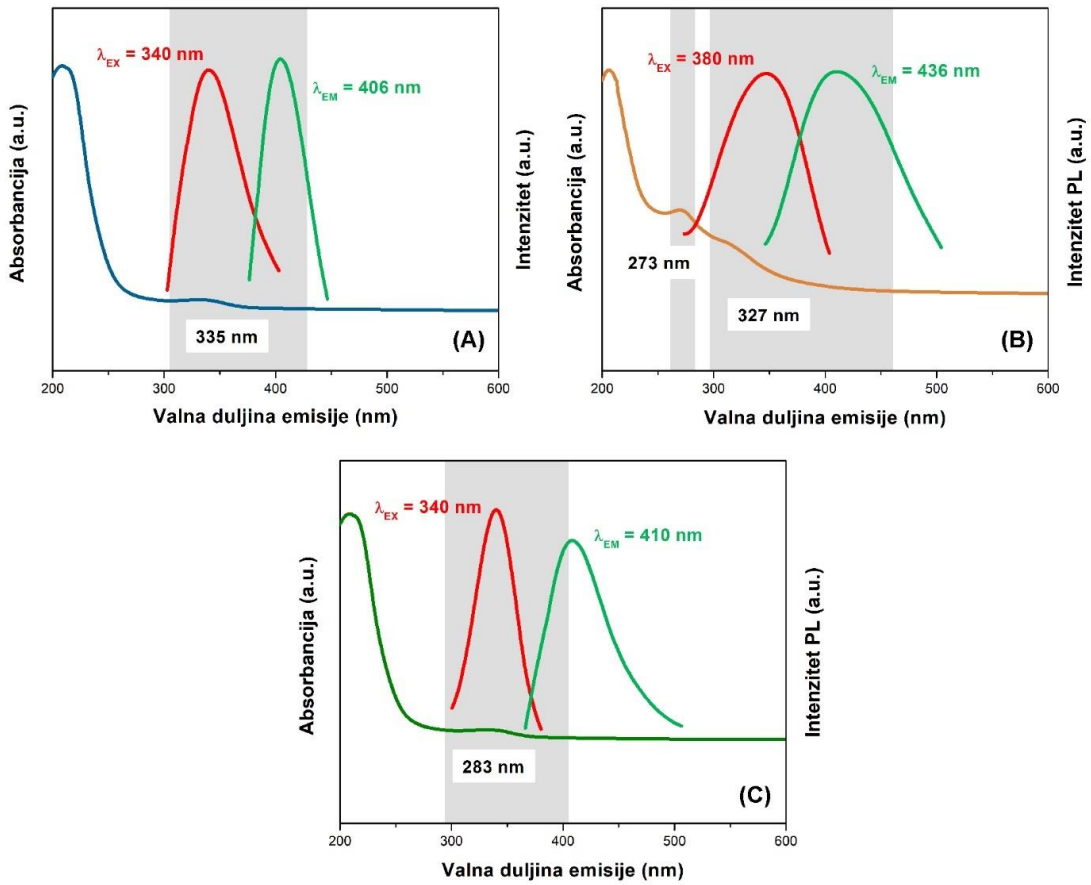


Slika 31. AFM snimke za uzorke (A) CQD_{CA+Leu}, (B) CQD_{KK+Arg} i (C) $CQD_{CA+KK+Leu}$ te (D) TEM snimka uzorka CQD_{CA+Leu}; umetak: HR-TEM snimka uzorka CQD_{CA+Leu}

Uvid u raspodjelu veličine/visine čestica te morfološke karakteristike čestica ostvaren je primjenom tehnike mikroskopije atomskih sila (AFM) te transmisijskom elektronskom mikroskopijom visoke rezolucije (HR-TEM). Na **Slici 31A** prikazana je snimka AFM uzorka CQD_{CA+Leu} s maksimalnom određenom visinom čestica od 13,2 nm, dok je prosječna veličina čestica iznosila oko (58,3 ± 2,40) nm. U slučaju CQD_{KK+Arg}, maksimalna određena visina čestica određena je kao 5,89 nm s prosječno određenom veličinom čestica od (39 ± 1,28) nm (**Slika 31B**). Za razliku od snimljenog uzorka CQD_{CA+Leu}, na uzorku CQD_{KK+Arg} na samoj podlozi se može uočiti porozni, polimerni organski matriks koji je vrlo vjerojatno nastao kao posljedica termalnog tretiranja biljnog materijala. U manjem udjelu se također pojavljuje na snimci

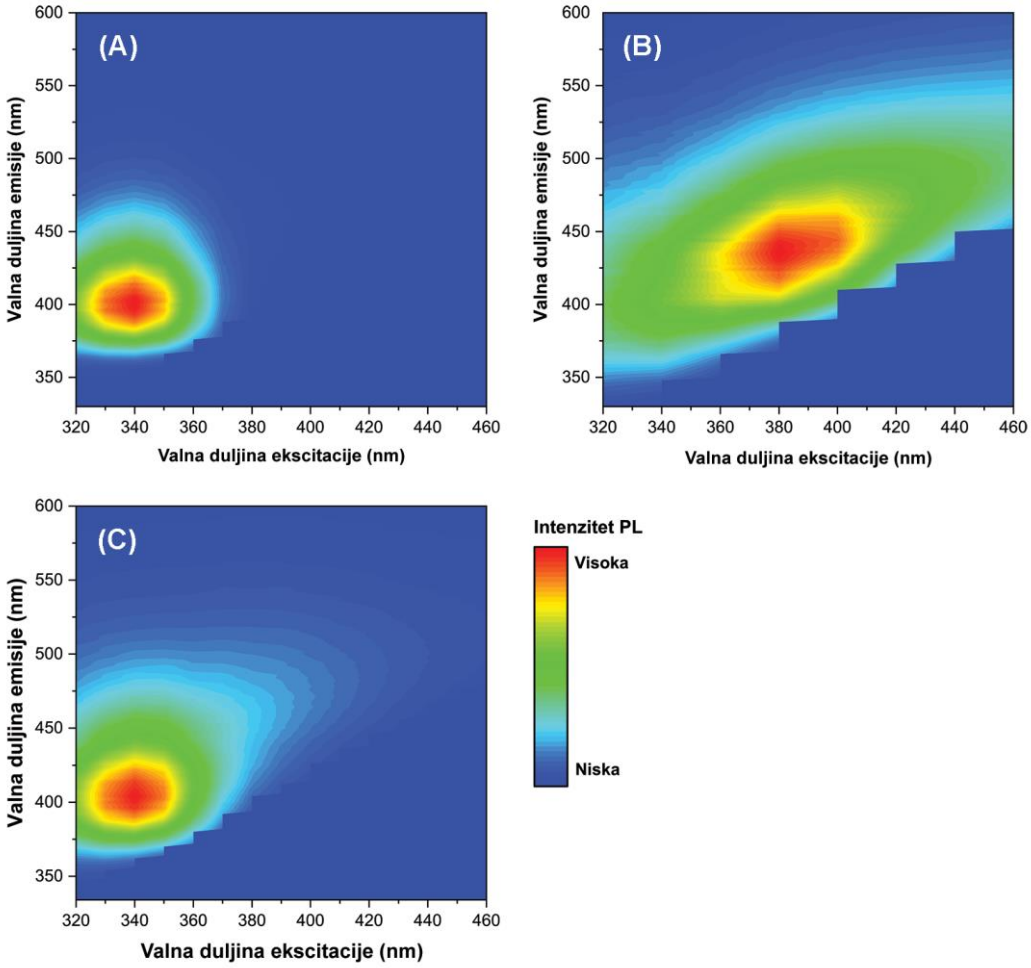
$CQD_{CA+KK+Leu}$ (**Slika 31C**) gdje je najveća visina uzorka određena s 2,87 nm, dok je s obzirom na veće razrjeđenje uzorka, distribuciju veličine teško odrediti. TEM snimka se odnosi na uzorak CQD_{CA+Leu} gdje je pokazano da postoji prisutnost nešto većih nakupina (agregata) s prosječnom veličinom čestica oko 40 nm (**Slika 31D**) te na postojanost nanočestica šuplje strukture veličine (11,28 ± 1,94) nm (**Slika 31D, umetak**). U znanstvenom radu Guo i sur., 2020, također su opisane nanočestice CQD šuplje strukture koja je moguća posljedica pirolize i termalnog tretiranja ugljikovog prekursora u sintezi CQD.

Iako literatura uglavnom opisuje CQD s veličinom čestica oko 10-20 nm, postoje i literaturni navodi koji se osvrću na mogućnost dobivanja CQD oko 50 nm, ovisno o uvjetima pripreme, ali i o vremenskom periodu stajanja uzorka i stupnju pročišćavanja (Stachowska i sur., 2021; Javed i O'Carroll 2021a). Skupina znanstvenika provela je istraživanje stabilnosti CQD u ovisnosti o tijeku vremena skladištenja (Javed i O'Carroll 2021a; Javed i O'Carroll 2021b). Zaključeno je da se kroz 13 mjeseci prosječna veličina nanočestica povećala s 23 nm na 63 nm, dok je u prvom tjednu nakon sinteze, uočen ubrzani rast veličine čestica u odnosu na kasnije razdoblje skladištenja. Kao mogući uzrok ovome problemu navodi se mogućnost zaostajanja nečistoća ili općenito nusprodukata termalne razgradnje.



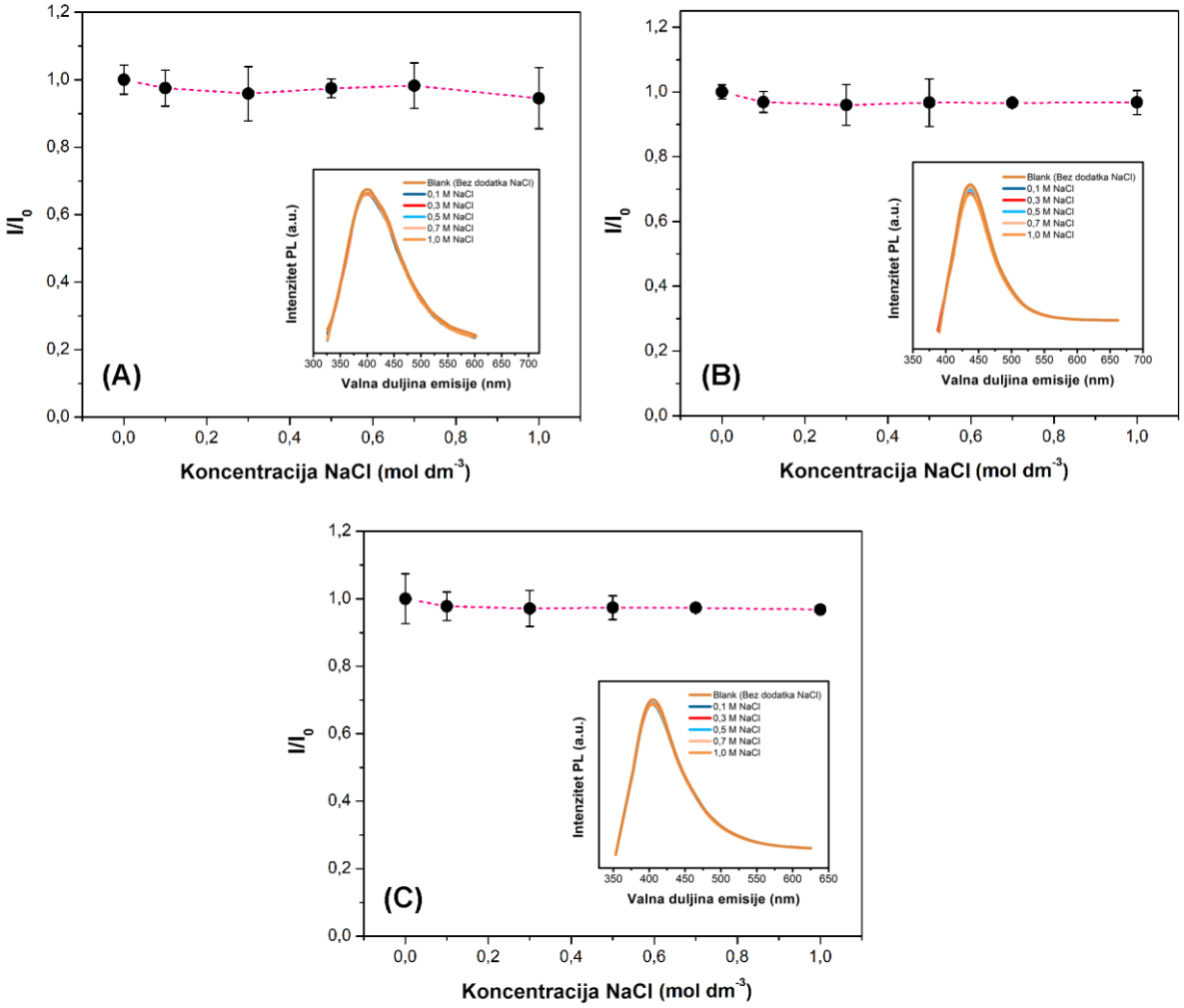
Slika 32. UV-Vis apsorpcijski spektri s maksimumima valne duljine emisije u ovisnosti o valnoj duljini ekscitacije za uzorke (A) CQD_{CA+Leu}, (B) CQD_{KK+Arg} i (C) $CQD_{CA+KK+Leu}$.

Zanimljivo svojstvo CQD je da pokazuje vrlo izraženu apsorpciju u UV području, dok ovisno o procesnim parametrima, korištenim prekursorima/dopantima te otapalu, oblik spektra CQD nanočestica može varirati (**Slika 32A-C**). Uglavnom znanstveni radovi upućuju na moguću prisutnost dva slabija karakteristična pika na UV-Vis spektru za CQD pri 260 - 270 nm te u valnom području od 300 - 340 nm. Vrpca na približno 260 – 270 nm upućuje na π–π* prijelaz (HOMO-LUMO) C=C veza, tj. na potencijalnu prisutnost aromatskih sp^2 hibridiziranih ugljikovih atoma (Das i sur., 2019; Dsouza i sur., 2021). U višem valnom području mogu se uočiti n–π* prijelazi C=O veza (prijelazi iz nevezne u protuveznu orbitalu). Prijelaz n–π* se može odvijati kada nespareni elektroni kisika C=O veze („n“ elektroni) ekscitacijom prijeđu u π* protuveznu orbitalu (Das i sur., 2019). Također, istraživanje Dsouza i sur. (2021) navodi kako ova apsorpcijska vrpca može upućivati na prisutnost kisikovih i dušikovih skupina na samoj površini čestica. Iz svega navedenoga, može se zaključiti da će izgled spektra CQD ovisiti o načinu i stupnju uspješnosti funkcionalizacije materijala.



Slika 33. 2D konturne mape ovisnosti valne duljine emisije o valnoj duljini ekscitacije za uzorke (A) CQD_{CA+Leu}, (B) CQD_{KK+Arg} i (C) $CQD_{CA+KK+Leu}$.

Na Slici **33A-C** prikazane su 2D konturne ekscitacijske-emisijske mape za odabrane uzorke. Iako su rezultati već prikazani krivuljama za svaki uzorak posebno, ovakvo mapiranje daje jasniji uvid u usporedbu optičkih svojstava svakog uzorka posebno. Iako CQD_{CA+Leu} iskazuje najveće QY od 36,43 %, limitirajući faktor je uski raspon fluorescencije unutar vidljivog područja koja u konačnici ograničava primjenu u biološke svrhe. Nešto bolji raspon vidljiv je kod uzorka $CQD_{CA+KK+Leu}$, dok dobar primjer prilagodljive valne duljine emisije o valnoj duljini ekscitacije uočavamo na primjer CQD_{KK+Arg},.



Slika 34. Ovisnost koncentracije NaCl (ionske jakosti) o intenzitetu fotoluminescencije za uzorke (A) CQD_{CA+Leu}, (B) CQD_{KK+Arg} i (C) $CQD_{CA+KK+Leu}$.

Kako bi se dodatno procijenila stabilnost CQD, osim ispitivanja utjecaja temperature i pH, ispitan je i utjecaj ionske jakost (vodena otopina NaCl) na stabilnost sintetiziranih uzoraka (**Slika 34A-C**). Naime, stabilnost vodene suspenzije CQD i pri niskim ionskim jakostima je općenito poznata, no pri visokim ionskim jakostima dolazi do tendencije agregacije i smanjenja fotoluminescencije. Na svim odabranim uzorcima CQD, može se uočiti kako nije zabilježen

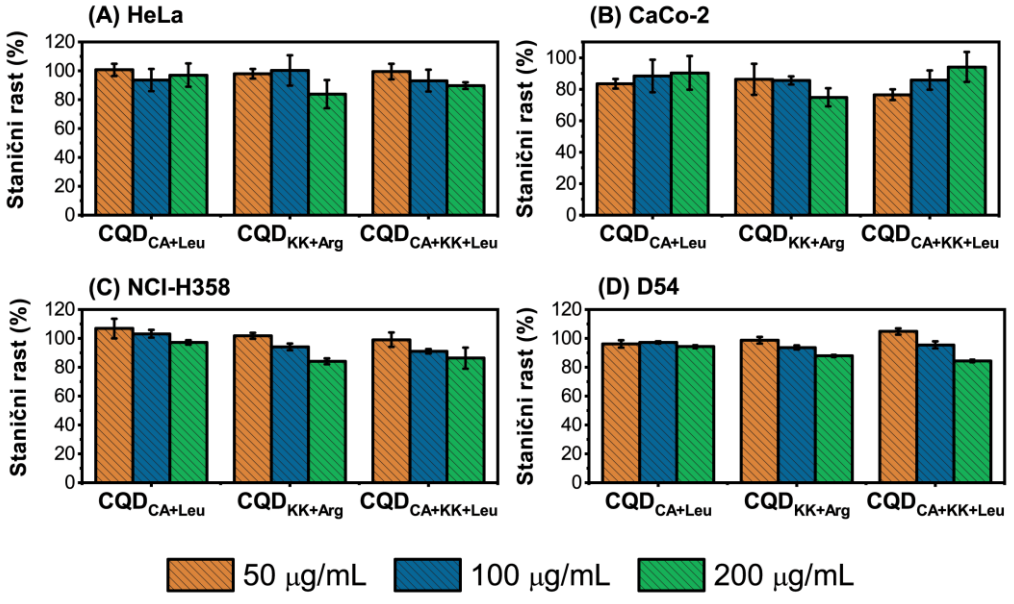
značajni pad fotoluminescencije čak ni pri vrlo visokim koncentracijama otopine NaCl od c = 1 mol/dm^3.

4.8. Primjena pripravljenih uzoraka CQD_{CA+Leu}, CQD_{KK+Arg} i $CQD_{CA+KK+Leu}$

Preliminarni rezultati na odabranim uzorcima ukazivali su na mogući široki spektar primjene u različitim područjima. Visoki odziv prema pojedinačnim metalnim ionima, dobra biološka aktivnost te stabilnost CQD čestica usmjerila je ovo istraživanje na ispitivanje biokompatibilnosti za primjenu na staničnim linijama te razvoj modela i analitičke metode za određivanje Fe^{3+} iona u modelnim i realnim sustavima kao što je bunarska voda.

4.8.1. Ispitivanje farmakološke aktivnosti uzoraka

Kako bi se pokazala biokompatibilnost čestica i eventualna primjena u biomedicinske svrhe (teranostika), uzorci su ispitani na 4 različite tumorske stanične linije: HeLa (humane epitelne stanice adenokarcinoma vrata maternice), CaCo-2 (epitelne stanice humanog karcinoma debelog crijeva), NCI-H358 (epitelne humane stanice bronhioalveolarnog karcinoma) i D54 (humane stanične linije glioblastoma).



Slika 35. Ispitivanje uzoraka CQD na tumorske stanične linije (HeLa, CaCo-2, NCI-H358, D54).

Učinci vodenih suspenzija CQD_{CA+Leu}, CQD_{KK+Arg} i $CQD_{CA+KK+Leu}$ u koncentracijama od 50, 100 i 200 μg/mL ispitani su na rast stanica navedenih tumorskih staničnih linija (HeLa, CaCo-2,

NCI-H358 i D54) (**Slika 35**). Rezultati ispitivanja su izraženi kao postotak (%) rasta tretiranih staničnih linija u odnosu na kontrolne-netretirane stanice.

Uzorak vodene suspenzije CQD_{CA+Leu} u ispitivanim koncentracijama od 50, 100 i 200 µg/mL nije znatno inhibirao rast HeLa stanica (inhibicija < 5 %), dok je kod CaCo2 stanica inhibiran rast za najviše 16,6 % kod najmanje primijenjene koncentracije CQD_{CA+Leu} uzorka od 50 µg/mL. Također, u slučaju stanica NCI-H358 inhibicija rasta je zanemariva (< 3 %) za sve koncentracije uzorka, dok je kod D54 stanica uočeno slično ponašanje s najvišom inhibicijom rasta od < 6 % za sve analizirane koncentracije CQD_{CA+Leu}.

Nadalje, vodena suspenzija CQD_{KK+Arg} na HeLa stanice djeluje inhibitorno (16,2 %) pri najvećoj ispitanoj koncentraciji od γ = 200 µg/mL. U koncentracijama od 50 i 100 µg/mL inhibiran je rast CaCo-2 stanica za oko 15 %, a u primjenjenoj koncentraciji od γ = 200 µg/mL inhibicija rasta CaCo-2 stanica bila je oko 25 %. Pri koncentraciji od γ = 200 µg/mL, uzorak CQD_{KK+Arg} inhibirao je rast NCI-H358 stanica za 15,9 % i D54 stanica za 12,1 %, dok ostale primjenjene koncentracije nisu utjecale na rast ovih stanica.

Uzorak $CQD_{CA+KK+Leu}$ u koncentracijama od 50 i 100 µg/mL ne inhibira ili neznatno inhibira (do 5 %) rast tretiranih staničnih linija. Primjenjen u koncentraciji od 200 µg/mL, inhibiran je rast HeLa stanica (10,2 %), NCI-H358 stanica (13,7 %) i D54 stanica (15,6 %).

S obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti da sve sintetizirane *N*-CQD imaju nisku citotoksičnost (čak i pri visokim koncentracijama od 200 µg/mL), odnosno da su biokompatibilne što im omogućuje primjenu u biološkim sustavima u svrhe staničnog oslikavanja tumorskih stanica. Grupa znanstvenika koji se bave istraživanjima na supstancama s potencijalim antitumorskim učinkom i biomarkerima tvrde da je masena koncentracija of 25 µg/mL supstance dovoljna za učinkovito stanično oslikavanje (Zhao i sur., 2020).

U preliminarnom istraživanju (Šafranko i sur., 2021b), ispitan je utjecaj sintetiziranih uzoraka CQD@Pure (blank sustav bez dodatka aminokiselina), CQD@Gly i CQD@Arg na 5 različitih staničnih linija: HepG2 (humane stanične linije hepatocelularnog karcinoma jetra), CFPAC-1 (humane stanične linije duktalnog adenokarcinoma gušterače), MCF-7 (humane stanične linije adenokarcinoma dojke), HCT-116 (humane stanične linije karcinoma debeloga crijeva), HFF-1 (netransformirane stanice fibroblasta; normalne stanične linije). Rezultati su prikazani kao učinak IC_{50} koncentracija na antiproliferativni učinak staničnih linija. Zaključeno je da uzorci CQD@Pure i CQD@Arg nemaju antiproliferativni učinak na ispitane stanične linije, dok uzorak CQD@Gly pokazuje značajni i selektivni učinak na stanične linije CFPAC-1, odnosno na humane stanične linije duktalnog adenokarcinoma gušterače (IC_{50} = 6,91 ± 0,81 µg/mL), a na

ostale stanične tumorske linije HepG2, MCF-7, and HCT-116 nije zabilježen antiproliferativni učinak niti pri jednoj ispitanoj koncentraciji CQD@Gly.

Ovo saznanje upućuje na mogućnost dodatnog ispitivanja CQD na različite sintetske metode, uporabe prekursora/dopanta koji bi mogli iskazivati dobra optička svojstva, koristiti se u svrhe staničnog oslikavanja određenih stanica na koje nije pokazan citotoksični učinak, a opet se mogu koristiti u terapijske svrhe na stanice sa selektivnim antitumorskim učinkom, kao što je pokazano na primjeru CQD@Gly.

Mogući protuupalni učinak odabranih CQD_{CA+Leu}, CQD_{KK+Arg} i $CQD_{CA+KK+Leu}$ ispitan je pomoću inhibicije denaturacije proteina.. Kao referentni sustav se koristio ibuprofen, dok je za usporedbu pripremljen i vodeni ekstrakt kore klementine (pripremljen ultrazvučnom ekstrakcijom, t = 30 min). Ispitivanje se provelo na dva proteina, goveđem serumskom albuminu (BSA) i albuminu kokošjeg jajeta (ovalbumin). Rezultati u **Tablici 20** prikazani su za ispitivanja vodenih suspenzija CQD na BSA, dok su u **Tablici 21** prikazani za ovalbumin izraženi kao postotak (%) inhibicije denaturacije proteina. Mjerenja su provedena u duplikatima.

Tablica 20. Inhibicija denaturacije proteina BSA s odabranim uzorcima CQD.

Koncentracija CQD / μg/mL	**Kontrola**	**Inhibicija denaturacije proteina / %**			
	Ibuprofen	CQD_{CA+Leu}	CQD_{KK+Arg}	$CQD_{CA+KK+Leu}$	Vodeni ekstrakt KK*
750	60,80 ± 2,41	35,90 ± 3,63	64,83 ± 1,12	46,31 ± 1,85	64,69 ± 0,98
500	54,89 ± 3,19	18,18 ± 0,01	61,90 ± 0,03	43,55 ± 2,05	60,80 ± 2,41
250	33,24 ± 3,50	23,64 ± 5,14	58,95 ± 1,49	37,09 ± 2,54	57,14 ± 0,03
50	25,59 ± 4,82	23,11 ± 3,71	54,25 ± 1,85	11,86 ± 4,99	51,32 ± 1,87

* KK – kora klementine

Tablica 21. Inhibicija denaturacije proteina ovalbumina s odabranim uzorcima CQD.

Koncentracija CQD / µg/mL	Kontrola	Inhibicija denaturacije proteina / %			
	Ibuprofen	CQD_{CA+Leu}	CQD_{KK+Arg}	$CQD_{CA+KK+Leu}$	Vodeni ekstrakt KK*
750	76,39 ± 0,53	57,31 ± 2,62	80,55 ± 0,35	65,25 ± 1,37	81,69 ± 0,40
500	72,29 ± 0,74	40,21 ± 2,06	78,05 ± 0,57	59,94 ± 2,27	79,85 ± 0,11
250	68,35 ± 0,84	23,92 ± 4,17	76,32 ± 0,90	55,15 ± 0,85	77,45 ± 0,27
50	58,86 ± 1,42	4,77 ± 3,92	70,31 ± 0,35	51,88 ± 1,97	73,16 ± 0,67

* KK – kora klementine

Iz rezultata za inhibiciju denaturacije proteina BSA (**Tablica 20**) uočava se kako uzorak CQD_{CA+Leu} pokazuje nižu aktivnost u odnosu na kontrolu ibuprofena, dok je kod uzorka CQD_{KK+Arg} pokazana značajna inhibicija denaturacije proteina (64,83 ± 1,12 %) koja je čak i viša od inhibicije ibuprofena i koja je zapravo usporediva s aktivnošću vodenog ekstrakta kore klementine (64,69 ± 0,98 %) pri najvišim ispitanim koncentracijama uzorka od 750 µg/mL. Pri niskim koncentracijama od 50 µg/mL najveću aktivnost pokazuje uzorak CQD_{KK+Arg} (54,25 ± 1,85 %), a zatim slijedi ekstrakt kore klementine, ibuprofen, CQD_{CA+Leu} te $CQD_{CA+KK+Leu}$. Pri najmanjim ispitanim koncentracijama od 50 µg/mL CQD uzorka, najvišu aktivnost pokazuje uzorak CQD_{KK+Arg} s aktivnosti od 54,25 ± 1,85 %, dok CQD_{CA+Leu} pokazuje najmanju aktivnost od 23,11 ± 3,71 % inhibicije denaturacije proteina BSA.

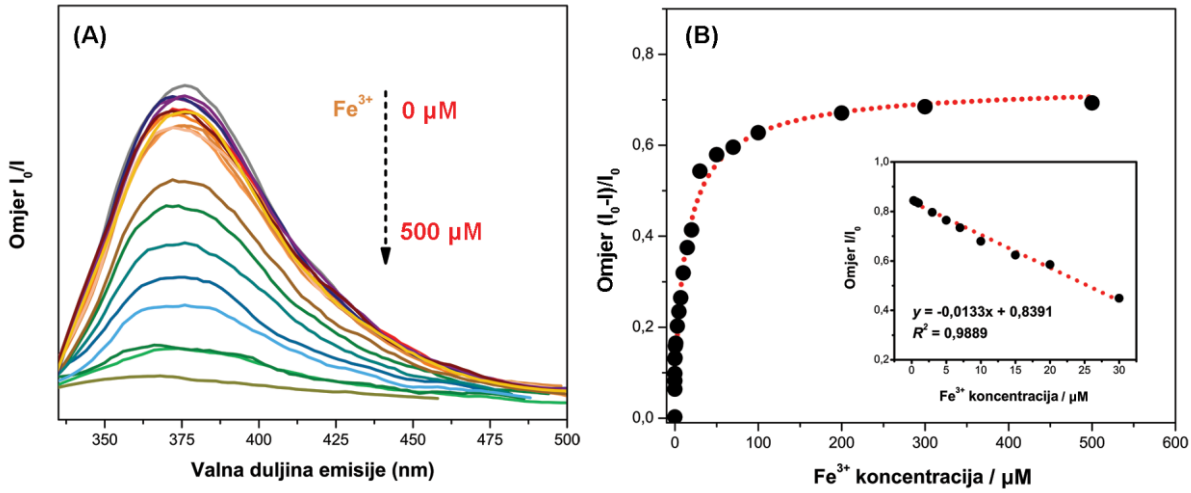
Nadalje, rezultati ispitani na ovalbuminu (**Tablica 21**) pokazuju najveću aktivnost vodenog ekstrakta kore klementine (81,69 ± 0,40 %) u odnosu na ibuprofen (76,39 ± 0,53 %). Slijede zatim CQD_{KK+Arg}, $CQD_{CA+KK+Leu}$ te CQD_{CA+Leu}. Pri najnižoj ispitanoj koncetraciji CQD od 50 µg/mL, najvišu aktivnost pokazuje vodeni ekstrakt kore klementine s inhibicijom denaturacije proteina od 73,16 ± 0,67 %, dok najmanju aktivnosti iskazuje uzorak CQD_{CA+Leu} s postotkom inhibicije od 4,77 ± 3,92 %. Pri najvišoj ispitanoj koncentraciji od 750 µg/mL, ponovno se uočava najviša aktivnost ekstrakta kore klementine od 81,69 ± 0,40 %, dok je najmanja zabilježena kod CQD_{CA+Leu} s 57,31 ± 2,62 % inhibicije denaturacije proteina.

Po definiciji, denaturacija proteina je proces u kojem proteini gube svoju kvaternu, tercijarnu i sekundarnu strukturu uslijed izlaganja određenim čimbenicima stresa ili kemijskim supstancama. U literaturi se najčešće navodi promjena pH, temperatura, uporaba kemikalija te reducirajućih agensa (Narayan i sur., 2019). Većina proteina prisutnih u biološkim sustavima gube svoju primarnu biološku funkciju uslijed denaturacije proteina (Ruiz-Ruiz i sur., 2017). Zapravo, poveznica između denaturacije proteina i protuupalnog učinka leži u tome da denaturacija proteina sudjeluje u stvaranju autoantigena u patološkim stanjima kao što je reumatski artritis, pojava karcinoma i dijabetesa koji su posljedica upalnih procesa. Stoga,

ukoliko se promovira inhibicija denaturacije proteina, može se ispitati i aktivacija protuupalnog učinka (Dharmadeva i sur., 2018). U svrhe aktivacije protuupalnog učinka se najčešće koriste nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID) i steroidi, od kojih su ibuprofen, aspirin i nalgesin najpoznatiji i koji se mogu kupiti u ljekarnama diljem Republike Hrvatske i svijeta bez liječničkog recepta. Međutim, isti ti lijekovi mogu stvarati i nepoželjne nuspojave koje najčešće uključuje gastrointestinalne smetnje poput mučnine, a mogu uzrokovati oštećenja na sluznici želuca i dvanaesnika s pojavom dispeptičkih simptoma i peptičkih lezija (ulceracije) (Krznarić i Kunović 2012). Mehanizam protuupalnog i antipiretičkog djelovanja NSAID lijekova objašnjava se inhibicijom ciklooksigenaze (COX) koja ima ulogu kataliziranja konverzije arahidonske kiseline u prostaglandine koji su odgovorni za nastanak boli, vrućice i upale (Krznarić i Kunović 2012). Iako su navedeni lijekovi izrazito učinkoviti u suzbijanju ovih patoloških stanja, potraga za agensima koji imaju slabije nuspojave, a isti učinak su dakako od interesa za istraživanje.

4.8.2. Ispitivanje primjene uzoraka na detekciju Fe^{3+} iona u modelnim i realnim uzorcima

Nakon što se utvrdio visoki afinitet uzorka CQD_{CA+Leu} prema Fe^{3+} ionima, detekcija Fe^{3+} iona ispitana je u koncentracijskom rasponu od 0,01 mol/dm^3 do 500 mol/dm^3 te je ovisnost omjera intenziteta I/I_0 o dodanoj koncentraciji Fe^{3+} iona prikazana grafički na **Slici 36**. Kao što se može uvidjeti, povećanjem koncentracije Fe^{3+} iona u suspenziju CQD_{CA+Leu}, dolazi do prigušenja signala intenziteta fotoluminescencije (**Slika 36A**).



Slika 36. Prikaz (A) ovisnosti dodane koncentracije Fe^{3+} iona o promjeni intenziteta fotoluminescencije uzorka CQD_{CA+Leu} i (B) ovisnost omjera $(I_0-I)/I_0$ o koncentraciji Fe^{3+} iona – **umetak:** linearni dio u rasponu koncentracija od 0,3 µmol/dm^3 do 30 µmol/dm^3 i R^2 = 0,9889.

S obzirom da je uočen određeni trend, prikazan je i dijagram sa simbolima koji je opisan logističkom funkcijom, odnosno jednadžbama (7 i 8):

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1+\left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2 \qquad (7)$$

gdje A_1 označava početnu vrijednost, A_2 konačnu vrijednost krivulje, x_0 označava centar funkcije, dok se parametar p odnosi na koeficijent strmine. Primjenom numeričkih koeficijenata dobivenih nelinearnom regresijom dobije se sljedeća jednadžba (8):

$$y = 0{,}0903 - 0{,}7382/(1 + (x/17{,}2847)^{0{,}89}) \qquad (8)$$

Za daljnju analitičku primjenu, određen je linearni dio (R^2 = 0,9889; **Slika 36B; umetak**) dobivene funkcije u rasponu koncentracija od 0,3 μmol/dm^3 do 30 μmol/dm^3 opisan jednadžbom (9):

$$y = -0{,}0133x + 0{,}8391 \quad (9)$$

gdje *y* označava promjenu intenziteta fotoluminescencije nakon dodatka određene koncentracije Fe^{3+} iona (*x*).

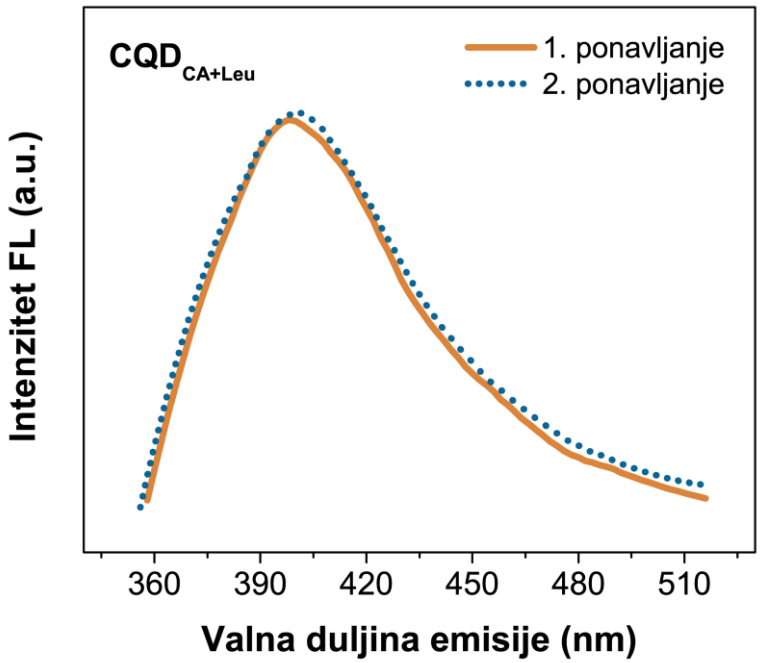
Izračunati su i parametri limita detekcije (LOD) i limita kvantifikacije (LOQ) koji su iznosili LOD = (1,77 ± 0,01) μmol/dm^3 i LOQ = (5,88 ± 0,04) μmol/dm^3, što upućuje na potencijalnu primjenu i u kompleksnijim sustavima.

Razvijena analitička metoda spektrofluorimetrije s korištenjem CQD_{CA+Leu} kao fluorescentnom nanoprobom ispitana je na realnim sustavima bunarske vode. Rezultati za određivanje Fe^{3+} iona u sustavu bunarske vode prikazani su u **Tablici 22**.

Tablica 22. Koncentracija Fe^{3+} iona u realnim uzorcima bunarske vode s CQD_{CA+Leu} kao nanoprobom.

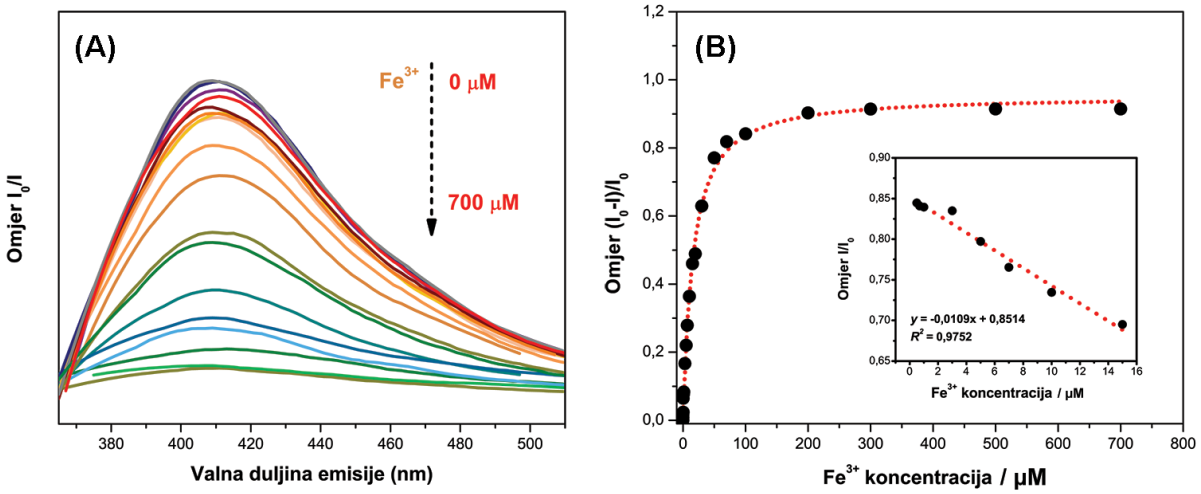
Uzorak	**Fe^{3+} određeno standardnom metodom / μg/L**	**$\gamma_{eksperimentalno}$ (Fe^{3+}) određeno s CQD metodom / μg/L**			**Iskorištenje / %**	**RSD / %**
		1. mjerenje	2. mjerenje	Srednja vrijednost masene koncentracije Fe^{3+} iona u uzorku		
16	1338,00	1449,24	1391,08	1420,16 ± 41,12	106,14	2,89
17	2036,00	1965,73	1989,54	1977,63 ± 16,84	97,13	0,85
18	4960,00	5121,45	5048,87	5085,15 ± 51,31	102,52	1,01

Iz prikazanih rezultata može se uočiti i dobra reproducibilnost mjerenja (**Slika 37**) i zadovoljavajuća točnost/preciznost mjerenja s fluorescentnom nanoprobom. Iskorištenja za određivanje Fe^{3+} iona u usporedbi s rezultatima dobivenih standardnom metodom HRN ISO 6332:1998 Kakvoća vode – Određivanje željeza – Spektrofotometrijska metoda s 1,10 fenantrolinom (ISO 6332:1988), variraju unutar raspona od 97,13 % do 106,14 % s RSD od 0,85 % do 2,89 %. Ovi rezultati upućuju na dobar potencijal u primjeni detekcije Fe^{3+} iona u monitoringu vode.



Slika 37. Dijagram dvaju ponavljanja detekcije Fe^{3+} iona s uzorkom CQD_{CA+Leu} u sustavu bunarske vode (uzorak 16).

Ista procedura je provedena i s $CQD_{CA+KK+Leu}$ uzorkom te je ovisnost omjera I/I_0 o koncentraciji dodanog Fe^{3+} iona u rasponu koncentracija od 0,01 µmol/dm^3 do 700 µmol/dm^3 prikazan na **Slici 38A**. Prikaz rezultata simbolima prikazuje nelinearnu ovisnost koja je opisana logističkom funkcijom s jednadžbom (10):



Slika 38. Prikaz (A) ovisnosti dodane koncentracije Fe^{3+} iona o promjeni intenziteta fotoluminescencije uzorka $CQD_{CA+KK+Leu}$ i (B) ovisnost omjera $(I_0-I)/I_0$ o koncentraciji Fe^{3+} iona – **umetak**: linearni dio u rasponu koncentracija od 0,5 µmol/dm^3 do 15 µmol/dm^3 i R^2 = 0,9752.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2 \quad (10)$$

gdje A_1 označava početnu vrijednost, A_2 konačnu vrijednost krivulje, x_0 označava centar funkcije, dok se parametar p odnosi na koeficijent strmine. Umetanjem numeričkih koeficijenata dobivenih nelinearnom regresijom, jednadžba glasi (11):

$$y = 0{,}9524 - 0{,}9348/(1 + (x/16{,}3125)^{1{,}08}) \quad (11)$$

Kako bi se ispitala potencijalna primjena na realnim uzorcima, određen je linearni dio (R^2 = 0,9752; **Slika 38B; umetak**) dobivene funkcije u rasponu koncentracija od 0,5 μmol/dm^3 do 15 μmol/dm^3 s odgovarajućom jednadžbom (12):

$$y = -0{,}0109x + 0{,}8514 \quad (12)$$

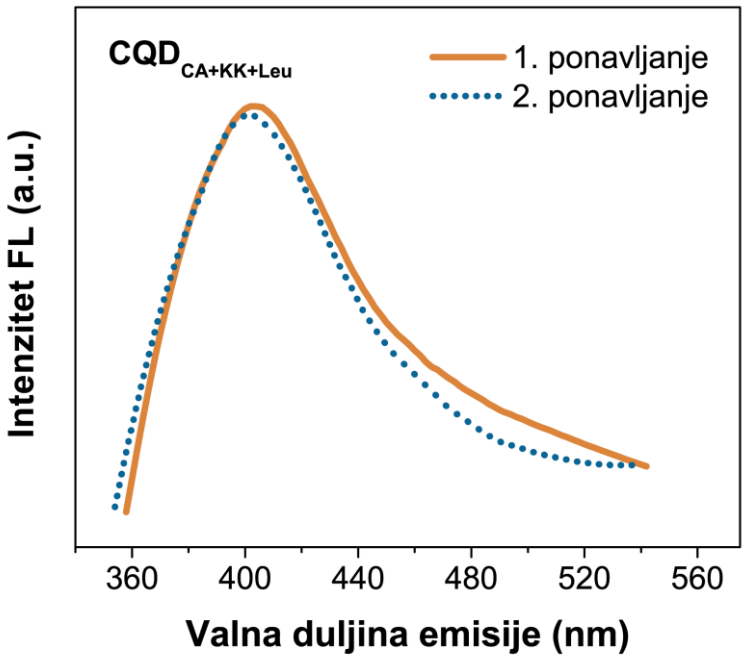
gdje oznaka y predstavlja promjenu intenziteta fluorescencije nakon dodatka određene koncentracije Fe^{3+} iona (x).

Izračunati su i parametri limita detekcije (LOD) i limita kvantifikacije (LOQ) koji iznose LOD = (2,72 ± 0,39) μmol/dm^3 i LOQ = (9,06 ± 1,29) μmol/dm^3, što također upućuje na potencijal u određivanju Fe^{3+} iona u realnim sustavima. Stoga, isto tako je provedeno ispitivanje detekcije Fe^{3+} iona na sustavu bunarske vode te su rezultati prikazani u **Tablici 23**.

Tablica 23. Koncentracija Fe^{3+} iona u realnim uzorcima bunarske vode s $CQD_{CA+KK+Leu}$ kao nanoprobom.

Uzorak	**Fe^{3+} određeno standardnom metodom / μg/L**	**$\gamma_{eksperimentalno}$ (Fe^{3+}) određeno s CQD metodom / μg/L**			**Iskorištenje / %**	**RSD / %**
		1. mjerenje	2. mjerenje	Srednja vrijednost masene koncentracije Fe^{3+} iona u uzorku		
16	1338,00	1443,47	1484,29	1463,88 ± 28,86	109,41	1,97
17	2036,00	2042,05	2106,26	2074,16 ± 45,40	101,87	2,19
18	4960,00	5027,48	4616,77	4822,12 ± 290,42	97,22	6,02

Kao što se iz rezultata može vidjeti, u odnosu na standardnu ISO metodu, raspon iskorištenja za mjerenje Fe^{3+} iona $CQD_{CA+KK+Leu}$ nanoprobom kreće se od 97,22 % do 109,41 % s RSD od 1,97 % do 6,02 %. S $CQD_{CA+KK+Leu}$ uzorkom vidljiva su veća odstupanja u dva ponavljanja (**Slika 39**), ali vrijednosti RSD nisu toliko značajne.



Slika 39. Dijagram dvaju ponavljanja detekcije Fe^{3+} iona s uzorkom $CQD_{CA+KK+Leu}$ u sustavu bunarske vode (uzorak 16).

U **Tablici 24**. prikazana je usporedba literaturnih navoda i istraživanja koja su provedena u sklopu ove doktorske disertacije. Naime, može se uočiti kako razvijene analitičke metode iskazuju niži LOD u odnosu na neke od prikazanih radova sa zadovoljavajućim linearnim rasponom za oba uzorka, CQD_{CA+Leu} i $CQD_{CA+KK+Leu}$. Također, zahvaljujući raznolikim svojstvima koje su se prezentirale rezultatima u doktorskoj disertaciji, primjena CQD je zaista širokog spektra i moguća i u analitičke i u biomedicinske svrhe.

Tablica 24. Literaturni pregled dosadašnjih objavljenih radova na tematiku CQD na bazi biomase i detekcije Fe^{3+} iona (izdvojeni parametri linearnog raspona, vrijednosti LOD te ostale moguće primjene).

Prekursor ugljika	Linearni raspon (μM)	LOD (μM)	Ostala primjena	Referenca
List korijandera	0−6	0,40	Stanično oslikavanje, antioksidacijska aktivnost	Sachdev i Gopinath 2015
Hidrogenirana smola	0−60	6,16	Stanično oslikavanje	Zhou i sur., 2020
Batat	1−100	0,32	Stanično oslikavanje	Shen i sur., 2017
Borovnica	12,5−100	9,97	-	Aslandaş i sur., 2015
Ostaci hrane	12,5−100	32,0	-	Ahn i sur., 2019
Šareni grah	30-600	9,55	-	Zulfajri i sur., 2019
Kora kivija	5-25	0,85	-	Atchudan i sur., 2021
Melasa šećerne trske	0−100	1,46	Stanično oslikavanje, detekcija bojila	Huang i sur., 2017
Chionanthus retusus voće	0−2	70,0	Stanično oslikavanje	Atchudan i sur., 2017
Kora banana	5-25	0,66	Stanično oslikavanje, fluorescentna boja	Atchudan i sur., 2020
Sok od jabuke	1-25	0,90	Stanično oslikavanje	Mehta i sur., 2015
Borassus flabellifer palma	10-100	2,01	Detekcija Fe^{3+} iona u modelnom sustavu i vodi	Nagaraj i sur., 2022
Bobice	10-100	1,8	Monitoring vode	Gu i sur., 2022
Kora klementine	7−50	4,57	Stanično oslikavanje, antitumorska i antioksidacijska aktivnost, fluorescentna boja	Šafranko i sur., 2021b
Kora klementine (1) CQD_{CA+Leu} i 2) $CQD_{CA+KK+Leu}$)	1) 0,3 - 30	1,77	Farmakološka (protuupalni učinak) i biološka aktivnost (antiradikalna aktivnost), biokompatibilnost, detekcija željeza u bunarskoj vodi	**Ovaj rad**
	2) 0,5 - 15	2,72		

Objašnjenje za specifični i visoki afiniet Fe^{3+} iona prema CQD pronalazimo u samoj kemijskoj i fizikalnoj prirodi CQD. U znanstvenoj studiji Zhu i sur. (2020), pojašnjeno je da vrlo vjerojatno dolazi do koordiniranja Fe^{3+} iona s amino i funkcijskim grupama na bazi kisika koje se nalaze na površini CQD čestica i koje uzrokuje prigušenje signala fotoluminescencije. Nešto detaljnije objašnjenje dala je skupina znanstvenika Issa i sur. (2020) koji navode da novonastale veze između Fe^{3+} iona i funkcijskih skupina na površini mogu uzrokovati migraciju elektrona iz pobuđenog stanja u polupopunjenu *d*-orbitalu Fe^{3+} elektronske konfiguracije $[Ar]3d^5$ uzrokujući prigušenje signala pojavom neradijativne rekombinacije ekscitona. Kako bi se objasnio točan mehanizam djelovanja i interakcije CQD s Fe^{3+} ionima, potrebno je provesti niz kompleksnijih mjerenja koja bi potencijalno dala odgovor o točnom udjelu i sastavu kemijskih funkcijskih skupina na površini čestica i vrstu prigušenja signala koji se odvija uslijed kompleksiranja Fe^{3+} iona i CQD.

5. ZAKLJUČCI

Slijedom rezultata dobivenih u ovoj disertaciji može se zaključiti sljedeće:

- Modelni uzorci CQD iskazali su visok QY s potencijalnom primjenom u razvoju analitičkih metoda. Najveći QY iskazao je CQD_{CA+Leu} (QY= 36,43 %) koji je pokazao dobru stabilnost i fizikalne karakteristike, međutim nije pokazao potencijal za biološka ispitivanja (izmjerena je zanemariva antiradikalna aktivnost) niti farmakološku (zanemariva inhibicija denaturacije proteina) aktivnost. Ispitivanja na tumorske stanične linije pokazala su izvrsnu biokompatibilnost. Velika prednost uzorka CQD_{CA+Leu} je visoki i selektivan afinitet CQD prema Fe^{3+} ionima s prigušenjem signala od ~ 90 %, dok je za ostale ispitane ione odziv bio zanemariv.
- U seriji sinteza CQD s korom klementine, uzorak CQD_{KK+Arg} iskazuje najveći QY = 4,59 % te pokazuje fotoluminescencijsku emisijsku sposobnost i u vidljivom području. Svi uzorci na bazi kore klementine iskazuju izvrsnu antiradikalnu aktivnost, ali nizak afinitet prema pojedinačnim metalnim ionima koja bi bila podloga za razvoj analitičke metode. Također, uzorci iskazuju dobru kemijsku stabilnost u različitim otapalima (aceton, DMSO, etanol, metanol) i u širem rasponu pH vrijednosti. Rezultati određivanja antiradikalne aktivnosti upućuju na najbolju aktivnost uzorka CQD_{KK} s najniže određenom EC_{50} vrijednosti od EC_{50} = (17,94 ± 1,12) µg/mL;
- Kombiniranjem vodenog ekstrakta kore klementine, limunske kiseline i aminokiseline Leu dobiven je hibridni uzorak $CQD_{CA+KK+Leu}$ koji je pokazao poželjna svojstva iz obje serije sinteze – dobra fizikalno-kemijska i optička svojstva te izvrsnu biološku i farmakološku aktivnost. Preoptimizacijom je pokazano da reakciji najbolje pogoduje kombinacija kore klementine, limunske kiseline od 500 mg te 175 mg Leu gdje je QY = 10,04 %. Ispitivanjem utjecaja pojedine varijable ili kombinacije obje (temperatura i vrijeme reakcije) pokazalo se da i temperatura i vrijeme imaju značajan utjecaj na zavisnu varijablu QY. Primijenjenim CCF planom pokusa dokazano je da je najveći QY = 17,04 % dobiven pri uvjetima od 200 °C kroz 12 sati. Rezultati su i eksperimentalno potvrđeni s dobivanjem srednje vrijednosti dvaju ponavljanja od QY = (17,52 ± 0.59) %, što bi značilo da je postotak pogreške, odnosno odstupanje od predviđene vrijednosti modela manja od 10 %. Ispitivanje odziva optimalnog $CQD_{CA+KK+Leu}$ na pojedine metalne ione pokazalo je visoki afinitet prema Fe^{3+} ionima, s prisutnim određenim afinitetom prema Cu^{2+}.
- Uzorci iz svake serije sinteze CQD_{CA+Leu}, CQD_{KK+Arg} i optimalni $CQD_{CA+KK+Leu}$ okarakterizirani su te su im utvrđena karakteristična svojstva CQD, dobra disperzivnost nakon pročišćavanja, dobra kemijska stabilnost (čak i pri visokim ionskim jakostima), biokompatibilnost, amorfna priroda čestica u nanoskali te je postavljena pretpostavka o prisutnosti funkcijskih skupina na bazi kisika i dušika. Provedenom analizom EDS

pokazano je da u uzorcima bez dodatka aminokiseline nije detektiran dušik, dok u uzorcima s aminokiselinom dušik je detektiran u različitim udjelima.

- Uzorci CQD_{CA+Leu}, CQD_{KK+Arg} i optimalni $CQD_{CA+KK+Leu}$ pokazali su izvrsnu biokompatibilnost na ispitane stanične linije HeLa, CaCo-2, NCI-H358 te D54 čime je pokazana potencijalna primjena nanočestica CQD u staničnom oslikavanju tumorskih staničnih linija. Ispitivanje protuupalnog učinka pokazalo je kako vodeni ekstrakt kore klementine i CQD_{KK+Arg} iskazuju najbolji protuupalni učinak, dok je uzorak CQD_{CA+Leu} iskazao najniži protuupalni učinak.
- Model za određivanje Fe^{3+} iona u vodenom mediju s CQD_{CA+Leu} fluorescentnom nanoprobom opisan je logističkom funkcijom s određenim linearnim dijelom u rasponu Fe^{3+} koncentracija od 0,3 μmol/dm^3 do 30 μmol/dm^3 te s određenim LOD = (1,77 ± 0,01) μmol/dm^3 i limitom kvantifikacije LOQ = (5,88 ± 0,04) μmol/dm^3, što upućuje na potencijalni primjenu i u kompleksnijim sustavima. Razvijen je i model određivanja Fe^{3+} iona u vodenom mediju za $CQD_{CA+KK+Leu}$ koji je također opisan logističkom funkcijom i određen je linearni dio u rasponu Fe^{3+} koncentracija od 0,5 μmol/dm^3 do 15 μmol/dm^3 s određenim LOD = (2,72 ± 0,39) μmol/dm^3 i LOQ = (9,06 ± 1,29) μmol/dm^3. Iskorištenja i RSD parametri za oba uzorka CQD su bili zadovoljavajući za ispitivanje u realnim sustavima te su uzorci CQD_{CA+Leu} i $CQD_{CA+KK+Leu}$ uspješno ispitani i na realnim uzorcima bunarske vode.

6. LITERATURA

Abbas, A., Tabish, T.A., Bull, S.J., Lim, T.M., Phan, A.N., 2020. High yield synthesis of graphene quantum dots from biomass waste as a highly selective probe for Fe^{3+} sensing. Sci. Rep. 10, 21262.

Achadu, O.J., Lioe, D.X., Kagawa, K., Kawahito, S., Park, E.Y., 2020. Fluoroimmunoassay of influenza virus using sulfur-doped graphitic carbon nitride quantum dots coupled with Ag_2S nanocrystals. Microchim. Acta 187, 466.

Afreen, S., Omar, R.A., Talreja, N., Chauhan, D., Ashfaq, M., 2018. Carbon-Based Nanostructured Materials for Energy and Environmental Remediation Applications, in: Prasad, R., Aranda, E. (Eds.), Approaches in Bioremediation, Nanotechnology in the Life Sciences. Springer International Publishing, Cham, str. 369–392.

Ahn, J., Song, Y., Kwon, J.E., Woo, J., Kim, H., 2019. Characterization of food waste-driven carbon dot focusing on chemical structural, electron relaxation behavior and Fe^{3+} selective sensing. Data in Brief 25, 104038.

Ai, L., Yang, Y., Wang, B., Chang, J., Tang, Z., Yang, B., Lu, S., 2021. Insights into photoluminescence mechanisms of carbon dots: advances and perspectives. Sci. Bull. 66, 839–856.

Al Jahdaly, B.A., Elsadek, M.F., Ahmed, B.M., Farahat, M.F., Taher, M.M., Khalil, A.M., 2021. Outstanding Graphene Quantum Dots from Carbon Source for Biomedical and Corrosion Inhibition Applications: A Review. Sustainability 13, 2127.

Alam, A.-M., Park, B.-Y., Ghouri, Z.K., Park, M., Kim, H.-Y., 2015. Synthesis of carbon quantum dots from cabbage with down- and up-conversion photoluminescence properties: excellent imaging agent for biomedical applications. Green Chem. 17, 3791–3797.

Anastas, P., Eghbali, N., 2010. Green Chemistry: Principles and Practice. Chem. Soc. Rev. 39, 301–312.

Aslandaş, A.M., Balcı, N., Arık, M., Şakiroğlu, H., Onganer, Y., Meral, K., 2015. Liquid nitrogen-assisted synthesis of fluorescent carbon dots from Blueberry and their performance in Fe^{3+} detection. Appl. Surf. Sci. 356, 747–752.

Atchudan, R., Edison, T.N.J.I., Chakradhar, D., Perumal, S., Shim, J.-J., Lee, Y.R., 2017. Facile green synthesis of nitrogen-doped carbon dots using *Chionanthus retusus* fruit extract and investigation of their suitability for metal ion sensing and biological applications. Sens. Actuators B Chem. 246, 497–509.

Atchudan, R., Edison, T.N.J.I., Perumal, S., Muthuchamy, N., Lee, Y.R., 2020. Hydrophilic nitrogen-doped carbon dots from biowaste using dwarf banana peel for environmental and biological applications. Fuel 275, 117821.

Atchudan, R., Edison, T.N.J.I., Perumal, S., Vinodh, R., Sundramoorthy, A.K., Babu, R.S., Lee, Y.R., 2021. Leftover Kiwi Fruit Peel-Derived Carbon Dots as a Highly Selective Fluorescent Sensor for Detection of Ferric Ion. Chemosensors 9, 166.

Atyabi, F., Farkhondehfai, A., Esmaeili, F., Dinarvand, R., 2009. Preparation of pegylated nano-liposomal formulation containing SN-38: *In vitro* characterization and *in vivo* biodistribution in mice. Acta Pharm. 59, 133–144.

Bahraminasab, M., Jahan, A., Sahari, B., Arumugam, M., Shamsborhan, M., Hassan, M.R., 2013. Using Design of Experiments Methods for Assessing Peak Contact Pressure to Material Properties of Soft Tissue in Human Knee. J. Med. Eng. 2013, 1–11.

Bandi, R., Gangapuram, B.R., Dadigala, R., Eslavath, R., Singh, S.S., Guttena, V., 2016. Facile and green synthesis of fluorescent carbon dots from onion waste and their potential applications as sensor and multicolour imaging agents. RSC Adv. 6, 28633–28639.

Bano, D., Kumar, V., Singh, V.K., Hasan, S.H., 2018. Green synthesis of fluorescent carbon quantum dots for the detection of mercury(II) and glutathione. New J. Chem. 42, 5814–5821.

Batool, M., Junaid, H.M., Tabassum, S., Kanwal, F., Abid, K., Fatima, Z., Shah, A.T., 2022. Metal Ion Detection by Carbon Dots—A Review. Crit. Rev. Anal. Chem. 52, 756–767.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Gatto, G.J., Stryer, L., 2019. Biochemistry, Ninth edition. ed. Macmillan International, Higher Eduction, New York.

Berk, Zeki, 2016. Citrus Fruit Processing, First Edition. ed. Elsevier, London, UK.

Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escaleira, L.A., 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta 76, 965–977.

Boruah, A., Saikia, M., Das, T., Goswamee, R.L., Saikia, B.K., 2020. Blue-emitting fluorescent carbon quantum dots from waste biomass sources and their application in fluoride ion detection in water. J. Photochem. Photobiol 209, 111940.

Box, G.E.P., Wilson, K.B., 1992. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions, in: Kotz, S., Johnson, N.L. (Eds.), Breakthroughs in Statistics, Springer Series in Statistics. Springer New York, New York, NY, str. 270–310.

Cai, R., Xiao, L., Liu, M., Du, F., Wang, Z., 2021. Recent Advances in Functional Carbon Quantum Dots for Antitumour. IJN Volume 16, 7195–7229.

Chahal, S., Yousefi, N., Tufenkji, N., 2020. Green Synthesis of High Quantum Yield Carbon Dots from Phenylalanine and Citric Acid: Role of Stoichiometry and Nitrogen Doping. ACS Sustainable Chem. Eng. 8, 5566–5575.

Chandra, S., Chatterjee, P., Dey, P., Bhattacharya, S., 2012. Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2, S178–S180.

Chang, S., Chen, B.-B., Gao, Y.-T., Zheng, Y.-H., Shi, J.-F., Qian, R.-C., Li, D.-W., 2022. Ultra-Sensitive Detection of Dmso Using Carbon Dots with Hydrogen Bond-Controlled Aggregation Behavior. SSRN Journal.

Chan, K.K., Yang, C., Chien, Y.-H., Panwar, N., Yong, K.-T., 2019. A facile synthesis of label-free carbon dots with unique selectivity-tunable characteristics for ferric ion detection and cellular imaging applications. New J. Chem. 43, 4734–4744.

Chao, D., Lyu, W., Liu, Y., Zhou, L., Zhang, Q., Deng, R., Zhang, H., 2018. Solvent-dependent carbon dots and their applications in the detection of water in organic solvents. J. Mater. Chem. C 6, 7527–7532.

Cheigh, C.-I., Chung, E.-Y., Chung, M.-S., 2012. Enhanced extraction of flavanones hesperidin and narirutin from *Citrus unshiu* peel using subcritical water. J. Food Eng. 110, 472–477.

Chen, B.B., Liu, M.L., Li, C.M., Huang, C.Z., 2019. Fluorescent Carbon Dots Functionalization. Adv. Colloid Interface Sci. 270, 165–190.

Chen, C.-Y., Tsai, Y.-H., Chang, C.-W., 2019. Evaluation of the dialysis time required for carbon dots by HPLC and the properties of carbon dots after HPLC fractionation. New J. Chem. 43, 6153–6159.

Chen, W., Guo, P., Song, J., Cao, W., Bian, J., 2006. The ortho hydroxy-amino group: Another choice for synthesizing novel antioxidants. Bioorg. Med. Chem. Lett. 16, 3582–3585.

Chen, Y., Sun, X., Pan, W., Yu, G., Wang, J., 2020. Fe^{3+}-Sensitive Carbon Dots for Detection of Fe^{3+} in Aqueous Solution and Intracellular Imaging of Fe^{3+} Inside Fungal Cells. Front. Chem. 7, 911.

Chinnathambi, S., Abu, N., Hanagata, N., 2017. Biocompatible CdSe/ZnS quantum dot micelles for long-term cell imaging without alteration to the native structure of the blood plasma protein human serum albumin. RSC Adv. 7, 2392–2402.

Chu, K.-W., Lee, S., Chang, C.-J., Liu, L., 2019. Recent Progress of Carbon Dot Precursors and Photocatalysis Applications. Polymers 11, 689.

Chung, J.Y., Kim, H.-S., Song, J., 2018. Iron metabolism in diabetes-induced Alzheimer's disease: a focus on insulin resistance in the brain. Biometals 31, 705–714.

Crista, D.M.A., Esteves da Silva, J.C.G., Pinto da Silva, L., 2020. Evaluation of Different Bottom-up Routes for the Fabrication of Carbon Dots. Nanomaterials 10, 1316.

Das, A., Kundelev, E.V., Vedernikova, A.A., Cherevkov, S.A., Danilov, D.V., Koroleva, A.V., Zhizhin, E.V., Tsypkin, A.N., Litvin, A.P., Baranov, A.V., Fedorov, A.V., Ushakova, E.V., Rogach, A.L., 2022. Revealing the nature of optical activity in carbon dots produced from different chiral precursor molecules. Light Sci. Appl. 11, 92.

Das, G.S., Shim, J.P., Bhatnagar, A., Tripathi, K.M., Kim, T., 2019. Biomass-derived Carbon Quantum Dots for Visible-Light-Induced Photocatalysis and Label-Free Detection of Fe(III) and Ascorbic acid. Sci. Rep. 9, 15084.

De, B., Karak, N., 2013. A green and facile approach for the synthesis of water soluble fluorescent carbon dots from banana juice. RSC Adv. 3, 8286.

Dela Cruz, Ma.I.S., Thongsai, N., de Luna, M.D.G., In, I., Paoprasert, P., 2019. Preparation of highly photoluminescent carbon dots from polyurethane: Optimization using response surface methodology and selective detection of silver (I) ion. Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. 568, 184–194.

Deng, X., Feng, Y., Li, H., Du, Z., Teng, Q., Wang, H., 2018. N-doped carbon quantum dots as fluorescent probes for highly selective and sensitive detection of Fe^{3+} ions. Particuology 41, 94–100.

Derringer, G., Suich, R., 1980. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. J. Qual. Technol. 12, 214–219.

Dharmadeva, S., Galgamuwa, L., Prasadinie, C., Kumarasinghe, N., 2018. *In vitro* anti-inflammatory activity of *Ficus racemosa* L. bark using albumin denaturation method. AYU 39, 239.

Dimos, K., 2016. Carbon Quantum Dots: Surface Passivation and Functionalization. COC 20, 682–695.

Ding, H., Wei, J.-S., Zhang, P., Zhou, Z.-Y., Gao, Q.-Y., Xiong, H.-M., 2018. Solvent-Controlled Synthesis of Highly Luminescent Carbon Dots with a Wide Color Gamut and Narrowed Emission Peak Widths. Small 14, 1800612.

Ding, H., Yu, S.-B., Wei, J.-S., Xiong, H.-M., 2016. Full-Color Light-Emitting Carbon Dots with a Surface-State-Controlled Luminescence Mechanism. ACS Nano 10, 484–491.

Djimtoingar, S.S., Derkyi, N.S.A., Kuranchie, F.A., Yankyera, J.K., 2022. A review of response surface methodology for biogas process optimization. Cogent Engineering 9, 2115283.

Dong, X., Liang, W., Meziani, M.J., Sun, Y.-P., Yang, L., 2020. Carbon Dots as Potent Antimicrobial Agents. Theranostics 10, 671–686.

Dsouza, S.D., Buerkle, M., Brunet, P., Maddi, C., Padmanaban, D.B., Morelli, A., Payam, A.F., Maguire, P., Mariotti, D., Svrcek, V., 2021. The importance of surface states in N-doped carbon quantum dots. Carbon 183, 1–11.

Dufrêne, Y.F., 2002. Atomic Force Microscopy, a Powerful Tool in Microbiology. J. Bacteriol. 184, 5205–5213.

Dugam, S., Nangare, S., Patil, P., Jadhav, N., 2021. Carbon dots: A novel trend in pharmaceutical applications. Ann. pharm. fr. 79, 335–345.

Edison, T.N.J.I., Atchudan, R., Sethuraman, M.G., Shim, J.-J., Lee, Y.R., 2016. Microwave assisted green synthesis of fluorescent N-doped carbon dots: Cytotoxicity and bio-imaging applications. J. Photochem. Photobiol. 161, 154–161.

Escobedo, J.O., Rusin, O., Lim, S., Strongin, R.M., 2010. NIR dyes for bioimaging applications. Curr. Opin. Chem. Biol. 14, 64–70.

Essner, J.B., Kist, J.A., Polo-Parada, L., Baker, G.A., 2018. Artifacts and Errors Associated with the Ubiquitous Presence of Fluorescent Impurities in Carbon Nanodots. Chem. Mater. 30, 1878–1887.

Ezati, P., Rhim, J.-W., Molaei, R., Priyadarshi, R., Roy, S., Min, S., Kim, Y.H., Lee, S.-G., Han, S., 2022a. Preparation and characterization of B, S, and N-doped glucose carbon dots: Antibacterial, antifungal, and antioxidant activity. SM&T 32, e00397.

Ezati, P., Rhim, J.-W., Molaei, R., Rezaei, Z., 2022b. Carbon quantum dots-based antifungal coating film for active packaging application of avocado. Food Packag. Shelf Life 33, 100878.

Farshbaf, M., Davaran, S., Rahimi, F., Annabi, N., Salehi, R., Akbarzadeh, A., 2018. Carbon quantum dots: recent progresses on synthesis, surface modification and applications. Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. 46, 1331–1348.

Feng, Z., Li, Z., Zhang, X., Shi, Y., Zhou, N., 2017. Nitrogen-Doped Carbon Quantum Dots as Fluorescent Probes for Sensitive and Selective Detection of Nitrite. Molecules 22, 2061.

Gambhire, M., Juvekar, A., Wankhede, S., 2009. Evaluation of anti-inflammatory activity of methanol extract of Barleria Cristata leaves by in vivo and in vitro methods. IJPHARM 7.

Gao, X., Du, C., Zhuang, Z., Chen, W., 2016. Carbon quantum dot-based nanoprobes for metal ion detection. J. Mater. Chem. C 4, 6927–6945.

Ghosh Dastidar, D., Mukherjee, P., Ghosh, D., Banerjee, D., 2021. Carbon quantum dots prepared from onion extract as fluorescence turn-on probes for selective estimation of Zn^{2+} in blood plasma. Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp. 611, 125781.

Goldstein, J., Cryer, B., 2015. Gastrointestinal injury associated with NSAID use: a case study and review of risk factors and preventative strategies. DHPS 31.

Gong, X., Chin Paau, M., Hu, Q., Shuang, S., Dong, C., Choi, M.M.F., 2016. UHPLC combined with mass spectrometric study of as-synthesized carbon dots samples. Talanta 146, 340–350.

Goos, P., Jones, B., 2011. Optimal design of experiments: a case study approach. Wiley, Hoboken, N.J.

Goswami, T., Rolfs, A., Hediger, M.A., 2002. Iron transport: emerging roles in health and disease. Biochem. Cell Biol. 80, 679–689.

Gu, L., Zhang, J., Yang, G., Tang, Y., Zhang, X., Huang, X., Zhai, W., Fodjo, E.K., Kong, C., 2022. Green preparation of carbon quantum dots with wolfberry as on-off-on nanosensors for the detection of Fe3+ and l-ascorbic acid. Food Chem. 376, 131898.

Gudimella, K.K., Appidi, T., Wu, H.-F., Battula, V., Jogdand, A., Rengan, A.K., Gedda, G., 2021. Sand bath assisted green synthesis of carbon dots from citrus fruit peels for free radical scavenging and cell imaging. Colloids Surf. B. 197, 111362.

Gunathilake, K., Ranaweera, K., Rupasinghe, H., 2018. In Vitro Anti-Inflammatory Properties of Selected Green Leafy Vegetables. Biomedicines 6, 107.

Guo, F., Zhu, Z., Zheng, Z., Jin, Y., Di, X., Xu, Z., Guan, H., 2020. Facile synthesis of highly efficient fluorescent carbon dots for tetracycline detection. Environ. Sci. Pollut. Res. 27, 4520–4527.

Han, X., Li, S., Peng, Z., Al-Yuobi, A.O., Omar Bashammakh, A.S., El-Shahawi, M.S., Leblanc, R.M., 2016. Interactions between Carbon Nanomaterials and Biomolecules. J. Oleo Sci. 65, 1–7.

Hong, G., Antaris, A.L., Dai, H., 2017. Near-infrared fluorophores for biomedical imaging. Nat. Biomed. Eng. 1, 0010.

Hu, X., Li, Yanxiao, Xu, Y., Gan, Z., Zou, X., Shi, J., Huang, X., Li, Z., Li, Yahui, 2021. Green one-step synthesis of carbon quantum dots from orange peel for fluorescent detection of *Escherichia coli* in milk. Food Chem. 339, 127775.

Hu, Y., Neumann, C., Scholtz, L., Turchanin, A., Resch-Genger, U., Eigler, S., 2022. Polarity, intramolecular charge transfer, and hydrogen bond co-mediated solvent effects on the optical properties of graphene quantum dots. Nano Res.

Huang, G., Chen, X., Wang, C., Zheng, H., Huang, Z., Chen, D., Xie, H., 2017. Photoluminescent carbon dots derived from sugarcane molasses: synthesis, properties, and applications. RSC Adv. 7, 47840–47847.

Huremović, J., Gojak-Salimović, S., Huseinbašić, N., Kapo, D., Bukva, M., 2019. Iron Content in Fruits, Vegetables, Herbs and Spices Samples Marketed in Sarajevo, Bosnia and Herzegovina. Kem. ind. 68, 281–287.

Ibrahim, M., Hossain, M.A., Shajib, M.S., Rashid, M.A., 2018. Preliminary Phytochemical and Pharmacological Screenings of Plumbago indica L. and Alpinia conchigera Griff. Dhaka Univ. J. Pharm. Sci 17, 73–79.

Ionita, P., 2021. The Chemistry of DPPH· Free Radical and Congeners. IJMS 22, 1545.

Issa, M., Z. Abidin, Z., Sobri, S., Rashid, S., Adzir Mahdi, M., Azowa Ibrahim, N., Y. Pudza, M., 2019. Facile Synthesis of Nitrogen-Doped Carbon Dots from Lignocellulosic Waste. Nanomaterials 9, 1500.

Issa, M.A., Abidin, Z.Z., Sobri, S., Rashid, S.A., Mahdi, M.A., Ibrahim, N.A., 2020. Fluorescent recognition of Fe^{3+} in acidic environment by enhanced-quantum yield N-doped carbon dots: optimization of variables using central composite design. Sci. Rep. 10, 11710.

Jablonski, A., 1933. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. Nature 131, 839–840.

Jankovic, A., Chaudhary, G., Goia, F., 2021. Designing the design of experiments (DOE) – An investigation on the influence of different factorial designs on the characterization of complex systems. Energy and Build. 250, 111298.

Javed, N., O'Carroll, D.M., 2021a. Long-term Effects of Impurities on the Particle Size and Optical Emission of Carbon Dots. Nanoscale Adv. 3, 182–189.

Javed, N., O'Carroll, D.M., 2021b. Carbon Dots and Stability of Their Optical Properties. Part. Part. Syst. Charact. 38, 2000271.

Jelinek, R., 2017. Introduction, in: Carbon Quantum Dots, Carbon Nanostructures. Springer International Publishing, Cham, str. 1–3.

Ji, C., Zhou, Y., Leblanc, R.M., Peng, Z., 2020. Recent Developments of Carbon Dots in Biosensing: A Review. ACS Sens. 5, 2724–2741.

Ji, Z., Sheardy, A., Zeng, Z., Zhang, W., Chevva, H., Allado, K., Yin, Z., Wei, J., 2019. Tuning the Functional Groups on Carbon Nanodots and Antioxidant Studies. Molecules 24, 152.

Jiang, X., Shi, Y., Liu, X., Wang, M., Song, P., Xu, F., Zhang, X., 2018. Synthesis of Nitrogen-Doped Lignin/DES Carbon Quantum Dots as a Fluorescent Probe for the Detection of Fe^{3+} Ions. Polymers 10, 1282.

Jin, H., Gui, R., Wang, Y., Sun, J., 2017. Carrot-derived carbon dots modified with polyethyleneimine and nile blue for ratiometric two-photon fluorescence turn-on sensing of sulfide anion in biological fluids. Talanta 169, 141–148.

Jing, S., Zhao, Y., Sun, R.-C., Zhong, L., Peng, X., 2019. Facile and High-Yield Synthesis of Carbon Quantum Dots from Biomass-Derived Carbons at Mild Condition. ACS Sustainable Chem. Eng. 7, 7833–7843.

Jokić, S., Molnar, M., Cikoš, A.-M., Jakovljević, M., Šafranko, S., Jerković, I., 2020. Separation of selected bioactive compounds from orange peel using the sequence of supercritical CO_2 extraction and ultrasound solvent extraction: optimization of limonene and hesperidin content. Sep. Sci. Technol. 55, 2799–2811.

Jokić, S., Šafranko, S., Jakovljević, M., Cikoš, A.-M., Kajić, N., Kolarević, F., Babić, J., Molnar, M., 2019. Sustainable Green Procedure for Extraction of Hesperidin from Selected Croatian Mandarin Peels. Processes 7, 469.

Jorns, M., Pappas, D., 2021. A Review of Fluorescent Carbon Dots, Their Synthesis, Physical and Chemical Characteristics, and Applications. Nanomaterials 11, 1448.

Kalaiyarasan, G., Joseph, J., Kumar, P., 2020. Phosphorus-Doped Carbon Quantum Dots as Fluorometric Probes for Iron Detection. ACS Omega 5, 22278–22288.

Kang, C., Huang, Y., Yang, H., Yan, X.F., Chen, Z.P., 2020. A Review of Carbon Dots Produced from Biomass Wastes. Nanomaterials 10, 2316.

Kapusniak (Jochym), K., Wojcik, M., Wrobel, K., Rosicka-Kaczmarek, J., Kapusniak, J., 2021. Assessment of physicochemical and thermal properties of soluble dextrin fiber from potato starch for use in fruit mousses. J. Sci. Food Agric. 101, 4125–4133.

Khairol Anuar, N.K., Tan, H.L., Lim, Y.P., So'aib, M.S., Abu Bakar, N.F., 2021. A Review on Multifunctional Carbon-Dots Synthesized From Biomass Waste: Design/ Fabrication, Characterization and Applications. Front. Energy Res. 9, 626549.

Khan, F., Pattanayak, S.K., Verma, P.R., Dewangan, P.K., 2020. Biofabrication of graphene QDs as a fluorescent nanosensor for detection of toxic and heavy metals in biological and environmental samples, in: Smart Biosensors in Medical Care. Elsevier, str. 139–152.

Khayal, A., Dawane, V., Amin, M.A., Tirth, V., Yadav, V.K., Algahtani, A., Khan, S.H., Islam, S., Yadav, K.K., Jeon, B.-H., 2021. Advances in the Methods for the Synthesis of Carbon Dots and Their Emerging Applications. Polymers 13, 3190.

Kim, K., Kim, J., 2018. Synthesis of Carbon Quantum Dots from Jujubes for Detection of Iron(III) Ions. J. Nanosci. Nanotechnol. 18, 1320–1322.

Kim, Y., Kim, J., 2020. Bioinspired thiol functionalized carbon dots for rapid detection of lead(II) ions in human serum. Opt. Mater. 99, 109514.

Kou, X., Jiang, S., Park, S.-J., Meng, L.-Y., 2020. A review: recent advances in preparations and applications of heteroatom-doped carbon quantum dots. Dalton Trans. 49, 6915–6938.

Kour, R., Arya, S., Young, S.-J., Gupta, V., Bandhoria, P., Khosla, A., 2020. Review—Recent Advances in Carbon Nanomaterials as Electrochemical Biosensors. J. Electrochem. Soc. 167, 037555.

Koutsogiannis, P., Thomou, E., Stamatis, H., Gournis, D., Rudolf, P., 2020. Advances in fluorescent carbon dots for biomedical applications. Adv. Phys.: X. 5, 1758592.

Kroto, H.W., Heath, J.R., O'Brien, S.C., Curl, R.F., Smalley, R.E., 1985. C60: Buckminsterfullerene. Nature 318, 162–163.

Krznarić, Ž., Kunović, A., 2012. Gastrointestinalne komplikacije primjene NSAR i antikoagulantne terapije. Medicus 21, 223–229.

Kumar, P., Dua, S., Kaur, R., Kumar, M., Bhatt, G., 2022. A review on advancements in carbon quantum dots and their application in photovoltaics. RSC Adv. 12, 4714–4759.

Kumari, M., Gupta, S.K., 2019. Response surface methodological (RSM) approach for optimizing the removal of trihalomethanes (THMs) and its precursor's by surfactant modified magnetic nanoadsorbents (sMNP) - An endeavor to diminish probable cancer risk. Sci. Rep. 9, 18339.

Lachos-Perez, D., Baseggio, A.M., Mayanga-Torres, P.C., Maróstica, M.R., Rostagno, M.A., Martínez, J., Forster-Carneiro, T., 2018. Subcritical water extraction of flavanones from defatted orange peel. J. Supercrit. Fluids 138, 7–16.

Lai, Z., Guo, X., Cheng, Z., Ruan, G., Du, F., 2020. Green Synthesis of Fluorescent Carbon Dots from Cherry Tomatoes for Highly Effective Detection of Trifluralin Herbicide in Soil Samples. ChemistrySelect 5, 1956–1960.

Lam, P.-L., Wong, R.S.-M., Lam, K.-H., Hung, L.-K., Wong, M.-M., Yung, L.-H., Ho, Y.-W., Wong, W.-Y., Hau, D.K.-P., Gambari, R., Chui, C.-H., 2020. The role of reactive oxygen species in the biological activity of antimicrobial agents: An updated mini review. Chem. Biol. Interact. 320, 109023.

Lambros, M., Tran, T. (Henry), Fei, Q., Nicolaou, M., 2022. Citric Acid: A Multifunctional Pharmaceutical Excipient. Pharmaceutics 14, 972.

Lee, R., 2019. Statistical Design of Experiments for Screening and Optimization. Chemie Ingenieur Technik 91, 191–200.

Li, B., Kim, J.M., Amaratunga, G.A.J., 2019. Inorganic Quantum Dot Materials and their Applications in “Organic” Hybrid Solar Cells. Isr. J. Chem. 59, 720–728.

Li, J., Zhu, J.-J., 2013. Quantum dots for fluorescent biosensing and bio-imaging applications. Analyst 138, 2506.

Li, L., Ren, X., Bai, P., Liu, Y., Xu, W., Xie, J., Zhang, R., 2021. Near-infrared emission carbon dots for bio-imaging applications. New Carbon Mater. 36, 632–638.

Li, P., Xue, S., Sun, L., Zong, X., An, L., Qu, D., Wang, X., Sun, Z., 2022. Formation and fluorescent mechanism of red emissive carbon dots from o-phenylenediamine and catechol system. Light Sci. Appl. 11, 298.

Li, X., Zhang, S., Kulinich, S.A., Liu, Y., Zeng, H., 2015. Engineering surface states of carbon dots to achieve controllable luminescence for solid-luminescent composites and sensitive Be^{2+} detection. Sci. Rep. 4, 4976.

Liang, Z., Zeng, L., Cao, X., Wang, Q., Wang, X., Sun, R., 2014. Sustainable carbon quantum dots from forestry and agricultural biomass with amplified photoluminescence by simple NH_4OH passivation. J. Mater. Chem. C 2, 9760–9766.

Liu, L., Zhang, S., Zheng, X., Li, H., Chen, Q., Qin, K., Ding, Y., Wei, Y., 2021. Carbon dots derived from *Fusobacterium nucleatum* for intracellular determination of Fe^{3+} and bioimaging both *in vitro* and *in vivo*. Anal. Methods 13, 1121–1131.

Liu, M., 2020. Optical Properties of Carbon Dots: A Review. NAT 1, 1–12.

Liu, W., Li, C., Sun, X., Pan, W., Yu, G., Wang, J., 2017. Highly crystalline carbon dots from fresh tomato: UV emission and quantum confinement. Nanotechnology 28, 485705.

Liu, X., Lu, J., Chen, J., Zhang, M., Chen, Y., Xing, F., Feng, L., 2020. Chiral Self-Assembly of Porphyrins Induced by Chiral Carbon Dots. Front. Chem. 8, 670.

Liu, H., Yang, J., Li, Z., Xiao, L., Aryee, A.A., Sun, Y., Yang, R., Meng, H., Qu, L., Lin, Y., Zhang, X., 2019. Hydrogen-Bond-Induced Emission of Carbon Dots for Wash-Free Nucleus Imaging. Anal. Chem. 91, 9259–9265.

Lu, M., Duan, Y., Song, Y., Tan, J., Zhou, L., 2018. Green preparation of versatile nitrogen-doped carbon quantum dots from watermelon juice for cell imaging, detection of Fe^{3+} ions and cysteine, and optical thermometry. J. Mol. Liq. 269, 766–774.

Lu, X., Zhao, C., Shi, H., Liao, Y., Xu, F., Du, H., Xiao, H., Zheng, J., 2021. Nutrients and bioactives in citrus fruits: Different citrus varieties, fruit parts, and growth stages. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1–24.

Lv, X., Gao, C., Han, T., Shi, H., Guo, W., 2020. Improving the quantum yields of fluorophores by inhibiting twisted intramolecular charge transfer using electron-withdrawing group-functionalized piperidine auxochromes. Chem. Commun. 56, 715–718.

M., A., John, B.K., Chacko, A.R., Mohan, C., Mathew, B., 2022. A Review on Carbon Quantum Dot Based Semiconductor Photocatalysts for the Abatement of Refractory Pollutants. ChemPhysChem 23.

Mahato, Sinha, Sharma, Koteswararao, Cho, 2019. Modern Extraction and Purification Techniques for Obtaining High Purity Food-Grade Bioactive Compounds and Value-Added Co-Products from Citrus Wastes. Foods 8, 523.

Martí, N., Saura, D., Fuentes', E., Lizama, V., García, E., Mico-Ballester, M.J., Lorente, J., 2011. Fiber from tangerine juice industry. Ind. Crops Prod. 33, 94–98.

Mattinzoli, D., Cacioppo, M., Ikehata, M., Armelloni, S., Alfieri, C.M., Castellano, G., Barilani, M., Arcudi, F., Messa, P., Prato, M., 2022. Carbon dots conjugated to SN38 for improved colorectal anticancer therapy. Mater. Today Bio 16, 100286.

Mehta, V.N., Jha, S., Basu, H., Singhal, R.K., Kailasa, S.K., 2015. One-step hydrothermal approach to fabricate carbon dots from apple juice for imaging of mycobacterium and fungal cells. Sens. Actuators B Chem. 213, 434–443.

Meierhofer, F., Dissinger, F., Weigert, F., Jungclaus, J., Müller-Caspary, K., Waldvogel, S.R., Resch-Genger, U., Voss, T., 2020. Citric Acid Based Carbon Dots with Amine Type Stabilizers: pH-Specific Luminescence and Quantum Yield Characteristics. J. Phys. Chem. C 124, 8894–8904.

Meng, W., Bai, X., Wang, B., Liu, Z., Lu, S., Yang, B., 2019. Biomass-Derived Carbon Dots and Their Applications. Energy Environ. Mater. 2, 172–192.

Mintz, K.J., Zhou, Y., Leblanc, R.M., 2019. Recent development of carbon quantum dots regarding their optical properties, photoluminescence mechanism, and core structure. Nanoscale 11, 4634–4652.

Mohamed, E.F., 2017. Nanotechnology: Future of Environmental Air Pollution Control. EMSD 6, 429.

Mohammed, L.J., Omer, K.M., 2020. Dual functional highly luminescence B, N Co-doped carbon nanodots as nanothermometer and Fe^{3+}/Fe^{2+} sensor. Sci. Rep. 10, 3028.

Monte-Filho, S.S., Andrade, S.I.E., Lima, M.B., Araujo, M.C.U., 2019. Synthesis of highly fluorescent carbon dots from lemon and onion juices for determination of riboflavin in multivitamin/mineral supplements. J. Pharm. Anal. 9, 209–216.

Myers, R.H., Montgomery, D.C., Anderson-Cook, C.M., 2016a. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments, Fourth edition. ed, Wiley series in probability and statistics. Wiley, Hoboken, New Jersey.

Politis, S., Colombo, P., Colombo, G., M. Rekkas, D., 2017. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. Drug Dev. Ind. Pharm. 43, 889–901.

Nagaraj, M., Ramalingam, S., Murugan, C., Aldawood, S., Jin, J.-O., Choi, I., Kim, M., 2022. Detection of Fe^{3+} ions in aqueous environment using fluorescent carbon quantum dots synthesized from endosperm of Borassus flabellifer. Environ. Res. 212, 113273.

Naik, K., Chaudhary, S., Ye, L., Parmar, A.S., 2022. A Strategic Review on Carbon Quantum Dots for Cancer-Diagnostics and Treatment. Front. Bioeng. Biotechnol. 10, 882100.

Nair, A., Haponiuk, J.T., Thomas, S., Gopi, S., 2020. Natural carbon-based quantum dots and their applications in drug delivery: A review. Biomed. Pharmacother. 132, 110834.

Narayan, A., Bhattacharjee, K., Naganathan, A.N., 2019. Thermally versus Chemically Denatured Protein States. Biochemistry 58, 2519–2523.

Nazri, N.A.A., Azeman, N.H., Luo, Y., A Bakar, A.A., 2021. Carbon quantum dots for optical sensor applications: A review. Opt. Laser Technol. 139, 106928.

Németh, Z., Csóka, I., Semnani Jazani, R., Sipos, B., Haspel, H., Kozma, G., Kónya, Z., Dobó, D.G., 2022. Quality by Design-Driven Zeta Potential Optimisation Study of Liposomes with Charge Imparting Membrane Additives. Pharmaceutics 14, 1798.

Nguyen, K.G., Baragau, I.-A., Gromicova, R., Nicolaev, A., Thomson, S.A.J., Rennie, A., Power, N.P., Sajjad, M.T., Kellici, S., 2022. Investigating the effect of N-doping on carbon quantum dots structure, optical properties and metal ion screening. Sci. Rep. 12, 13806.

Pal, T., Mohiyuddin, S., Packirisamy, G., 2018. Facile and Green Synthesis of Multicolor Fluorescence Carbon Dots from Curcumin: *In Vitro* and *in Vivo* Bioimaging and Other Applications. ACS Omega 3, 831–843.

Pandit, S., Behera, P., Sahoo, J., De, M., 2019. In Situ Synthesis of Amino Acid Functionalized Carbon Dots with Tunable Properties and Their Biological Applications. ACS Appl. Bio Mater. 2, 3393–3403.

Pei, S., Zhang, J., Gao, M., Wu, D., Yang, Y., Liu, R., 2015. A facile hydrothermal approach towards photoluminescent carbon dots from amino acids. J. Colloid Interface Sci. 439, 129–133.

Prasannan, A., Imae, T., 2013. One-Pot Synthesis of Fluorescent Carbon Dots from Orange Waste Peels. Ind. Eng. Chem. Res. 52, 15673–15678.

Pu, Z.-F., Wen, Q.-L., Yang, Y.-J., Cui, X.-M., Ling, J., Liu, P., Cao, Q.-E., 2020. Fluorescent carbon quantum dots synthesized using phenylalanine and citric acid for selective detection of Fe^{3+} ions. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 229, 117944.

Qi, H., Teng, M., Liu, M., Liu, S., Li, J., Yu, H., Teng, C., Huang, Z., Liu, H., Shao, Q., Umar, A., Ding, T., Gao, Q., Guo, Z., 2019. Biomass-derived nitrogen-doped carbon quantum dots: highly selective fluorescent probe for detecting Fe^{3+} ions and tetracyclines. J. Colloid Interface Sci. 539, 332–341.

Qiang, R., Yang, S., Hou, K., Wang, J., 2019. Synthesis of carbon quantum dots with green luminescence from potato starch. New J. Chem. 43, 10826–10833.

Qin, T., Wang, J., Liu, Y., Guo, S., 2022. Carbon Quantum Dots Based Chemosensor Array for Monitoring Multiple Metal Ions. Molecules 27, 3843.

Rafiq, S., Kaul, R., Sofi, S.A., Bashir, N., Nazir, F., Ahmad Nayik, G., 2018. Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. J. Saudi Soc. Agric. Sci. 17, 351–358.

Ray, S.C., Saha, A., Jana, N.R., Sarkar, R., 2009. Fluorescent Carbon Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Bioimaging Application. J. Phys. Chem. C 113, 18546–18551.

Ren, G., Tang, M., Chai, F., Wu, H., 2018. One-Pot Synthesis of Highly Fluorescent Carbon Dots from Spinach and Multipurpose Applications. Eur. J. Inorg. Chem. 2018, 153–158.

Ren, M., Rigele, A., Shun, N., Natsagdorj, N., 2022. A quantum chemical study of the interaction of carboxylic acids with DMSO. Mong. J. Chem. 23.

Riswanto, F.D.O., Rohman, A., Pramono, S., Martono, S., 2019. Application of response surface methodology as mathematical and statistical tools in natural product research. J. App. Pharm. Sci. 9, 125–133.

Rodrigo, M.-J., Marcos, J.F., Zacarías, L., 2004. Biochemical and Molecular Analysis of Carotenoid Biosynthesis in Flavedo of Orange (*Citrus sinensis* L.) during Fruit Development and Maturation. J. Agric. Food Chem. 52, 6724–6731.

Ross, S., Wu, R.-S., Wei, S.-C., Ross, G.M., Chang, H.-T., 2020. The analytical and biomedical applications of carbon dots and their future theranostic potential: A review. J. Food Drug Anal. 28, 678–696.

Ruiz-Ruiz, J.C., Matus-Basto, A.J., Acereto-Escoffié, P., Segura-Campos, M.R., 2017. Antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolic compounds isolated from *Melipona beecheii* honey. Food Agric. Immunol. 28, 1424–1437.

Sachdev, A., Gopinath, P., 2015. Green synthesis of multifunctional carbon dots from coriander leaves and their potential application as antioxidants, sensors and bioimaging agents. Analyst 140, 4260–4269.

Sadjadi, S., 2021. The utility of carbon dots for photocatalysis, in: Emerging Carbon Materials for Catalysis. Elsevier, str. 123–160.

Sahu, N.K., Andhare, A., 2018. Design of Experiments Applied to Industrial Process, in: Silva, V. (Ed.), Statistical Approaches With Emphasis on Design of Experiments Applied to Chemical Processes. InTech.

Saini, R.K., Ranjit, A., Sharma, K., Prasad, P., Shang, X., Gowda, K.G.M., Keum, Y.-S., 2022. Bioactive Compounds of Citrus Fruits: A Review of Composition and Health Benefits of Carotenoids, Flavonoids, Limonoids, and Terpenes. Antioxidants 11, 239.

Sciortino, A., Cannizzo, A., Messina, F., 2018. Carbon Nanodots: A Review—From the Current Understanding of the Fundamental Photophysics to the Full Control of the Optical Response. C 4, 67.

Sharma, V., Singh, S.K., Mobin, S.M., 2019. Bioinspired carbon dots: from rose petals to tunable emissive nanodots. Nanoscale Adv. 1, 1290–1296.

Shen, J., Shang, S., Chen, X., Wang, D., Cai, Y., 2017. Facile synthesis of fluorescence carbon dots from sweet potato for Fe^{3+} sensing and cell imaging. Mater. Sci. Eng. C 76, 856–864.

Shi, B., Su, Y., Zhang, L., Huang, M., Liu, R., Zhao, S., 2016. Nitrogen and Phosphorus Co-Doped Carbon Nanodots as a Novel Fluorescent Probe for Highly Sensitive Detection of Fe^{3+} in Human Serum and Living Cells. ACS Appl. Mater. Interfaces 8, 10717–10725.

Sordon, S., Popłoński, J., Milczarek, M., Stachowicz, M., Tronina, T., Kucharska, A.Z., Wietrzyk, J., Huszcza, E., 2019. Structure–Antioxidant–Antiproliferative Activity Relationships of Natural C7 and C7–C8 Hydroxylated Flavones and Flavanones. Antioxidants 8, 210.

Stachowska, J.D., Murphy, A., Mellor, C., Fernandes, D., Gibbons, E.N., Krysmann, M.J., Kelarakis, A., Burgaz, E., Moore, J., Yeates, S.G., 2021. A rich gallery of carbon dots based photoluminescent suspensions and powders derived by citric acid/urea. Sci. Rep. 11, 10554.

Su, R., Wang, D., Liu, M., Yan, J., Wang, J.-X., Zhan, Q., Pu, Y., Foster, N.R., Chen, J.-F., 2018a. Subgram-Scale Synthesis of Biomass Waste-Derived Fluorescent Carbon Dots in Subcritical Water for Bioimaging, Sensing, and Solid-State Patterning. ACS Omega 3, 13211–13218.

Su, A., Wang, D., Shu, X., Zhong, Q., Chen, Y., Liu, J., Wang, Y., 2018b. Synthesis of Fluorescent Carbon Quantum Dots from Dried Lemon Peel for Determination of Carmine in Drinks. Chem. Res. Chin. Univ. 34, 164–168.

Sumanth Kumar, D., Jai Kumar, B., Mahesh, H.M., 2018. Quantum Nanostructures (QDs): An Overview, in: Synthesis of Inorganic Nanomaterials. Elsevier, str. 59–88.

Sun, X., Liu, Y., Niu, N., Chen, L., 2019. Synthesis of molecularly imprinted fluorescent probe based on biomass-derived carbon quantum dots for detection of mesotrione. Anal. Bioanal. Chem. 411, 5519–5530.

Sun, Y.-P., Zhou, B., Lin, Y., Wang, W., Fernando, K.A.S., Pathak, P., Meziani, M.J., Harruff, B.A., Wang, X., Wang, H., Luo, P.G., Yang, H., Kose, M.E., Chen, B., Veca, L.M., Xie, S.-Y., 2006. Quantum-Sized Carbon Dots for Bright and Colorful Photoluminescence. J. Am. Chem. Soc. 128, 7756–7757.

Šafranko, S., Goman, D., Stanković, A., Medvidović-Kosanović, M., Moslavac, T., Jerković, I., Jokić, S., 2021a. An Overview of the Recent Developments in Carbon Quantum Dots—Promising Nanomaterials for Metal Ion Detection and (Bio)Molecule Sensing. Chemosensors 9, 138.

Šafranko, S., Stanković, A., Hajra, S., Kim, H.-J., Strelec, I., Dutour-Sikirić, M., Weber, I., Bosnar, M.H., Grbčić, P., Pavelić, S.K., Széchenyi, A., Mishra, Y.K., Jerković, I., Jokić, S., 2021b. Preparation of Multifunctional N-Doped Carbon Quantum Dots from Citrus clementina Peel: Investigating Targeted Pharmacological Activities and the Potential Application for Fe^{3+} Sensing. Pharmaceuticals 14, 857.

Šafranko, S., Ćorković, I., Jerković, I., Jakovljević, M., Aladić, K., Šubarić, D., Jokić, S., 2021c. Green Extraction Techniques for Obtaining Bioactive Compounds from Mandarin Peel (Citrus unshiu var. Kuno): Phytochemical Analysis and Process Optimization. Foods 10, 1043.

Tadesse, A., Hagos, M., RamaDevi, D., Basavaiah, K., Belachew, N., 2020. Fluorescent-Nitrogen-Doped Carbon Quantum Dots Derived from Citrus Lemon Juice: Green Synthesis, Mercury(II) Ion Sensing, and Live Cell Imaging. ACS Omega 5, 3889–3898.

Tuerhong, M., Xu, Y., Yin, X.-B., 2017. Review on Carbon Dots and Their Applications. Chinese J. Anal. Chem. 45, 139–150.

Tyagi, A., Tripathi, K.M., Singh, N., Choudhary, S., Gupta, R.K., 2016. Green synthesis of carbon quantum dots from lemon peel waste: applications in sensing and photocatalysis. RSC Adv. 6, 72423–72432.

Vahabi, S., Nazemi Salman, B., Javanmard, A., 2013. Atomic force microscopy application in biological research: a review study. Iran J. Med. Sci. 38, 76–83.

Vandarkuzhali, S.A.A., Natarajan, S., Jeyabalan, S., Sivaraman, G., Singaravadivel, S., Muthusubramanian, S., Viswanathan, B., 2018. Pineapple Peel-Derived Carbon Dots: Applications as Sensor, Molecular Keypad Lock, and Memory Device. ACS Omega 3, 12584–12592.

Venkataramanan, N.S., Suvitha, A., Kawazoe, Y., 2018. Density functional theory study on the dihydrogen bond cooperativity in the growth behavior of dimethyl sulfoxide clusters. J. Mol. Liq. 249, 454–462.

Venkatesan, S., Mariadoss, A.J., Arunkumar, K., Muthupandian, A., 2019. Fuel waste to fluorescent carbon dots and its multifarious applications. Sens. Actuators B Chem. 282, 972–983.

Vinci, J.C., Ferrer, I.M., Guterry, N.W., Colón, V.M., Destino, J.F., Bright, F.V., Colón, L.A., 2015. Spectroscopic Characteristics of Carbon Dots (C-Dots) Derived from Carbon Fibers and Conversion to Sulfur-Bridged C-Dots Nanosheets. Appl Spectrosc 69, 1082–1090.

Vogel, R., Pal, A.K., Jambhrunkar, S., Patel, P., Thakur, S.S., Reátegui, E., Parekh, H.S., Saá, P., Stassinopoulos, A., Broom, M.F., 2017. High-Resolution Single Particle Zeta Potential Characterisation of Biological Nanoparticles using Tunable Resistive Pulse Sensing. Sci. Rep. 7, 17479.

Wang, C., Shi, H., Yang, M., Yan, Y., Liu, E., Ji, Z., Fan, J., 2020a. Facile synthesis of novel carbon quantum dots from biomass waste for highly sensitive detection of iron ions. Mater. Res. Bull. 124, 110730.

Wang, J., Wang, Jianying, Xiao, W., Geng, Z., Tan, D., Wei, L., Li, J., Xue, L., Wang, X., Zhu, J., 2020b. Lignin-derived red-emitting carbon dots for colorimetric and sensitive fluorometric detection of water in organic solvents. Anal. Methods 12, 3218–3224.

Wang, R., Lu, K.-Q., Tang, Z.-R., Xu, Y.-J., 2017a. Recent progress in carbon quantum dots: synthesis, properties and applications in photocatalysis. J. Mater. Chem. A 5, 3717–3734.

Wang, X., Feng, Y., Dong, P., Huang, J., 2019. A Mini Review on Carbon Quantum Dots: Preparation, Properties, and Electrocatalytic Application. Front. Chem. 7, 671.

Wang, Y., Hu, A., 2014. Carbon quantum dots: synthesis, properties and applications. J. Mater. Chem. C 2, 6921.

Wang, Z., Xu, C., Lu, Y., Chen, X., Yuan, H., Wei, G., Ye, G., Chen, J., 2017b. Fluorescence sensor array based on amino acid derived carbon dots for pattern-based detection of toxic metal ions. Sens. Actuators B Chem. 241, 1324–1330.

Wedamulla, N.E., Fan, M., Choi, Y.-J., Kim, E.-K., 2022. Citrus peel as a renewable bioresource: Transforming waste to food additives. J. Funct. Foods 95, 105163.

Wei, X., Mei, S., Yang, D., Zhang, G., Xie, F., Zhang, W., Guo, R., 2019. Surface States Induced Photoluminescence Enhancement of Nitrogen-Doped Carbon Dots Via Post-Treatments. Nanoscale Res. Lett. 14, 172.

Wu, P., Li, W., Wu, Q., Liu, Y., Liu, S., 2017a. Hydrothermal synthesis of nitrogen-doped carbon quantum dots from microcrystalline cellulose for the detection of Fe^{3+} ions in an acidic environment. RSC Adv. 7, 44144–44153.

Wu, H., Jiang, J., Gu, X., Tong, C., 2017b. Nitrogen and sulfur co-doped carbon quantum dots for highly selective and sensitive fluorescent detection of Fe(III) ions and L-cysteine. Microchim. Acta 184, 2291–2298.

Wu, J., Chen, G., Jia, Y., Ji, C., Wang, Y., Zhou, Y., Leblanc, R.M., Peng, Z., 2022. Carbon dot composites for bioapplications: a review. J. Mater. Chem. B 10, 843–869.

Wu, Q., Li, W., Wu, P., Li, J., Liu, S., Jin, C., Zhan, X., 2015. Effect of reaction temperature on properties of carbon nanodots and their visible-light photocatalytic degradation of tetracyline. RSC Adv. 5, 75711–75721.

Xu, X., Ray, R., Gu, Y., Ploehn, H.J., Gearheart, L., Raker, K., Scrivens, W.A., 2004. Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments. J. Am. Chem. Soc. 126, 12736–12737.

Xue, Y., Liu, C., Andrews, G., Wang, J., Ge, Y., 2022. Recent advances in carbon quantum dots for virus detection, as well as inhibition and treatment of viral infection. Nano Converg. 9, 15.

Yan, F., Jiang, Y., Sun, X., Bai, Z., Zhang, Y., Zhou, X., 2018. Surface modification and chemical functionalization of carbon dots: a review. Microchim. Acta 185, 424.

Yan, F., Sun, Z., Zhang, H., Sun, X., Jiang, Y., Bai, Z., 2019. The fluorescence mechanism of carbon dots, and methods for tuning their emission color: a review. Microchim. Acta 186, 583.

Yan, Q.-L., Gozin, M., Zhao, F.-Q., Cohen, A., Pang, S.-P., 2016. Highly energetic compositions based on functionalized carbon nanomaterials. Nanoscale 8, 4799–4851.

Yang, G., Wan, X., Su, Y., Zeng, X., Tang, J., 2016. Acidophilic S-doped carbon quantum dots derived from cellulose fibers and their fluorescence sensing performance for metal ions in an extremely strong acid environment. J. Mater. Chem. A 4, 12841–12849.

Yoo, D., Park, Y., Cheon, B., Park, M.-H., 2019. Carbon Dots as an Effective Fluorescent Sensing Platform for Metal Ion Detection. Nanoscale Res. Lett. 14, 272.

Yu, J., Xu, C., Tian, Z., Lin, Y., Shi, Z., 2016. Facilely synthesized N-doped carbon quantum dots with high fluorescent yield for sensing Fe^{3+}. New J. Chem. 40, 2083–2088.

Yu, P., Wen, X., Toh, Y.-R., Tang, J., 2012. Temperature-Dependent Fluorescence in Carbon Dots. J. Phys. Chem. C 116, 25552–25557.

Yuan, F., Wang, Z., Li, X., Li, Y., Tan, Z., Fan, L., Yang, S., 2017. Bright Multicolor Bandgap Fluorescent Carbon Quantum Dots for Electroluminescent Light-Emitting Diodes. Adv. Mater. 29, 1604436.

Zhang, J., Xu, W., Han, H., Zhang, L., Wang, T., 2019. Dietary Leucine Supplementation Restores Serum Glucose Levels, and Modifying Hepatic Gene Expression Related to the Insulin Signal Pathway in IUGR Piglets. Animals 9, 1138.

Zhang, J., Yu, S.-H., 2016. Carbon dots: large-scale synthesis, sensing and bioimaging. Mater. Today 19, 382–393.

Zhang, Q., Liang, J., Zhao, L., Wang, Y., Zheng, Y., Wu, Y., Jiang, L., 2020. Synthesis of Novel Fluorescent Carbon Quantum Dots From *Rosa roxburghii* for Rapid and Highly Selective Detection of o-nitrophenol and Cellular Imaging. Front. Chem. 8, 665.

Zhang, T., Zhu, J., Zhai, Y., Wang, He, Bai, X., Dong, B., Wang, Haiyu, Song, H., 2017. A novel mechanism for red emission carbon dots: hydrogen bond dominated molecular states emission. Nanoscale 9, 13042–13051.

Zhang, Y., He, Y.H., Cui, P.P., Feng, X.T., Chen, L., Yang, Y.Z., Liu, X.G., 2015. Water-soluble, nitrogen-doped fluorescent carbon dots for highly sensitive and selective detection of Hg^{2+} in aqueous solution. RSC Adv. 5, 40393–40401.

Zhang, Y., Wang, Y., Feng, X., Zhang, F., Yang, Y., Liu, X., 2016. Effect of reaction temperature on structure and fluorescence properties of nitrogen-doped carbon dots. Appl. Surf. Sci. 387, 1236–1246.

Zhang, X., Li, S., Ma, H., Wang, H., Zhang, R., Zhang, X.-D., 2022. Activatable NIR-II organic fluorescent probes for bioimaging. Theranostics 12, 3345–3371.

Zhao, X., Li, J., Liu, D., Yang, M., Wang, W., Zhu, S., Yang, B., 2020. Self-Enhanced Carbonized Polymer Dots for Selective Visualization of Lysosomes and Real-Time Apoptosis Monitoring. iScience 23, 100982.

Zhao, P., Zhu, L., 2018. Dispersibility of carbon dots in aqueous and/or organic solvents. Chem. Commun. 54, 5401–5406.

Zhou, H., Ren, Y., Li, Zheng, He, W., Li, Zhengxin, 2022. Selective Detection of Fe^{3+} by Nitrogen–Sulfur-Doped Carbon Dots Using Thiourea and Citric Acid. Coatings 12, 1042.

Zhou, J., Ge, M., Han, Y., Ni, J., Huang, X., Han, S., Peng, Z., Li, Y., Li, S., 2020. Preparation of Biomass-Based Carbon Dots with Aggregation Luminescence Enhancement from Hydrogenated Rosin for Biological Imaging and Detection of Fe^{3+}. ACS Omega 5, 11842–11848.

Zhu, J., Chu, H., Wang, T., Wang, C., Wei, Y., 2020. Fluorescent probe based nitrogen doped carbon quantum dots with solid-state fluorescence for the detection of Hg^{2+} and Fe^{3+} in aqueous solution. Microchem. J. 158, 105142.

Zhu, P., Wang, S., Zhang, Y., Li, Y., Liu, Y., Li, W., Wang, Y., Yan, X., Luo, D., 2022. Carbon Dots in Biomedicine: A Review. ACS Appl. Bio Mater. 5, 2031–2045.

Zulfajri, M., Gedda, G., Chang, C.-J., Chang, Y.-P., Huang, G.G., 2019. Cranberry Beans Derived Carbon Dots as a Potential Fluorescence Sensor for Selective Detection of Fe^{3+} Ions in Aqueous Solution. ACS Omega 4, 15382–15392.