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

# Dissertação de Mestrado

# Pontos quânticos de carbono de *Pilosocereus gounellei* para determinação de taninos em chás empregando um analisador flow-batch com detecção fluorimétrica

**Kelly Danubia da Silva**

João Pessoa – PB – Brasil
Março de 2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA**
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

# Dissertação de Mestrado

## Pontos quânticos de carbono de *Pilosocereus gounellei* para determinação de taninos em chás empregando um analisador flow-batch com detecção fluorimétrica

**Kelly Danubia da Silva***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração em Química Analítica.

Orientador: **Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima**

Coorientador: **Dr. Stéfani Iury Evangelista de Andrade**

*** Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**

**João Pessoa – PB - Brasil**

**Março de 2018**

**Catalogação na publicação**
**Seção de Catalogação e Classificação**

S586p Silva, Kelly Danubia da.
Pontos quânticos de carbono de Pilosocereus gounellei para determinação de taninos em chás empregando um analisador flow-batch com detecção fluorimétrica / Kelly Danubia da Silva. - João Pessoa, 2018.
89 f. : il.

Orientação: Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima.
Coorientação: Stéfani Iury Evangelista de Andrade.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Química analítica. 2. Pontos quânticos de carbono. 3. Xiquexique - bioprecursor. 4. Taninos. 5. Flow - batch. I. Lima, Ricardo Alexandre Cavalcanti de. II. Andrade, Stéfani Iury Evangelista de. III. Título.

UFPB/BC

**Pontos quânticos de carbono de Pilosocereus gounellei para determinação de taninos em chás empregando um analisador flow-batch com detecção fluorimétrica**

Dissertação de Mestrado apresentada pela aluna Kelly Danúbia da Silva e aprovada pela banca examinadora em 23 de março de 2018.

Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima
Orientador/Presidente

Prof. Dr. Stefani Iury Evangelista de Andrade
2°. Orientador

Prof. Dr. Marcelo Batista de Lima
Examinador

Profa. Dra. Kátia Messias Bichinho
Examinadora

À Maria Jacintha da Conceição, minha definição mais pura do que é o amor,
eu dedico.

**Agradecimentos**

- A Deus, pelo dom da vida e por todo cuidado e proteção.
- Aos meus pais Neusa Maria e Josenilton José, por respeitarem e apoiarem minhas escolhas e que mesmo distantes se fazem presentes e que a cada palavra de incentivo minha fé é renovada.
- Ao meu irmão Clebson Yuri, por ser o amor da minha vida a quem eu sirvo de exemplo e sempre vou tentar fazer o meu melhor.
- A minha família, pelas palavras de incentivo e apoio constantes. Nesta incluo as pessoas que me deram um novo lar Kátia e Yuri.
- Ao Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima e ao Dr. Stéfani Iury Evangelista de Andrade pela orientação, por todo conhecimento transmitido, pela paciência, prontidão, conselhos e momentos de descontração.
- Aos membros da banca de Edvan Cirino da Silva, Kátia Messias Bichinho e Marcelo Batista de Lima.
- Aos melhores amigos possíveis, Fernanda, Carlos, Natália, Lulian, Caio, Paula, Miguel, Lígia, Shenya e Iranildo por ser ombro amigo e ouvido atento.
- Aos amigos, Matheus, Willy, Arquimedes, Carlos, Daniella, Laila, Mayara, Iara, Jonathan, Julys, Pedro, Flaviano, Andreia, Monte, Renato, Lucas, Rosinaldo, Nayara, Jainny, Ana Rosa, Wallys, Thiago, Juliana e João por tornarem essa caminhada menos árdua.
- A todos os demais membros do LAQA pela convivência e bom humor sempre presente.
- Ao LACOM e ao LEQA pela disponibilização de equipamentos, os quais contribuíram para realização deste trabalho.
- A CAPES, pela bolsa concedida

“Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos. Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser. Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto. Aprende que não importa aonde você chegou, mas para onde você está indo... Mas, se você não sabe para onde está indo, qualquer caminho serve.”

(William Shakespeare)

“Sigo apaixonada pela mulher que batalhei pra ser.”

(Ryane Leão)

**Resumo**

Título: **Pontos quânticos de carbono de *Pilosocereus gounellei* para determinação de taninos em chás empregando um analisador flow-batch com detecção fluorimética**

O presente trabalho apresenta um novo método automático em fluxo-batelada para determinação fluorimétrica de taninos em chás empregando pontos quânticos de carbono (PQCs). Os PQCs foram sintetizados utilizando uma estratégia simples e fácil pelo método de carbonização hidrotérmica a baixa temperatura e foi empregado o xiquexique (Pilosocereus gounellei) e a etanolamina como precursor e funcionalizante, respectivamente. As propriedades estruturais e ópticas dos PQCs foram investigadas pelas técnicas de difração de raio X, UV–Vis, FTIR e espectroscopia de fluorescência molecular. Os PQCs sintetizados obtiveram um bom rendimento quântico de 13,58% e excelente solubilidade em água. Foi verificado que a fluorescência dos PQCs pode ser significativamente reduzida na presença de taninos em amostras de chá verde e preto, em tampão fosfato pH 8. O mecanismo de extinção da fluorescência pode ser atribuído às interações entre os grupos presentes na superfície dos PQCs com os taninos. Para esta análise, foi utilizando o sistema automático flow-batch, com uma câmara de mistura e reação, na qual era feita a excitação, utilizado um LED-ultravioleta, $\lambda_{max}$=376nm e a aquisição dos espectros de fluorescência on-line através de um espectrofluorímetro portátil como detector. Os resultados obtidos com o método proposto foram comparados com o de referência para determinação de taninos, e os limites de detecção e os desvios padrão relativo foram estimados como sendo 0,102 mg $L^{-1}$ e < 2,91 % (n = 3), respectivamente. A intensidade de fluorescência de taninos-PQCs apresentou uma resposta linear com a concentração de tanino na faixa de 2,0 a 30 mg.$L^{-1}$com $r^2$=0,996, além de uma frequência analítica bastante satisfatória (18,9 $h^{-1}$).

*Palavras chaves: Pontos quânticos de carbono, xiquexique; taninos, flow-batch.*

**Abstract**

Title: **Application of *Pilosocereus gounellei* carbon dots in the determination of tannins in teas employing a flow-batch analyzer with fluorimetric detection.**

This work a novel new automatic flow-batch method for fluorimetric determination of tannins in teas employing carbon dots (CDs). The CDs were synthesized using a simple and easy strategy by low temperature carbonization method xiquexique (*Pilosocereus gounellei**)*** and ethanolamine were employed as precursor and functionalizer, respectively. The structural and optical properties of the CDs were investigated by the X-ray diffraction, UV-Vis, FTIR, and molecular fluorescence spectroscopy techniques. The synthesized CDs obtained a good quantum yield of 13.58% and excellent solubility in water. It was verified that the fluorescence of the CDs can be significantly reduced in the presence of tannins in green tea and black samples, in pH 8 phosphate plug. The fluorescence quenching mechanism can be attributed to the interactions between the groups present on the surface of the CDs with the tannins. For this analysis it was used the flow-batch system, with a mixing and reaction chamber, in which the excitation was made, using an ultraviolet-LED, $\lambda_{max}$=376nm and the acquisition of fluorescence spectra on-line through a portable spectrofluorimeter as detector. The results obtained with the proposed method were compared with the reference method for tannin determination, and the detection limits and relative model deviations were estimated as being 0,102 mg $L^{-1}$ e < 2.91% (n = 3) , respectively. The fluorescence intensity of Tannins-CDs showed a linear response with tannin concentration in the range of 2.0 to 30 mg.$L^{-1}$ with $r^2$ = 0.996, and a very satisfactory analytical frequency (18.9 $h^{-1}$).

***Key words:*** *Carbon dots, Xiquexique; Tannins, Flow-batch.*

**Lista de Figuras**


| | | |
|---|---|---|
| **Figura 2.1** | Materiais de carbono: **(a)** grafite, (**b)** diamante, **(c)** fulereno C60, **(d)** nanotubos de carbono de parede única e **(e)** pontos quânticos de carbono (adaptado de Dai et al., 2012). | 16 |
| **Figura 2.2** | Fotografia das soluções de PQCs sob radiação **(a)** visível **(b)** ultravioleta (365 nm). **(c)** intervalo obtido a partir de fragmentos de grafeno com um diâmetro de 14-22 A, o que concorda bem com a emissão visível dos PQCs com diâmetros de menor que 3 nm | 19 |
| **Figura 2.3** | Diagrama esquemático da preparação dos PQCs via abordagens “top-down” e “bottom-up”. (Adaptado de.Sanchez et. al 2010). | 20 |
| **Figura 2.4** | Diagrama do processo de síntese e aplicação dos PEI-PQCs | 23 |
| **Figura 2.5** | Esquema da síntese dos PQCs com uso de bioprecursores (Adaptado de.Barati et al 2015). | 26 |
| **Figura 2.6** | Fotografia das cactáceas encontradas no sertão nordestino: (a) xiquexique (*Pilosocereus gounellei*), (b) palma (*Opuntia ficus indica*) e o (c) mandacaru (*Cereus jamacaru*) | 28 |
| **Figura 2.7** | Principais catequinas em folhas de chá (adapatado de Luczaj et al.2005). | 30 |
| **Figura 2.8** | Esquema simplificado de um sistema de análise em fluxo-batelada (*flow-batch*). (a) câmara de mistura, no detalhe uma barra magnética; (b) válvulas solenóides; (c) agitador magnético; (d) Bomba peristáltica; (e) acionador/controlador de válvulas; (f) exemplo de detector, espectrofotômetro e (g) microcomputador, para administração geral do sistema. | 33 |
| **Figura 3.1** | Esquema ilustrativo da síntese hidrotérmica dos PQCs a partir do suco das cactáceas xiquexique,mandacaru e palma onde os PQCs estão sob a (1) luz visível e (2) sob luz ultravioleta. | 39 |
| **Figura 3.2** | **(a.)** Fotografia do sistema automático em fluxo-batelada utilizado**.(b)** Detalhes do sistema vis**(c)** bomba peristáltica, **(d)** acionador e interface, **(e)** válvulas solenoides, e **(f)** notebook. | 41 |
| **Figura 3.3** | Circuito eletrônico do acionador de válvulas solenoides, agitador magnético e de alimentação do LED-UV. | 43 |

| | | |
|---|---|---|
| **Figura 3.4** | Detalhes do sistema de detecção do flow-batch, (1) espectrofluorímetro portátil, (2) câmara de mistura, (3) LED-UV e (4) agitador magnético. | 44 |
| **Figura 3.5** | Espectro de emissão do LED ultravioleta utilizado para montagem do fluorímetro com emissão máxima de 370nm | 45 |
| **Figura 3.6** | **.**(a) Interface de controle do FBA e (b) interface do programa SpectraSuite da Ocean Optics utilizado para aquisição e captura do espectro. | 46 |
| **Figura 3.7** | Interface do programa para realizar o estudo de calibração das válvulas solenoides. | 47 |
| **Figura 3.8** | Diagrama esquemático do sistema automático em fluxo-batelada proposto. BP: canais da bomba peristáltica, V: válvulas solenoides, CM: câmara de mistura, J: Janelas de quartzo; AM: agitador magnético, BM: barra magnética. | 48 |
| **Figura 4.1** | Teste de pH realizado nas cactáceas (a) xiquexique,(b) palma e (c) mandacaru na faixa de pH tampão fosfato entre 4,5 e 8,0. | 56 |
| **Figura 4.2** | Relação F0-F/F0 em função da concentração de taninos com o AM-PQCs para os bioprecursores xiquexique, mandacaru e palma. | 57 |
| **Figura 4.3** | Imagens dos PQCs, sintetizados com diferentes funcionalizantes (hidróxido de amônio, polietilenoglicol, etanolamina), sob a (a) luz visivél 1 AM–PQCs, 2 PEG-PQCs e 3 ET-PQCs e sob a (b) ultravioleta 4 AM–PQCs, 5 PEG-PQCs e 6 ET-PQCs (380 nm). | 58 |
| **Figura 4.4** | Espectros de absorção molecular dos PQCs com diferentes funcionalizantes. | 59 |
| **Figura 4.5** | Espectros de fluorescência dos AM–PQCs, PEG-PQCs e ET-PQCs | 60 |
| **Figura 4.6** | Espectros de emissão de fluorescência dos PQCs nos comprimentos de excitação de 320nm a 420 nm. | 61 |
| **Figura 4.7** | Espectros de excitação e de emissão dos ET-PQCs | 62 |
| **Figura 4.8** | Difratograma do ET-PQC | 63 |
| **Figura 4.9** | Espectro FTIR do ET-PQC. | 64 |
| **Figura 4.10** | Influência do pH na intensidade de fluorescência dos PQCs | 65 |
| **Figura 4.11** | Espectros de emissão de fluorescência dos PQCs com | 66 |

supressão da fluorescência gerada pela presença dos taninos.

**Figura 4.12** Relação (F0-F)/F0 em função da concentração de taninos. 67

**Figura 4.13** Gráfico dos resíduos em relação às concentrações de taninos da curva analítica. 68

**Lista de Tabelas**


| | | |
|---|---|---|
| **Tabela 2.1** | Descrição de características básicas da fluorescência dos PQCs exploradas em aplicações analíticas(Adaptado de Andrade, 2016). | 19 |
| **Tabela 2.2** | Características dos diferentes métodos de sínteses de PQCs. | 21 |
| **Tabela 2.3** | Valores obtidos para a composição físico-química do fruto do xiquexique comparado a outros frutos. | 28 |
| **Tabela 3.1** | Etapas do procedimento automático para análise do padrão/amostras. | 49 |
| **Tabela 3.2** | Figuras de mérito para a precisão de métodos analíticos (adaptado de Skoog, 2010). | 53 |
| **Tabela 3.3** | Equações para análise de variância (ANOVA) (adaptado de Barros Neto et.al, 2001). | 53 |
| **Tabela 4.1** | Resumo das características de absorção dos PQCs: ET-PQCs, AM-PQCs e PEG-PQCs | 59 |
| **Tabela 4.2** | Vazões médias dos canais individuais das soluções aquosas | 65 |
| **Tabela 4.3** | Validação do modelo pela ANOVA | 69 |
| **Tabela 4.4** | Coeficientes de regressão e intervalos de confiança para os valores populacionais ($\beta_0$ e $\beta_1$) do modelo linear obtido para o método proposto. | 70 |
| **Tabela 4.5** | Características de desempenho para o método proposto. | 70 |
| **Tabela 4.6** | Resultados da determinação de taninos em amostras de chás | 71 |
| **Tabela 4.7** | Teste de recuperação para taninos nas amostras de chás (n = 3). | 72 |

**Sumário**

Capítulo 1 Introdução ..... 11
1.1 Caracterização da Problemática ..... 12
1.2 Objetivos ..... 14
1.2.1 Geral ..... 14
1.2.2 Específicos ..... 14
Capitulo 2 Fundamentação teórica ..... 15
2.1 Pontos quânticos de carbono ..... 16
2.1.1 Propriedades ópticas dos PQCs ..... 17
2.2 Tipos de sínteses dos PQCs ..... 20
2.2.1 Síntese por tratamento hidrotérmico ..... 22
2.2.2 Funcionalização da superfície dos PQCs ..... 24
2.3 Bioprecursores ..... 25
2.3.1 Cactáceas nordestinas ..... 27
2.4 Técnicas de caracterização dos PQCs ..... 28
2.5 Chás ..... 28
2.6 Taninos ..... 30
2.6.1 Aplicação de PQCs na determinação de taninos ..... 31
2.7 Sistemas automáticos flow-batch ..... 31
2.7.1 Sistema flow-batch aplicado à determinação de taninos ..... 33
Capítulo 3 Experimental ..... 35
3.1 Síntese e caracterização dos pontos quânticos de carbono ..... 36
3.1.1Amostras ..... 36
3.1.2. Reagentes e soluções ..... 36
3.1.3 Equipamento e material ..... 37
3.2 Bioprecursores de carbono ..... 38
3.2.1 Agentes funcionalizantes ..... 38
3.2.3 Procedimento de síntese, funcionalização e purificação dos PQCs ..... 39
3.3 Rendimento Quântico ..... 40
3.4. Determinação de taninos em chás ..... 40
3.4.1. Método de referência ..... 40
3.5 Desenvolvimento do sistema flow-batch ..... 41

3.5.1. Desenvolvimento do software de controle ..... 45
3.5.2 Precisão das válvulas solenoides ..... 47
3.6 Procedimento automático analítico ..... 48
3.7 Avaliação do desempenho analítico ..... 49
3.7.1 Linearidade ..... 50
3.7.2 Sensibilidade ..... 50
3.7.3 Precisão ..... 50
3.7.4 Exatidão ..... 51
3.7.5 Teste t emparelhado ..... 51
3.7.6 Limite de detecção e quantificação ..... 52
3.7.7 Análise de variância ..... 53
Capítulo 4 Resultados e discussão ..... 55
4.1 Síntese e caracterização dos pontos quânticos de carbono ..... 56
4.1.1 Otimização da síntese dos PQCs ..... 56
4.1.2 Influência do funcionalizante e determinação do rendimento quântico ..... 57
4.1.3 Caracterização espectroscópica ..... 60
4.1.4 Caracterização estrutural ..... 62
4.1.5 Influência do pH ..... 64
4.2 Precisão das válvulas solenoides ..... 65
4.3 Obtenção de curva analítica ..... 66
4.4 Validação da curva analítica ..... 67
4.5 Análise das amostras ..... 70
4.6 Teste de recuperação ..... 71
Capítulo 5 Conclusões ..... 73
Referências Bibliográficas ..... 75

# Capítulo 1

# Introdução

# 1.Introdução

## 1.1 Caracterização da Problemática

Os pontos quânticos de carbono (PQCs) descobertos em 2004, durante a separação e purificação de nanotubos de carbono de parede simples se apresentam como uma alternativa promissora no desenvolvimento de métodos analíticos para determinação dos mais diversos compostos (Liu et. al., 2014). Essas nanopartículas proporcionam baixa citoxicidade, excelente solubilidade em água, fácil funcionalização orgânica, alta resistência à fotodegradação e biocompatibilidade (Xu et al., 2004).

A estratégia de síntese consiste de um precursor e funcionalizante que possibilitam o ajuste das propriedades físicas e químicas das nanopartículas resultantes, tais como o tamanho, a cristalinidade, o teor de oxigênio, características de fluorescência, estabilidade coloidal e a compatibilidade com um solvente em particular, polar e apolar (Hola et al., 2014). Dessa forma, vários estudos têm sido focados na utilização do tratamento de carbonização hidrotérmica para preparação de PQCs a partir de bioprecursores, devido sua simplicidade, versatilidade e baixo custo (Barati et al., 2015) .

Assim, torna-se viável o emprego dos bioprecursores xiquexique, palma e mandacaru visto que essas cactáceas possuem disponibilidade e fácil acesso no sertão nordestino além de ter características físico-químicas concordantes com a de bioprecursores já utilizados para sínteses de PQCs. Os PQCs têm aplicação vasta em várias áreas da ciência, dentre elas a química analítica, onde já foram empregados na determinação de metais e substâncias presentes em diversas matrizes de alimentos e pesticidas.

O taninos são compostos fenólicos cujo estrutura química apresenta hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros, que os confere propriedades antioxidantes. (Angelo, et al. 2007). Diante disso, a determinação de taninos presentes em bebidas, como vinho, cerveja, café, chá preto e chá branco torna-se exequível (Hosu et al 2014; Ahmed et al, 2015)

Na determinação de taninos, o método comumente empregado é o espectrofotométrico Folin-Ciolcateau atualmente aceito por órgãos internacionais

como a AOAC (do inglês :Association of Official Analytical Chemists) (Schofield et. al, 2001). Recentemente, muitos métodos analíticos são empregados para a determinação de polifenóis totais, em vez da determinação específica de cada componente (Lorrain et al, 2015). Dentre os métodos estão a cromatografia (Carando et al 1999), espectrometria (Claderaforteza et al., 1999), métodos eletroanáliticos (Wan et al., 2007) e a luminescência (Chen et al., 2005) Assim, muitos esforços têm sido destinados no desenvolvimento de metodologias específicas para a determinação de taninos em alimentos e bebidas (Ahmed et al., 2015).

Nesse contexto, o uso do método fluorimétrico aliado ao sistema automático flow batch torna-se uma idéia viável. O flow-batch (FB) apresenta alta velocidade analítica, baixo consumo de amostra e reagentes, baixo custo de montagem e facilidade de automatização e dos analisadores em batelada, parâmetros de desempenho como: altas precisão e velocidade analítica, baixo custo por análise, baixo consumo, manipulação e contaminação de reagentes e amostras, assim como geração de pouco resíduo para o meio ambiente.

Com o sistema automático flow-batch, diferentes processos analíticos podem ser realizados sem alterar sua configuração física; basta apenas mudar os parâmetros operacionais do software de controle, ou seja, o flow-batch é flexível, versátil, robusto e tem caráter multitarefa. Além disso, como não usa fluido carregador, não há perda de sensibilidade analítica (Andrade, 2016).

Diante disso, com o emprego dos pontos quânticos de carbono como reagente fluorescente, que pode proporcionar métodos analíticos sensíveis e seletivos, o presente trabalho busca explorar as vantagens inerentes a estas nanopartículas. Nesta pesquisa, os pontos quânticos de carbono foram obtidos por meio da síntese hidrotérmica do suco de xiquexique e utilizados para o desenvolvimento de um novo método fluorescente automático para a determinação de taninos em chás verde e preto. Neste intuito, foram utilizadas a flexibilidade e versatilidade do sistema flow-batch para a realização on-line da diluição do padrão e das amostras, empregando um LED ultravioleta como fonte de excitação e um espectrofluorímetro portátil como detector.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Geral

- Desenvolver um método analítico automático em flow-batch, empregando pontos quânticos de carbono, obtidos a partir de bioprecursores do sertão nordestino (xiquexique, palma e mandacaru), para determinação de taninos em chás.

### 1.2.2 Específicos

- Estudar os bioprecursores, xiquexique, palma e mandacaru e funcionalizantes para a obtenção dos pontos quânticos de carbono (PQCs);
- Sintetizar os PQCs empregando rotas de síntese hidrotérmica;
- Caracterizar os PQCs quanto as suas propriedades ópticas e estruturais;
- Analisar os PQCs sintetizados quanto a sua seletividade e sensibilidade para determinação de taninos;
- Utilizar um sistema automático em fluxo-batelada, empregando uma câmara de mistura com janelas de quartzo;
- Implementar um programa de gerenciamento do sistema automático para controle e aquisição dos espectros de fluorescência;
- Determinar taninos em amostras de chá verde e preto por meio do sistema desenvolvido com detecção fluorimétrica
- Avaliar o desempenho analítico do método proposto frente ao método de referência.

# Capítulo 2

# Fundamentação teórica

# 2 Fundamentação Teórica

## 2.1 Pontos quânticos de carbono

A nanociência estuda a relação entre as propriedades físico-químicas de um nanomaterial e suas dimensões. A nanotecnologia é uma ciência que tem sua aplicabilidade voltada à forma, caracterização e uso de materiais, dispositivos e sistemas cuja estrutura e tamanho são mantidos em escala nanométrica. (Balzany, 2005, Sanchez et al. 2010).

Os nanomaterias de carbono são materiais que possuem como característica o tamanho que vão desde 1 a 100 nm pelo menos em uma dimensão. Esses nanomateiras de carbono apresentam como principais vantagens a alta relação superfície/volume, permitindo que tenham propriedades térmicas, mecânicas, eletrônicas e biológicas únicas que não são encontrados em materias convencionais (Scida et al., 2011).

As nanopartículas à base de carbono, tais como: nanodiamantes, fulerenoC60, grafeno, nanotubos de carbono e pontos quânticos de carbono (PQCs) têm sido amplamente utilizadas em aplicações em vários campos (Zhang et. al, 2013, Xu et. al, 2013). Alguns exemplos dos nanomateriais de carbono estão representados na **Figura 2.1**

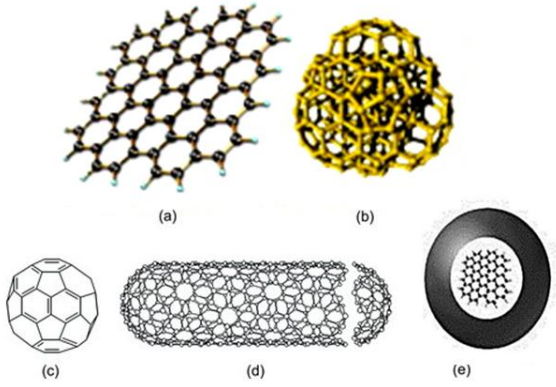



**Figura 2.1 -** Nanomateriais de carbono: **(a)** grafeno, (**b)** nanodiamantes, **(c)** fulereno C60, **(d)** nanotubos de carbono de parede única e **(e)** pontos quânticos de carbono (adaptado de Dai et al., 2012; Zhang et. al, 2013).

A descoberta acidental dos pontos quânticos de carbono (PQCs) ocorreu em 2004 durante a separação e purificação de nanotubos de carbono de parede simples

(NCPS) por eletroforese em gel. A suspensão resultou em um material altamente fluorescente. Esses materiais emitiram fluorescencia nas cores verde-azul, amarelo e laranja. (Xu et al, 2004).

Sabe-se que os PQCs são nanopartículas esféricas e apresentam tamanhos inferiores a 10 nm, podendo ser sintetizados por diferentes métodos físicos ou químicos e, dependendo das condições de produção, apresentam-se em forma cristalina ou amorfa (Gao et. al, 2016). Contudo, detalhes sobre o mecanismo de formação, estrutura e origem da fluorescência ainda estão sendo esclarecidos (Wang & Hu, 2014). Essas nanopartículas apresentam baixa toxicidade, excelente solubilidade em água, fácil funcionalização orgânica, alta resistência à fotodegradação e boa biocompatibilidade (Andrade, 2016).

Quanto à sua estrutura, assim como outros nanomateirais de carbono os PQCs possuem um núcleo funcionalizado, apresentando uma variedade de grupos polares como hidroxila, carbonila e alquila. Tais grupos funcionais permitem que os PQCs interajam com moléculas orgânicas através de forças não covalentes, como ligação de hidrogênio, forças eletrostáticas, forças van der Waals e interações hidrofóbicas. Essas interações e suas lacunas ou camadas nas estruturas nanométricas tornam-os candidatos para serem utilizados também como adsorventes. (Zhang et al., 2015, Hyung et al., 2007, Andrade, 2016).

Em todos os casos, a estrutura básica dos PQCs é composta de uma camada de átomos de carbono ligados a $sp^2$, onde cada átomo é conectado a outros três átomos de carbono no plano x-y e por uma nuvem eletrônica, fracamente deslocalizada, ao longo do eixo z. (Coville et al., 2011).

Os PQCs apresentam classificação dimensional 0D, ou seja, todas as dimensões (x,y e z) se encontram compreendidas em escala nanométrica. Por ser um nanomaterial 0D os PQCs produzem excitação por radiação eletromagnética um par elétron-buraco conhecido como éxciton (Tiwari et al., 2010)

Este éxciton sofre um forte confinamento quântico nas três dimensões do espaço, o que confere aos pontos quânticos algumas propriedades ópticas interessantes, tais como a forte dependência de emissão fluorescente em função do tamanho das partículas (Machado et al., 2015).

### 2.1.1 Propriedades ópticas dos PQCs

Os PQCs possuem a assinatura clássica de confinamento quântico o que confere a sua absorção óptica e a propriedade de fotoluminescência a dependência em relação ao tamanho (Kang et. al, 2010). Os pontos quânticos de carbono geralmente apresentam absorção óptica na região do UV com uma cauda que se estende até o visível. As bandas de absorção podem ser atribuídas às transições π-π* e n-π*, provenientes das ligações C=C e C=O (Li et. al, 2012; Machado et. al, 2015).

A maioria dos PQCs, como aqueles preparados por ablação a laser, oxidação eletroquímica, micro-ondas, ultra-som ou método hidrotérmico têm uma banda de absorção em torno de 260 à 320 nm (Miao et. al, 2015). No entanto, a funcionalização da superfície dos PQCs pode deslocar a banda de absorção para comprimentos de onda maiores, como ocorre, por exemplo, na funcionalização da superfície com 4,7,10,trioxa-1,13-tridecanediamina (350-550 nm) ou organossilano (340-410 nm)(Andrade, 2016).

A propriedade de fluorescência ainda não possui uma origem completamente estabelecida. Porém, estudos citam que a fluorescência dessas nanopartículas pode ser atribuída ao efeito de confinamento quântico e das diferentes armadilhas emissivas na superfície das nanopartículas (Baker & Baker, 2010; Li et al., 2012

Li e colaboradores (2010) relataram um procedimento simples para síntese eletroquímica de PQCs a partir de fragmentos de grafite, com tamanhos variáveis entre 1,2 a 3,8 nm. Esses autores afirmaram que a origem da emissão de fluorescência dos PQCs é proveniente do tamanho das partículas obtidas (**Figura 2.2 (a),(b) e (c)**). Sendo que a **Figura 2 (c)** mostra mostra a dependência da diferença HOMO-LUMO sobre o tamanho dos fragmentos de grafeno. A medida que o tamanho do fragmento aumenta, o espaço diminui gradualmente, e a energia do intervalo no espectro visível. ).

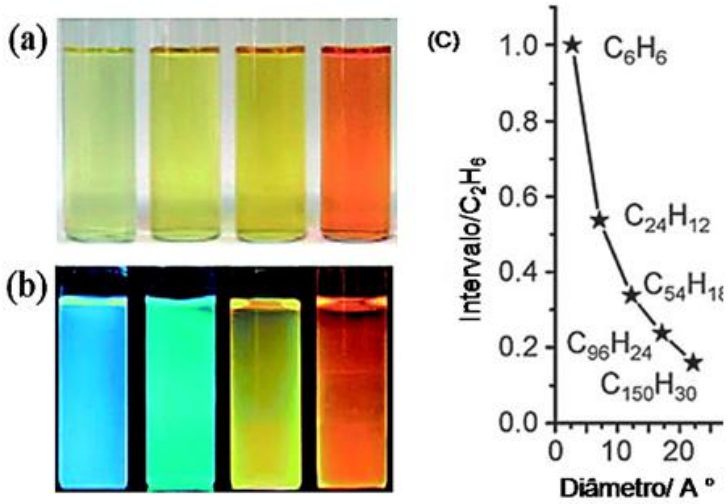



**Figura 2.2.-**Fotografia das soluções de PQCs sob radiação **(a)** visível **(b)** ultravioleta (365 nm). **(c)** intervalo obtido a partir de fragmentos de grafeno com um diâmetro de 14-22 A, o que concorda bem com a emissão visível dos PQCs com diâmetros de menor que 3 nm. (adaptado de Li et. al, 2010).

Na **Tabela 2.1** estão descritas as caracteristicas exploradas da fluorescência assim como suas aplicações analíticas.

**Tabela 2.1 -** Descrição de características básicas da fluorescência dos PQCs exploradas em aplicações analíticas(Adaptado de Andrade, 2016).

| Característica explorada | Aplicação |
|---|---|
| Supressão de fluorescência (fluorescência turn-off) | Determinação de íons metálicos Be(II), Hg(II), Fe(III), Cu(II), Pb(II), Mn(II), Ag(I), Sn(II)), fluór, proteínas,$ClO^-$,$NO_2$, tartrazina, ácido tânico |
| Aumento de fluorescência (fluorescência turn on) | Aplicações em bioimagens, e determinação de K(I), Pb(II), Zn(II), quercetina, -nitrofenol, 2,4-dinitrofenol |
| Recuperação da fluorescência de complexo Metal-PQcs (por exemplo Hg(II), Fe(III), Cu(II), Pb(II), Eu(III)) | Determinação de iodo, pirofosfato, fosfato, ácido ascórbico, ácido fítico, cisteína, tiamina, oxalato, diclorvós (insetcida). |
| Atuando como doador e receptor em processos de FRET (do inglês: fluorescence resonance energy tranfer) | Determinação de Al(III), Zn(II), amônia, imatinib (fármaco). |

Os pesquisadores realizaram diversos cálculos quânticos para interpretar a afinidade entre fluorescência e o tamanho das partículas. Constata-se teoricamente, que o intervalo entre o orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) e o orbital molecular não ocupado de menor energia (LUMO) diminui gradualmente com o aumento do tamanho das nanopartículas. Desse modo, os autores concluíram que a forte emissão fluorescente dos PQCs pode ser atribuída ao tamanho quântico da estrutura de grafite em vez da superfície das nanopartículas.

Outra hipótese relatada é a de que a fluorescência se origina das diferentes armadilhas (sítios ativos) presentes na superfície dos PQCs. Tais armadilhas são formadas principalmente como resultado da oxidação da região superficial do nanocristal, servindo como centros de captura dos éxcitons, permitindo assim a sua fluorescência característica. Nesse aspecto, quanto maior o grau de oxidação na região superficial maior o número de regiões ativas (armadilhas de superfície) (Bao et al., 2015, Ding et al. 2016).

## 2.2 Tipos de sínteses dos PQCs

As sínteses dos PQCs englobam dois métodos principais **(Figura 2.3)**: top-down, abordagem em que estruturas maiores são reduzidas em tamanho para a nanoescala, mantendo suas propriedades originais sem controle de nível atômico como a miniaturização no domínio da eletrônica ou desconstruindo as estruturas maiores em menores partes compostas e o método bottom-up, também chamado de nanotecnologia molecular ou fabricação molecular (Sanchez et. al, 2010).

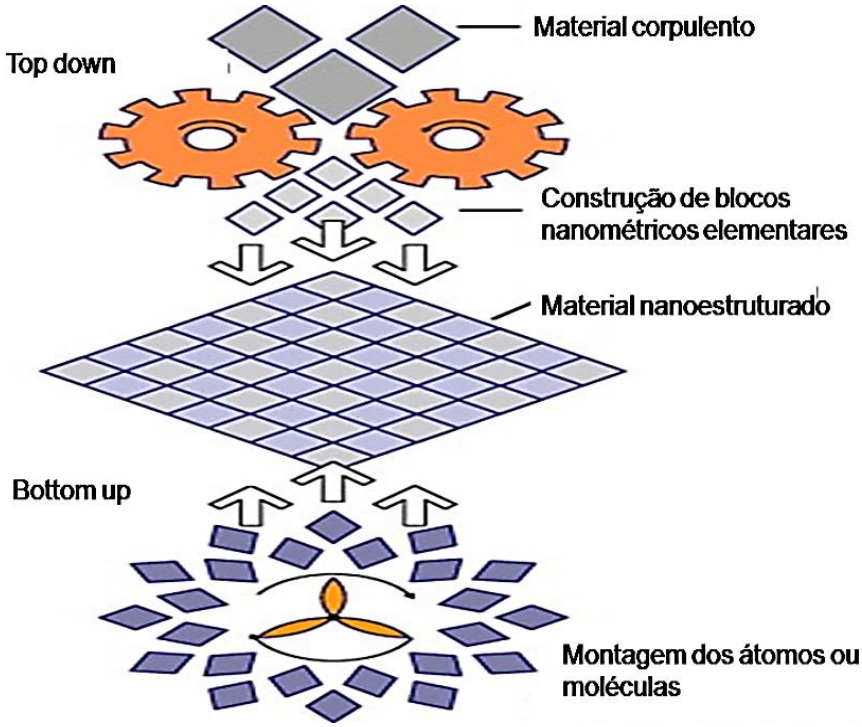



**Figura 2.3 -** Diagrama esquemático da preparação dos PQCs via abordagens “top-down” e “bottom-up” (Adaptado de.Sanchez et. al 2010).

As abordagens bottom-up permitem a preparação de nanoestruturas com menos defeitos e composições químicas mais homogêneas. No entanto, algumas das condições necessárias para a síntese bottom-up trazem desvantagens, tais como: tempo, consumo de energia, matérias-primas de custo elevao e/ou instrumentos, dessa forma, dificultam a preparação de grandes quantidades de PQCs com qualidade adequada. Essa situação é mais acentuada quando se aplicam as abordagens top-down (Machado et. al, 2010).

Outra forma de classificação é a partir dos métodos, físicos ou químicos. Os métodos físicos incluem descarga de arco voltaico, ablação a laser e tratamento com plasma. Os métodos químicos, no que lhe concernem abrangem sínteses como: eletroquímica, combustão, oxidação ácida, hidrotérmica, pirólise térmica, destruição de fulerenos e nanotubos de carbono, dentre outros (Sanchez et al., 2010).

Na **Tabela 2.2**, são apresentadas de forma resumida suas vantagens e desvantagens.

**Tabela 2.2.-** Características dos diferentes métodos de sínteses de PQCs.

| Métodos Sintéticos | Vantagens | Desvantagens |
|---|---|---|
| Oxidação eletroquímica[1] | • Tamanho controlável;<br>• Etapa única. | • Poucos precursores de baixa massa molecular |
| Irradiação a laser[1] | • Rápido<br>• Superfície dos PQCs ajustável | • Baixo rendimento quântico<br>• Difícil controle do tamanho |
| Tratamento ultrassônico | • Rápido<br>• Ambiente amigável<br>• Custo reduzido | • Baixo controle do tamanho |
| Oxidação ácida | • Instrumentação simples<br>• Vários precursores | • Baixo controle do tamanho<br>• Processos lentos |
| Tratamento hidrotérmico[2] | • Baixo custo<br>• Ambiente amigável<br>• Não tóxico | • Baixo controle do tamanho |

[1]Métodos físicos; [2]Métodos químicos(adaptado de Andrade,2016)

Uma abordagem simples para preparar pontos quânticos de carbono é apresentada por Li e colaboradores (2010) com uma passivação rápida das nanopartículas de carbono em solvente (como etanol, acetona ou água) a partir do uso de um laser.

Wang et. al (2012) apresentaram uma estratégia rápida para sintetizar PQCs de fontes de carbono acessíveis. Os PQCs tinham como bioprecursor ovos de galinha, e a carbonização foi realizada por meio da indução de pirólise de plasma onde a chama em baixa temperatura, mas com alta energia gera partículas carregadas, elétrons e prótons, e espécies neutras excitadas, ambas usadas para fornecer um ambiente propício para a formação das nanoestruturas.

Ding e colaboradores (2016) produziram vários PQCs com emissão fluorescente ajustável, por meio do tratamento hidrotérmico dos precursores, ureia e p-fenilenodiamina, na proporção 1:1. Os PQCs sintetizados apresentaram uma estrutura de grafite em seu núcleo e uma distribuição de tamanhos homogênea. Após a excitação monocromática (365 nm), os PQCs apresentaram picos de emissão fluorescente variando da região do azul para o vermelho, entre 440 e 625 nm. Esse estudo relacionou o desvio dos picos de emissão de FL para a região do vermelho com aumento do grau de oxidação das superfícies dos PQCs. Desse modo, a origem da fluorescência foi atribuída às armadilhas presentes na superfície dos PQCs.

### 2.2.1 Síntese por tratamento hidrotérmico

Nos últimos anos, o processo denominado carbonização térmica vem gerando grande interesse, visto que o tratamento térmico de uma solução ou dispersão aquosa de um sacarídeo como: glicose, sacarose e amido, é tratada termicamente a uma temperatura moderada na faixa de 170-350 °C, sob pressão. Desse processo, obtém-se um sólido rico em carbono com substâncias orgânicas solúveis em água, furfural, hidroximetilfurfural, ácidos e aldeídos (Sevilla et. al, 2009).

Vale ressaltar que as temperaturas normalmente empregadas são inferiores a 190°C e podem evitar a produção em larga escala de produtos secundários comuns de desidratação do açúcar, por exemplo, dihidroxiacetona, ácidos levulínicos e fórmicos no caso da hexose (Ryu et. al, 2010).

O tratamento hidrotérmico surgiu para tentar suprir a grande necessidade de desenvolver um método que apresentasse solução fácil, de baixo custo, e com alto rendimento para a preparação de PQCs com forte emissão de fluorescência (Dong et. al, 2013). Essa técnica se torna apropriada por oferecer várias rotas de síntese com diferentes precursores de carbono como carboidratos, moléculas orgânicas e uma multiplicidade de bioprecursores. Além disso, uma variedade de nanomaterias de carbono já foram sintetizados e esses apresentavam tamanhos, formas e grupos funcionais diversificados, dependendo do tipo de precursor (Andrade, 2016).

As sínteses dos PQCs via tratamento hidrotérmico podem ser realizadas com inúmeras estratégias diferentes, sendo que os métodos mais empregados apresentam uma diferença na etapa da funcionalização da superfície dos PQCs, que pode ser realizada no mesmo procedimento da carbonização do precursor (etapa única), ou realizada após a produção dos PQCs (duas ou mais etapas).

Liu et. al, (2014) sintetizaram os PQCs através de um método hidrotérmico com folhas de bambu pulverizadas e, na sequência diluídas em água ultrapura. A mistura resultante foi então transferida para uma autoclave de teflon e aquecida a 200 °C por um período de 6 h em um forno mufla. Em seguida, a funcionalização foi feita com polietilenimina ramificada (PEI). A PEI foi fisicamente adsorvida nos PQCs por força eletrostática, após 2 h de incubação à temperatura ambiente resultando em PQCs com polietilamina. Os PEI-PQCs obtidos são utilizados como fluorescência para a quantificação de $Cu^{2+}$.O processo está esquematizado na **Figura 2.5** .

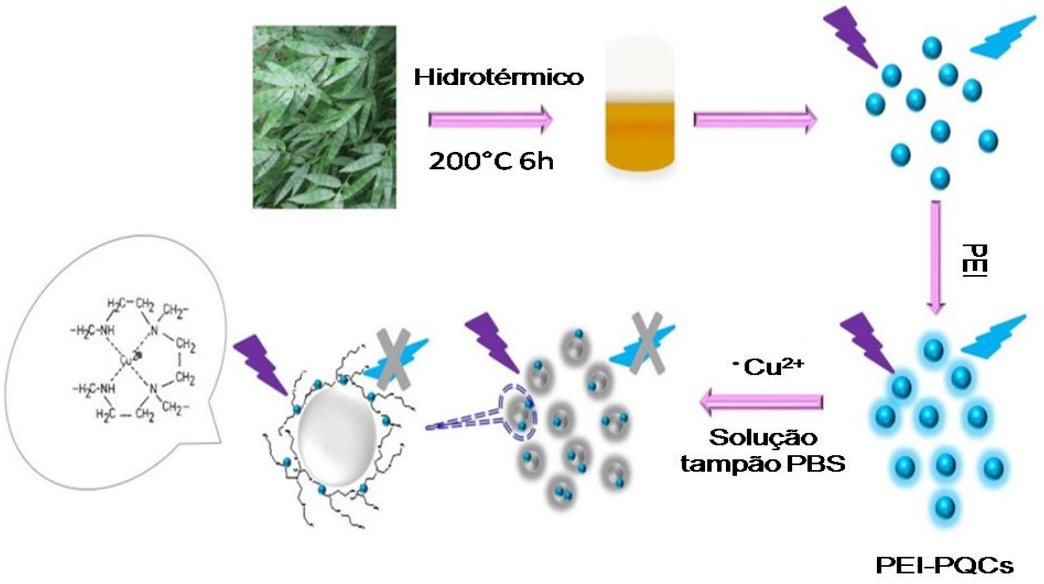



**Figura 2.4 -** Diagrama do processo de síntese e aplicação dos PEI-PQCs (adaptado de Liu et. al, 2014).

Campos et. al. (2017) sintetizaram PQCs pelo método hidrotérmico de etapa única, dissolvendo lactose (12 mg) em 200 µL de água na presença de vitamina B12 (10 mg) e ácido fosfórico (800 µL, 85%) em uma autoclave de aço inoxidável com teflon. A mistura foi aquecida à 150 ° C durante 2 horas. Esses PQCs foram aplicados como sensores fluorescentes com base na transferência de energia de ressonância por fluorescência (do inglês: fluorescence resonance energy transfer, FRET). Nesse procedimento ocorre uma transferência não radiativa da energia de excitação de um doador para um receptor via interação dipolo-dipolo.

### 2.2.2 Funcionalização da superfície dos PQCs

Os PQCs não funcionalizados geralmente apresentam um baixo rendimento quântico de fluorescência, levando a uma baixa sensibilidade para detecções analíticas. Sendo assim, o desenvolvimento de PQCs funcionalizados com o alto rendimento quântico tornou-se muito importante para determinações analíticas em nível traço (Ding et al, 2013, Dong et. al, 2012).

Dessa forma, a manipulação do tamanho do núcleo, composição química e estrutura dos PQCs controlam suas propriedades fotoluminescentes, ou seja, a modificação com revestimento de outros materiais pode gerar PQCs que apresentam biocompatibilidade controlável e maior estabilidade química. Portanto, a superfície dos PQCs depende dos grupos funcionais e/ou seus efeitos de passivação superficial (Ding et. al, 2013, Ahmed et. al, 2015).

A dopagem com heteroátomo, especialmente nitrogênio e fósforo, foi investigada ativamente para melhorar o rendimento quântico dos PQCs. Os pontos quânticos de carbono dopados com nitrogênio exibiram rendimentos quânticos muito elevados (73%) com excitação e emissão independentes e o dopado com fosfóro apresentou fluorescência na cor azul com rendimento quântico de até 25%.(Ye et. al, 2016)

Jaiswal e colaboradores (2011) relatam um método realizado no forno micro-ondas no qual um processo de etapa única, rápido e simples permitiu a síntese dos PQCs usando polietilenoglicol (PEG) como agente precursor e passivador. Os PQCs apresentaram um redimento quântico de 16%.

Martins e colaboradores (2016) relatam a síntese hidrotérmica de um fotocatalisador composto de dioxido de titânio ($TiO_2$) e pontos quânticos de carbono dopados com fosfato de amônio (N-PQCs@$TiO_2$), utilizado como catalisador da foto-oxidação de óxido nítrico (NO) sob luz ultra-violeta e visível. Os (N-PQCs@$TiO_2$) apresentaram uma conversão de NO de 27,0% mais do que duas vezes maior do que o observado para $TiO_2$P25 (10%) sob luz visível e a seletividade do processo aumentou de 37,4% para 49,3%.

Recentemente o uso do funcionalizante etanolamina vem se destacando devido ao seu rendimento quântico.

Dong et. al (2014) sintetizaram N-PQCs aquecendo etanolamina durante 7 minutos, adicionando peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$) para auxiliar no processo de pirólise. Os N-PQCs obtidos possuem excitação azul brilhante, luminescência dependente do pH e rendimento quântico 10,3%.

Krysmann et. al (2011) relatam uma síntese por meio de pirólise na temperatura de 180° C com rendimento quântico de 50%. Foram utilizados ácido cítrico e etanolamina como precursor e funcionalzante, respectivamente produzindo, um espectro de fluorescência com forte intensidade.

## 2.3 Bioprecursores

Recentemente, com a conscientização da química verde que visa a sustentabilidade, o uso de solventes não tóxicos e econômicos na preparação de PQCs deve ser levado em consideração no processo de síntese. Assim, a produção de pontos quânticos de carbono usando recursos de biomassa renováveis como o carbono com baixo custo e métodos mais ecológicos é um conceito desafiador (De e Karak, 2013). Nesse cenário, o desenvolvimento de estratégias simples e econômicas para sintetizar PQCs a partir de bioprecursores **(Figura 2.6)** facilmente disponíveis e sustentáveis, torna-se um conceito inovador no campo de pesquisa.

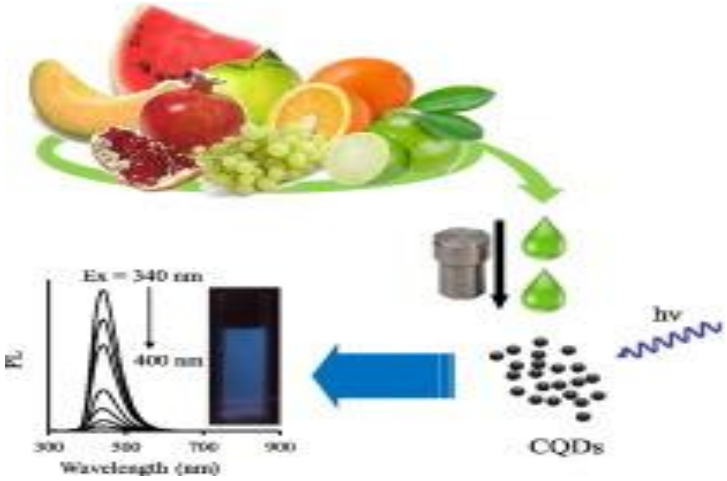



**Figura 2.5**- Esquema da síntese dos PQCs com uso de bioprecursores (Adaptado de.Barati et al 2015).

O suco de banana, laranja e a grama, entre outros, vêm sendo frequentemente usados como bioprecursores na síntese de PQCs via carbonização hidrotérmica, devido ao seu baixo custo, fácil disponibilidade e recurso quase ilimitado (Han et. al, 2014).

Xue et. al (2016) desenvolveram uma abordagem verde para a síntese de PQCs usando cascas de amendoim como precursor de carbono. Os PQCs foram preparados por meio de uma simples pirólise das cascas de amendoin a 250°C por 2 horas,. com um rendimento quântico (RQ) de cerca de 9,91%. Em relação ao RQ, esse é mais alto do que a de PQCs relatados anteriormente. Foram preparados usando outra biomassa, como o tabaco para cachimbo (3,2%) (Sha et. al, 2013), café instantâneo (5,5%) (Jiang et. al, 2014), casca da melancia (7,1%) (Zhou et. al, 2012) ou a farinha de milho (7,7%) (Wei et. al, 2014).

Mehta et al (2015) relatam que os PQCs solúveis em água foram sintetizados pela carbonização hidrotermal usando suco de maçã como precursor sem modificação química adicional. Os PQCs foram aplicados como sondas na detecção de imagem das bactérias (*Mycobacterium tuberculosis, Pseudomonas aeruginosa*) e células fúngicas (*Magnaporthe oryzae).* Seu desempenho foi justificado pela presença dos grupos funcionais hidroxila, cetona, ácido carboxílico e amina em sua superfície.

Pires et. al (2015) sintetizaram PQCs utilizando radiação micro-ondas em uma técnica que envolve duas etapas. A primeira empregando goma de caju como bioprecursor para formação dos PQCs e 5-hidroximetil furfural. A segunda etapa

envolveu a polimerização do composto para dar origem a uma estrutura de poli-furanico seguida por carbonização Os PQCs gerados obtiveram 8,7% de rendimento quântico.

Mehta et. al (2014) reportam o uso do suco de cana de açúcar em etanol anidrido como bioprecursor numa síntese de uma etapa pelo método hidrotérmico com duração de 180 minutos á 120°C . Os PQCs foram conjugados com células de bactérias e leveduras com sucesso e mostraram diferentes cores de fluorescência (azul, verde e vermelho) dependendo no comprimento de onda de excitação. Portanto, o presente método pode ser aplicado em bioimagem in vitro e in vivo em biologia celular e outras aplicações sensíveis.

Diante dos trabalhos apresentados torna-se viável o uso de bioprecursores, visto que esses são recursos acessíveis e econômicos. Além disso, o uso de precursores naturais permitem que esses tenham uma aplicabilidade analítica e um rendimento quântico satisfatório.

### 2.3.1 Cactáceas nordestinas

O xiquexique (*Pilosocereus gounellei*), a palma (*Opuntia ficus indica*) e o mandacaru (*Cereus jamacaru*) (**Figura 2.6**) são cactáceas nativas que se desenvolvem muito bem nas áreas mais secas da região semi-árida; cresce em solos rasos, em cima de rochas e se multiplicam regularmente, cobrindo extensas áreas as cactáceas nativas ocorrem principalmente nos estados da região Nordeste do Brasil (Almeida et al., 2007).

O número de espécies de cactáceas no nordeste brasileiro não é grande, todavia, na paisagem da zona seca, que representa a maior parte da área total da região, algumas espécies são numerosas,chegando a ser dominantes (Silva et. al, 2005).

**Figura 2.6:** Fotografia das cactáceas encontradas no sertão nordestino: (a) xiquexique (*Pilosocereus gounellei*), (b) palma (*Opuntia ficus indica*) e o (c) mandacaru (*Cereus jamacaru*)

**Tabela 2.3-** Valores obtidos para a composição físico-química das cactáceas xiquexique, palma e mandacaru.

| **Composição físico-química** | **Bioprecursor** | | |
|---|---|---|---|
| | **Xiquexique** | **Palma** | **Mandacaru** |
| Acidez titulável | 2,50 | 0,25 | |
| Ph | 5,6 | 6,0 | 4,4 |
| Proteína | 5,47 | 1,0 | |
| Cálcio (mg/mg) | 8,0 | 70 | 9,0 |
| Fibras | 1,45 | 0,26 | |
| Pectina | 1,13 | | |
| Açúcares totais | 3,82 | 13,45 | |

## 2.4 Técnicas de caracterização dos PQCs

A escolha adequada das técnicas de caracterização deve ser realizada levando-se em consideração a resolução, o tipo de informação e, principalmente, a complementaridade entre elas. A evolução das técnicas de caracterização é bastante significativa para a compreensão dos nanomateriais, de forma que o seu desenvolvimento estimulou significativamente os estudos da nanotecnologia (Andrade, 2016).

A realização da caracterização opta por técnicas mais adequadas que visam investigar e obter conhecimento sobre as propriedades ópticas e estruturais das nanopartículas de carbono. Dentre os métodos utilizados destacam-se a. difração de raios X (DRX), espectroscopia infravermelho com transformada Fourier (do inglês Fourier transform infrared, FTIR), espectrometria de absorção molecular e a espectrometria de fluorescência molecular.

O rendimento quântico fluorescente (RQ) é simplesmente a razão entre o número de moléculas que fluorescem e o números de fótons absorvidos.O cálculo relativo lineariza intensidades de fluorescência integradas do fluoroforo de interesse com o de referência em relação à sua absorvância correspondente (Brower, A.M., 2011).

## 2.5 Chás

A partir da *Camellia sinensis* pode-se produzir o chá verde, uma infusão de folhas (levemente fermentadas), que está entre as mais consumidas do mundo.. É uma das bebidas não alcoólicas mais populares, consumido por mais de dois terços da população mundial, com uma estimativa de 18 a 20 bilhões de xícaras consumidas diariamente. Por exemplo, no Reino Unido estima-se o consumo médio de 1 L / pessoa / dia por ser refrescante e possuir propriedades medicinais estimulantes. É processado de diferentes maneiras em várias partes do mundo para dar chá verde, preto, oolong e pu-erh (Bansal et al, 2013, Cabrera et. al , 2003).

Em relação à sua composição química, o chá apresenta polifenóis, alcalóides (cafeína, teofilina e teobromina), aminoácidos, carboidratos, proteínas, clorofila, compostos voláteis, flúor, minerais, oligoelementos, entre outros compostos indefinidos. Entre esses, o grupo de polifenóis constitui maior parte dos componentes da folha de chá e exibe potente atividade antioxidante in vitro e in vivo (Cabrera et. al, 2003).

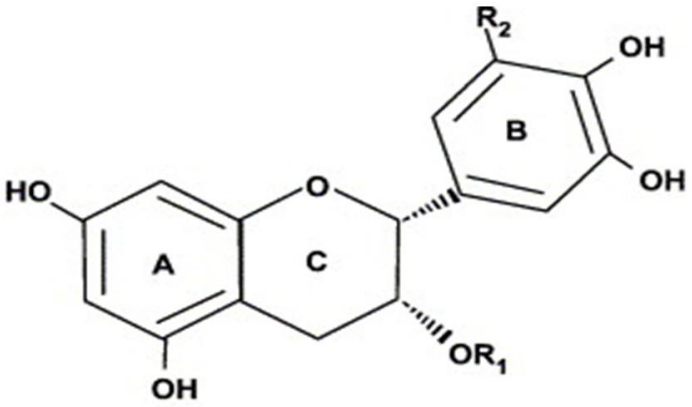
As atividades inibitórias antioxidantes e enzimáticas de compostos de polifenóis, como flavonóides e ácidos fenólicos, em plantas alimentares e medicinais são amplamente investigadas há muito tempo (Geng et. al, 2016)

A maioria dos efeitos benéficos do chá verde são atribuídos aos seus flavonóides polifenólicos, conhecidos como catequinas que representam 30 à 45% de extrato sólido de chá verde e têm propriedades anti-câncer, anti-metastático, antiinflamatório, fator letal anti-antraz e vasculo protetor (Clemente, 2009).

As catequinas de chá são um eliminador eficiente de radicais livres devido ao seu potencial como agente oxidante. Um menor potencial de redução tem tendência para perder elétrons ou hidrogênio. A taxa de reação com radicais livres e a

estabilidade dos radicais antioxidantes resultantes contribuem para a reatividade do antioxidante (Aroyeun, 2016).

Entre as catequinas presentes no chá, as mais conhecidas **(figura 2.7)** incluem epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), epicatequina-3- galato (ECG) e o principal flavonóide epigalocatequina-3-galato (EGCG) (Colalto, 2010) Taninos são grandes moléculas de polifenóis, e constituem a massa bruta dos compostos ativos do chá verde, que juntamente com as catequinas compreendem cerca de 90% dos compostos polifenólicos presentes nesta bebida (Lima, 2010).




Epicatequina (EC): $R_1 = R_2 = H$
Epigalocatequina (EGC): $R_1 = H; R_2 = OH$
Epicatequina-3- galato (ECG): $R_1$ = Galloy; $R_2 = H$
Epigalocatequina-3-galato (EGCG) ): $R_1$ = Galloyl; $R_2 = OH$

**Fig. 2.7** -. Principais catequinas em folhas de chá (adapatado de Luczaj et al.2005).

## 2.6 Taninos

O ácido tânico (AT) é um composto fenólico natural que pode ser encontrado em frutas e bebidas, incluindo cerveja, café, chá preto e verde o que pode influenciar fortemente no seu sabor e, portanto, é um parâmetro importante para avaliar e controlar a qualidade desses produtos.Os taninos são adstringentes e têm a capacidade natural de se complexar com várias macromoléculas, como proteínas, amido e celulose além de minerais (Lima et. al, 2012; Ahmed et. al 2014).

Os taninos são comumente divididos em hidrolisáveis e condensados, em função da sua estrutura química. Os taninos hidrolisáveis são polímeros de ácido gálico (galotaninos) ou ácido hexahidroxidifênico (elargitaninos). São conhecidos por sua capacidade de induzir efeitos benéficos sobre a saúde humana através da

manifestação de algumas atividades biológicas, incluindo antimutagênicas, propriedades anticancerígenas e antioxidantes (Romani et. al, 2006).

### 2.6.1 Aplicação de PQCs na determinação de taninos

O método espectrofotométrico Folin-Ciolcateau, aceito por órgãos internacionais como a AOAC é comumente empregado para determinação de taninos (Schofield et. al, 2001). Contudo novos métodos vêm sendo desenvolvidos tais como os cromatográficos (Mamella et. al, 2000) turbidimétricos (Lima et. al, 2012) eletroquímicos (Rahin et. al, 2008) quimioluminescentes (Xie et. al. 2003) fluorescentes (Zu et. al, 2010) e por imagens digitais (Lima et. al, 2012). Recentemente existem alguns métodos que empregam os pontos quânticos de carbono para a determinação de taninos descritos a seguir.

Ahmed e colaboradores (2014) descrevem a síntese de PQCs por carbonização térmica do ácido 6-bromohexilborônico, precursor, e do agente funcionalizante polietilenglicol a 180°C. Os PQCs mostraram um potencial analítico para determinação de ácido tânico em vinhos brancos e tintos. O método apresentou uma faixa linear de concentração de 0,1mg $L^{-1}$ à 10 mg $L^{-1}$ com limite de detecção de 0,018 mg $L^{-1}$.

Liu et. al (2017) sintetizaram PQCs dopados com nitrogênio, obtidos a partir do ácido ascórbico e amônia, preparados através de um processo de ultra-som Verificou-se que o $KMnO_4$/ Ce(IV) poderia oxidar diretamente os PQCs para produzir emissão de quimioluminiscência. Foi constituída uma faixa linear de concentração entre 0,07 µM a 7,0µM, com um limite de detecção de 0,026µM. O método foi aplicado a determinação de taninos na planta galo chinês (*Rhus chinensis*).

## 2.7 Sistemas automáticos flow-batch

Os métodos analíticos baseados na introdução e processamento da amostra em fluxo são designados de análise em fluxo. Dentre os métodos usuais estão os de análise por injeção em fluxo (do inglês: flow injection analysis - FIA) (Ruzicka e Hansen, 1975) análise em fluxo monosegmentado; (monosegmented flow analysis - MSFA) (Pasquini, C., Oliveira, W. A., 1985) análise por injeção sequencial

(sequential injection analysis - SIA) (Ruzicka e Marshall, 1990), análise em fluxo multicomultado (multicommutation in flow analysis - MFA) (REIS et. al., 1994) e análise em fluxo-batelada (flow-batch analysis - FBA) (HONORATO et. al., 1999)

Os analisadores flow-batch, descritos na literatura caracterizam-se como um híbrido dos sistemas automáticos em fluxo e em batelada, incorporando a maioria das vantagens analíticas de ambos (Honorato et al.,1999). A **Figura 2.8** representa de forma esquemática um sistema de análise flow-batch (FB) os seus prinicpais componentes.

O flow-batch tem como principal característica a presença da câmara de reação ou mistura (**Figura 2.8a**), um objeto cilíndrico e oco, geralmente de teflon, com volume interno de aproximadamente 2,00 mL. Nessa câmara de mistura ocorre a maior parte dos procedimentos analíticos, como adição, homogeneização e detecção do analito (Honorato et. al, 1999).

Nesse sistema de análise, a câmara de mistura recebe os volumes adequados de reagentes e amostra através do tempo de abertura das válvulas solenoides (**Figura 2.8b**) e a sua mistura torna-se garantida pela utilização de um agitador magnético (**Figura 2.8c**). A propulsão dos fluidos é normalmente realizada através de uma bomba peristáltica (**Figura 2.8d**). O controle das válvulas é obtido por meio de um modulo de controle (**Figura 2.8e**). O sistema de detecção (**Figura 2.8f**) pode ou não ser acoplado à câmara de mistura, conforme a necessidade ou configuração do sistema requerido. Nos sistemas flow-batch, todo o procedimento de controle é realizado com auxílio de um computador (**Figura 2.8g**), que garante a frequência analítica e a reprodutibilidade nas aplicações. (Lima, M. B., 2012).

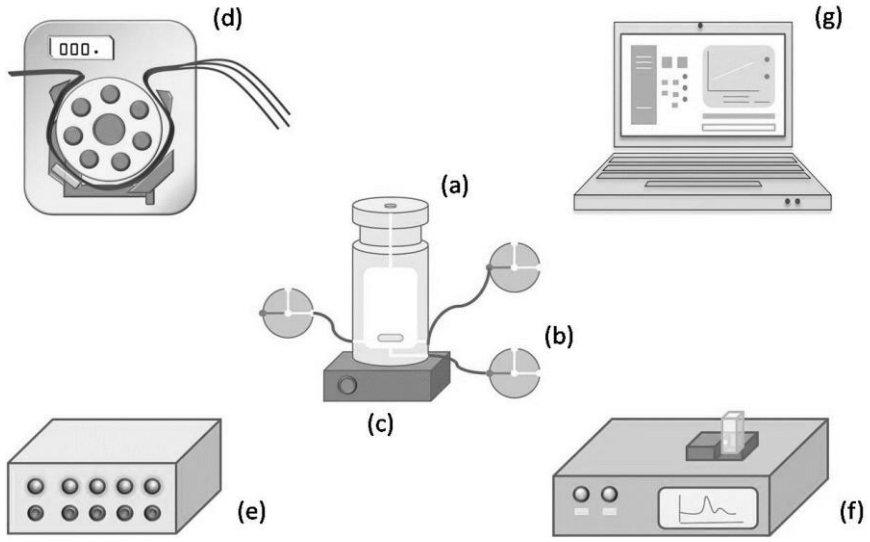



**Figura 2.8 -** Esquema simplificado de um sistema de análise em fluxo-batelada (*flow-batch*). (a)câmara de mistura, no detalhe uma barra magnética; (b) válvulas solenóides; (c) agitador magnético; (d) Bomba peristáltica; (e) acionador/controlador de válvulas; (f) exemplo de detector, espectrofotômetro e (g) microcomputador, para administração geral do sistema. (aaptado de Lima, M. B. 2012).

### 2.7.1 Sistema flow-batch aplicado à determinação de taninos

Quanto à aplicação do sistema FB em taninos apenas um trabalho do nosso grupo de pesquisa, até o momento, reporta os seguintes procedimentos analíticos.

Lima e colaboradores (2012) propuseram um analisador micro flow-batch (μFBA) com volume de 200 μL para a determinação turbidimétrica e fotométrica de taninos totais em amostras de chá verde e preto. O método turbidimetrico proposto baseou-se na reação de precipitação de Cu(II) com taninos em meio de acetato a um pH de 4,5. O método fotométrico baseou-se na reação de complexação de taninos com tartarato ferroso. Foi obtida uma faixa linear de concentração de 20 a 100 mg $L^{-1}$ e limite de detecção de 6,89 mg $L^{-1}$.O sistema micro flow-batch empregou um LED verde, com máximo de emissão em 560 nm, como fonte de radiação e um fototansistor como detector.

Lima et. al (2013) apresentaram uma combinação de imagens digitais tomadas com uma webcam em um analisador μFBA para determinar os taninos no chá verde, empregando o conhecido método do tartarato ferroso. As imagens foram analisadas com base no modelo de cores RGB (vermelho-verde-azul). Todos os

padrões e soluções foram preparadas on-line assim como os processos analíticos foram concluídos simplesmente mudando a operação dos parâmetros no software de controle. O software foi escrito pelos autores do trabalho, possilitando ao sistema alcançar uma frequância analítica de 190 análises por hora.

# Capítulo 3
# Experimental

# 3 Experimental

## 3.1 Síntese e caracterização dos pontos quânticos de carbono

### 3.1.1Amostras

Para a avaliação do método proposto e de referência, seis amostras de chás verde e preto, três de cada tipo, de marcas e lotes distintos foram analisadas. As amostras foram adquiridas no mercado local da cidade de João Pessoa, Paraíba, Brasil, dentro do prazo de validade de cada produto.

Para o preparo das amostras de chá verde e preto, realizado em triplicata, foram utilizada 2g de cada amostra e adicionados 50mL de água ultra pura previamente aquecida até 90°C e deixar a infusão ocorrer por 10 min sobre controle de temperatura realizado por auxilio de um termômetro. A mistura foi filtrada com papel qualitativo, lavando-se os resíduos e na sequência completando o volume do balão de 100,0 mL com água ultrapura. Por conseguinte, as amostras foram transferidas para um recipiente âmbar, rotuladas e guardadas à temperatura de 4°C para análises futuras.

As amostras de chá foram diluídas para as análises em fluxo batelada e de referência.Visto que a quantidade de taninos hidrossolúveis presentes nas amostras era alta. Sendo assim, uma alíquota de 5 mL da amostra de chá foi retirada e transferida para um balão volumétrico de 50 mL completado com água ultrapura.

### 3.1.2 Reagentes e soluções

Todas as soluções preparadas para as análises fizeram uso de água destilada seguidamente ultrapura, com condutividade ≥ 18,2 MΩ $cm^{-1}$ (Milli-Q Millipore Corporation)..Todos os reagentes usados foram de grau analítico

Os padrões de ácidos tânicos, foram preparados a partir da diluição apropriada da solução estoque. Tal solução estoque foi produzida com 0,0100g de ácido tânico, adquirido da Labsynth, diluídos para 100,0 mL em um balão volumétrico com uso de água ultrapura.

A solução tampão de fosfato de sódio com pH 8,00, foi preparada pela mistura na proporção de 50,0 mL da solução de 0,10 mol $L^{-1}$ de fosfato de sódio heptahidratado ($KH_2PO_4$) (Labsynth)) com 29,63 mL de 0,10 mol $L^{-1}$ hidróxido de sódio anidro (NaOH) (Labsynth).

A solução de tartarato ferroso foi preparada a partir de 1,0000 g de sulfato de ferro heptahidratado ($FeSO_4$ .$7H_2O$) (Dinâmica) e 5,0000 g de tartarato de sódio ($Na_2C_4H_4O_6$.) (Seelze) aferidas para um balão volumétrico de 1 L. Já o tampão fosfato foi preprado dissolvendo 13,61g de fosfato de potássio $KH_2PO_4$ (Labsynth) e 4 g de hidróxido de sódio NaOH (Labsynth).em água e diluídos em balões de 1 L. Na sequência 1 L de $KH_2PO_4$ foi misturado a 500 mL de NaOH sobre agitação de uma barra magnética ao mesmo tempo que o seu pH foi ajustado para 6,9.

### 3.1.3 Equipamento e material

Para o preparo dos bioprecursores foi utilizado um miniprocessador modelo: HC31X 220V 100W, CHN. A síntese dos PQCs foi realizada empregando um uma autoclave construída em aço inoxidável com um copo interno e tampa confeccionados em teflon, possuindo um volume máximo de 100 mL. O aquecimento foi realizado em um forno tipo mufla (EDG, modelo 7000). Para separar os PQCs do material particulado foi utilizado uma centrífuga compacta HERMLE, modelo Z206A, com velocidade máxima de rotação de 6000 rpm. Para a secagem dos PQCs, foi empregado uma estufa modelo: Sterilifer ajustada à temperatura de 80°C.

Com o intuito de investigar os possíveis grupos funcionais presentes nas nanopartículas de carbono, foram registrados espectros de FTIR empregando um espectrofotômetro Shimadzu, modelo IR Prestige-21. Para conhecer a estrutura, cristalizada ou amorfa, dos PQCs mediu-se os ângulos e as intensidades da difração das nanopartículas pelo movimento do detector em diferentes ângulos por meio da Difração de raio X (DRX) em equipamento Shimadzu, modelo DRX 6000. Tais equipamentos estavam disponíveis no Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM)/DQ/UFPB.

A fim de investigar as propriedades ópticas dos PQCs, foram registrados espectros de fluorescência molecular empregando um espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse Agilent, modelo G9800A, equipado com uma cubeta de quartzo com dimensões de 1 x 0,2 x 3,5cm e capacidade para 500 µL de volume,

com fendas de emissão e excitação na largura de 10nm de caminho óptico, disponível no LEQA/DQ/UFPB. Os espectros de absorção molecular foram registrados empregado um espectrofotômetro UV-Vis da Hewlett-Packard (HP), modelo 8453, equipado com uma cubeta de quartzo com 10 mm de caminho óptico.

Foi empregado um espectrofluorímetro portátil da Ocean Optics, modelo USB4000 para medidas dos espectros de fluorescência no sistema flow-batch proposto. Como fonte de emissão de radiação, foi empregado um LED ultravioleta, com emissão máxima em 365 nm.

Além disso, a balança analítica empregada para todas as pesagens foi a Shimadzu modelo Ay 220. Com a finalidade de medir o pH da solução tampão foi utilizado um pHmetro da Metrohm, modelo 713.

## 3.2 Bioprecursores de carbono

Os PQCs foram sintetizados pelo método hidrotérmico a partir dos bioprecursores nordestinos: a palma (*Opuntia ficus indica*), o mandacaru (*Cereus jamacaru*) e o xiquexique (*Pilosocereus gounellei*).

### 3.2.1 Agentes funcionalizantes

A literatura reporta que o uso de funcionalizantes que contenham nitrogênio em sua composição química favorece a síntese de um PQC estável e que apresente eficiência em sua fluorescência, como também um rendimento quântico mais satisfatório (Xu et. al, 2013).

Dessa forma, foram utilizados três agentes funcionalizantes, tampão amoniacal, etanolamina (Sigma) e polietilenoglicol (Sigma), com a finalidade de encontrar o que obtivesse melhor resposta com o analito, atrelado a um rendimento quântico de fluorescência.

O tampão amoniacal foi preparado utilizando 12,82g de cloreto de amônio ($NH_4Cl$) (Sigma) e 114mL de hidróxido de amônio (NaOH) (Labsynth) P.A sendo adicionado água até chegar a 200 mL. O pH foi ajustado 10,46 utilizando NaOH (0,1 mol. $L^{-1}$).

### 3.2.3 Procedimento de síntese, funcionalização e purificação dos PQCs

Foram retirados os espinhos dos bioprecursores, em seguida pesadas 100g de cada (palma, xiquexique e mandacaru) e a massa de cactácea foi microprocessada utilizando 100 mL de água ultrapura. Em seguida filtrada com papel filtro qualitativo (JProlabQualy) e quantitativo (tarja azul, JP42 Quanty) para então ser armazenado em frasco âmbar e conservado a 4º C em refrigerador. Na sequência, 40 mL do suco de palma, xiquexique e mandacaru, um por vez, foi adicionado à 10mL de tampão amoníaco e transferido para uma autoclave que permaneceu em uma mufla durante 6 horas à 180°C.

Foram preparados mais dois novos PQCs com o uso do bioprecursor xiquexique, um com 800 µL de polietilenoglicol e outro com 3 mL de etanolamina. A cada funcionalizante foi acrescido 30 mL do suco de xiquexique, preparado de forma semelhante à citada, completo com água ultrapura até 40 mL. A mistura foi colocada na autoclave e em seguida mantida na mufla por 8h à 200°C.

O procedimento de síntese é esquematizado conforme indicado na **Figura 3.1**.

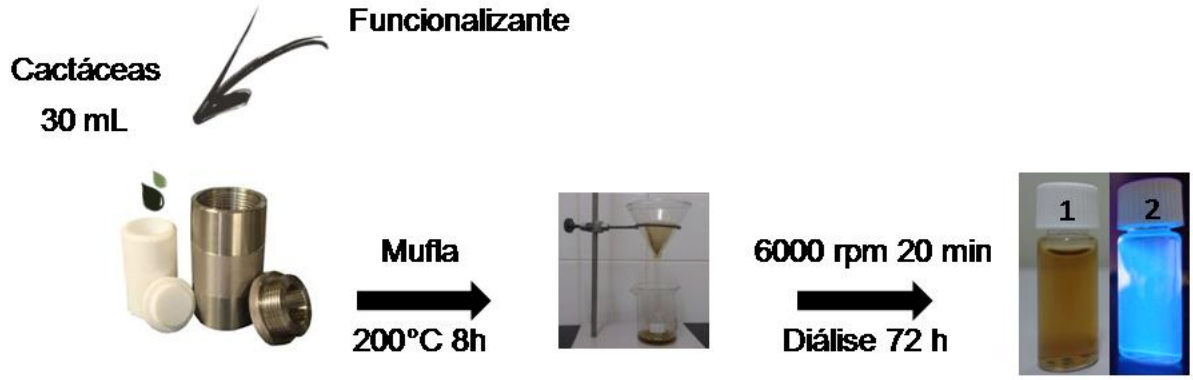



**Figura 3.1**.- Esquema ilustrativo da síntese hidrotérmica dos PQCs a partir do suco das cactáceas xiquexique,mandacaru e palma onde os PQCs estão sob a (1) luz visível e (2) sob luz ultravioleta.

Em todas as sínteses, a solução obtida de cor castanha escura foi arrefecida até a temperatura ambiente, posteriormente filtrada em papel quantitativo e centrifugada por 20 min a 6000 rpm. Na sequência a solução foi dialisada, utilizando um kit de diálise (PURG10015, SIGMA) com tamanho dos poros de 1.000 Dalton, em água ultrapura sob agitação constante, durante o período de 72 horas, para remoção do material não fluorescente. A água ultrapura foi substituída regularmente.

Em seguida, o líquido castanho purificado foi recolhido e armazenado em frasco âmbar a temperatura de 4º C para posterior utilização nas análises.

## 3.3 Rendimento Quântico

O procedimento do método consiste em registrar os espectros de fluorescência e absorção dos PQCs e do padrão de referência, no mesmo comprimento de onda que foi utilizado para fazer as excitações nas medidas de fluorescência. Em todos os casos foi utilizado 320nm (Wang et al., 2015). O sulfato de quinina (Acros) em 0,1 mol $L^{-1}$ $H_2SO_4$ ($\phi_r$ = 0,54) foi empregado como fluoróforo de referência. Foram medidas no mínimo quatro valores de absorbâncias diferentes na faixa de 0,003 a 0,05, a fim de minimizar os efeitos de filtro internos. Como é uma relação linear, foi plotado um gráfico da área integrada de fluorescência versus absorbância e com os pontos obtidos foi feito um ajuste linear dos dados (Brower et al., 2011).

O rendimento quântico foi então calculado conformeequação 1:

$$\phi = \phi_r \, (Grad / Gradr) \, (\eta / \eta r)^2 \qquad (1)$$

Onde Grad é a inclinação da curva, η é o índice de refração do solvente (1,33 para a água) e o subíndice "r" refere-se a o sulfato de quinina (Tian et al., 2017).

## 3.4. Determinação de taninos em chás

### 3.4.1. Método de referência

O método de tartarato ferroso ou método Japonês oficial foi realizado como descrito por Iwasa e colaboradores (1962). As soluções padrão de 5 a 30mg $L^{-1}$ de ácido tânico foram preparadas adicionando-se volumes apropriados da solução estoque de 100mg $L^{-1}$ em um balão de 100 mL completado o volume com água. Para a construção da curva analítica acrescentou-se 10 mL da solução de ácido tânico 10 mL de solução de tartarato ferroso. Em seguida, 50 mL de tampão fosfato pH 6,9 foi adicionado água até completar os 100 mL do balão volumétrico. A solução de ácido tânico foi substituída por água para composição do branco.

## 3.5 Desenvolvimento do sistema flow-batch

O sistema flow-batch proposto é composto pelos seguintes equipamentos e componentes: um câmara de mistura ou reacional; um agitador magnético IKA Lab disc; uma bomba peristáltica; tubos de bombeamento dos fluidos; cinco válvulas solenoides de três vias; acionador de válvulas; interface USB 6009 da NationalInstruments®; LED ultravioleta, com emissão máxima em 370 nm; dissipador, espectrofluorímetro USB 4000 da OceanOptics e um notebook.

Na **Figura 3.2b** é mostrada uma fotografia do analisador automático flow-batch montado, com descrição de seus componentes especificados e comentados na sequência.

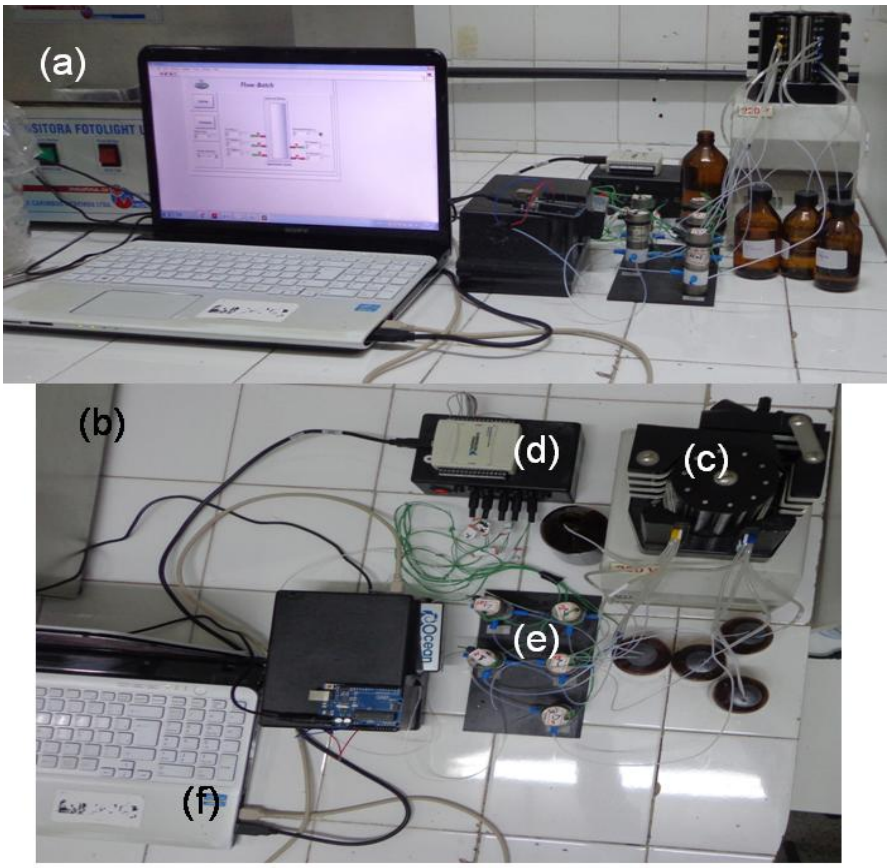



**Figura 3.2 -** (a.) Fotografia do sistema automático em fluxo-batelada utilizado e (b) Detalhes do sistema vis(c) bomba peristáltica, (d) acionador e interface, (e) válvulas solenoides, e (f) notebook.

A câmara de mistura (CM) fabricada em formato cilíndrico com um volume interno de 2 mL aproximadamente, utilizando como matéria - prima o politetrafluoretileno comercialmente denominado Teflon®, contém quatro canais de

entrada, um canal de saída três janelas de quartzo. Dessas janelas de quartzo, duas foram usadas no posicionamento do espectrofluorímetro portátil e do LED ultravioleta (posicionados em ângulos de 90 graus), empregados, respectivamente, para a detecção e excitação no decorrer da análise. A parte interior da câmara atua como um reservatório onde há a adição dos reagentes e padrão ou amostra, que tem como intuito homogeneizar os fluidos e colaborar na dispersão das nanopartículas, detecção e descarte da solução de interesse. Para promover a mistura das soluções foi alocada na CM uma barra magnética (5 mm) onde sua rotação foi realizada por meio de um agitador magnético, utilizando uma velocidade de rotação alta, sem que houvesse influencia na repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados.

Foram empregadas uma bomba peristáltica Gilson®, (modelo miniplus 3) equipada com 8 canais, atrelada a cinco válvulas solenoides three-way da Cole Parmer® (modelo EW-01540-13) e tubos de bombeamento de Teflon® e Tygon®

No que se refere ao acionamento (abertura e fechamento) das válvulas solenoides foi construído um acionador de válvulas. O acionador tem como base um circuito integrado ULN2803, fabricado pela Toshiba, que é um arranjo de oito transistores do tipo Darlington, adequados para tolerar alta tensão e corrente. O uso desse dispositivo torna possível o controle independente ou simultâneo, de até 8 portas de saída.

Na **Figura 3.3** é mostrado um diagrama esquemático do circuito eletrônico do acionador assim como sua comunicação com as válvulas solenoides, e a interface NI USB-6009, da National Instruments®.

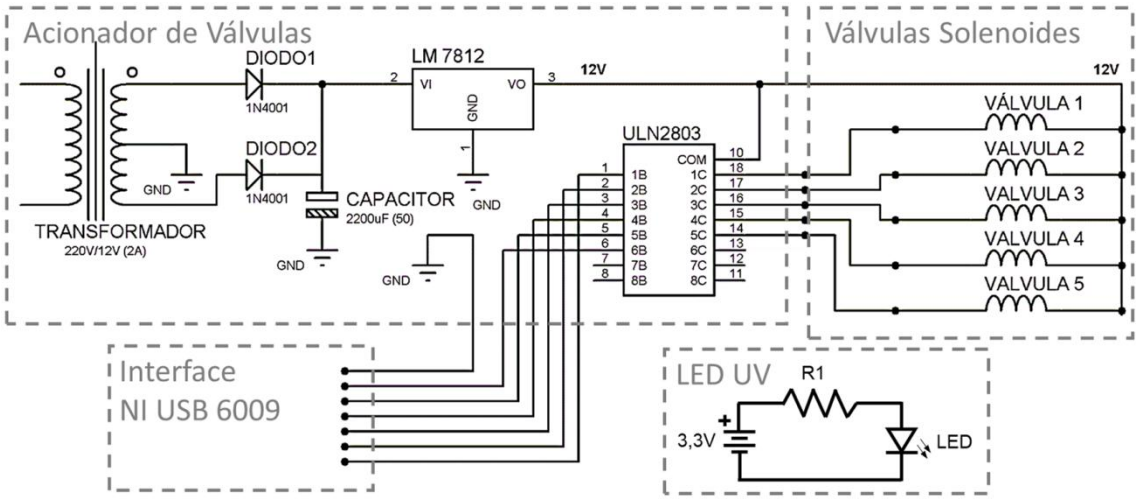



**Figura 3.3 - C**ircuito eletrônico do acionador de válvulas solenoides, agitador magnético e de alimentação do LED-UV.

Como fonte de alimentação para as válvulas solenoides foi utilizada uma tensão de 12V e seu acionamento é realizado pelo circuito integradoULN2803, quando recebe uma tensão superior a 3,8V em uma de suas8 portas de entrada, dessa forma uma corrente de 150 mA é gerada em cada porta de saída, onde as válvulas estão conectadas. As portas digitais da interface são diretamente conectadas às portas de entrada do ULN2803 presente no acionador de válvulas.

Na detecção dos espectros de emissão de fluorescência foi utilizado um instrumento espectrofluorímetro portátil da OceanOptics, modelo USB 4000. O instrumento foi posicionado em frente a uma das janelas de quartzo da câmara de mistura, como mostra a **Figura 3.5**. Com o propósito de impedir a influência da luz do ambiente, a câmara de mistura, o espectrofluorímetro portátil e o LED ultravioleta, foram colocadas dentro de uma caixa de dimensões 10 × 12 × 15 cm.

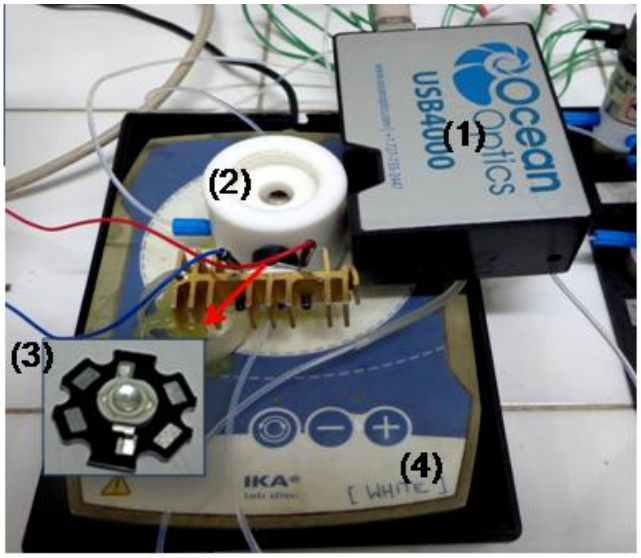



**Figura 3.4 -** Detalhes do sistema de detecção do flow-batch, (1) espectrofluorímetro portátil, (2) câmara de mistura, (3) LED-UV e (4) agitador magnético.

Um LED ultravioleta de alta potência (modelo LTPL-C034UVH370) foi empregado como fonte de excitação em 370 nm durante as medidas de fluorescência. O LED foi posicionado em uma das janelas de quartzo da CM, de uma maneira que pudesse obter um ângulo de 90° com o instrumento de detecção da fluorescência emitida. Devido à alta capacidade térmica do LED, foi empregado um dissipador para garantir a integridade dos equipamentos que estavam dentro da caixa. A **Figura 3.6** mostra o espectro de emissão do LED, registrado com o espectrofluorímetro portátil.

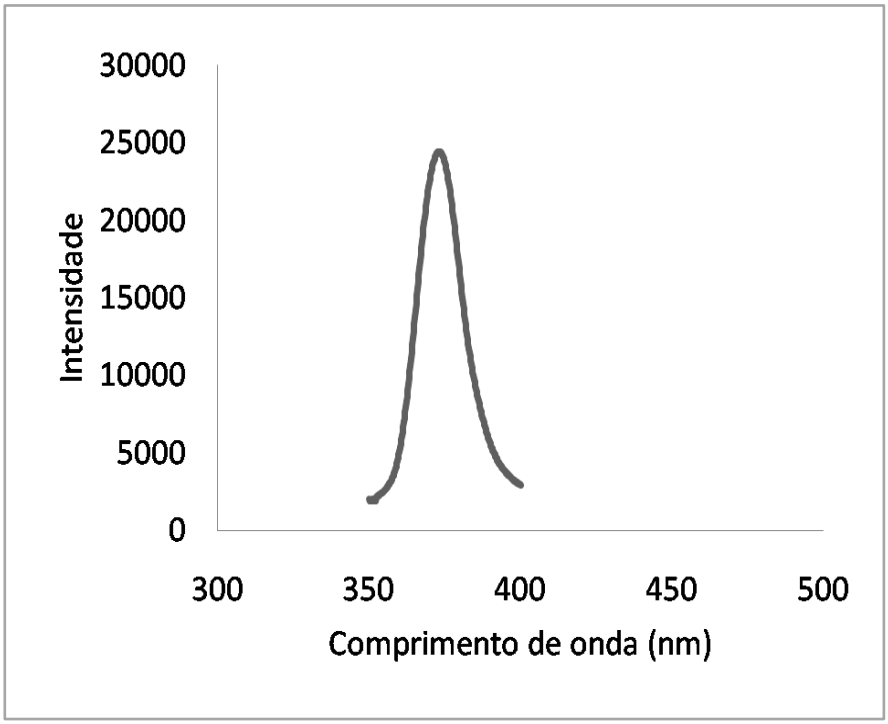



**Figura 3.5 -** Espectro de emissão do LED ultravioleta utilizado para montagem do fluorímetro com emissão máxima de 370nm

### 3.5.1. Desenvolvimento do software de controle

A interface dos programas para o controle e gerenciamento automático do tempo das válvulas e para aquisição dos espectros de fluorescência são mostradas na **Figura 3.6**.

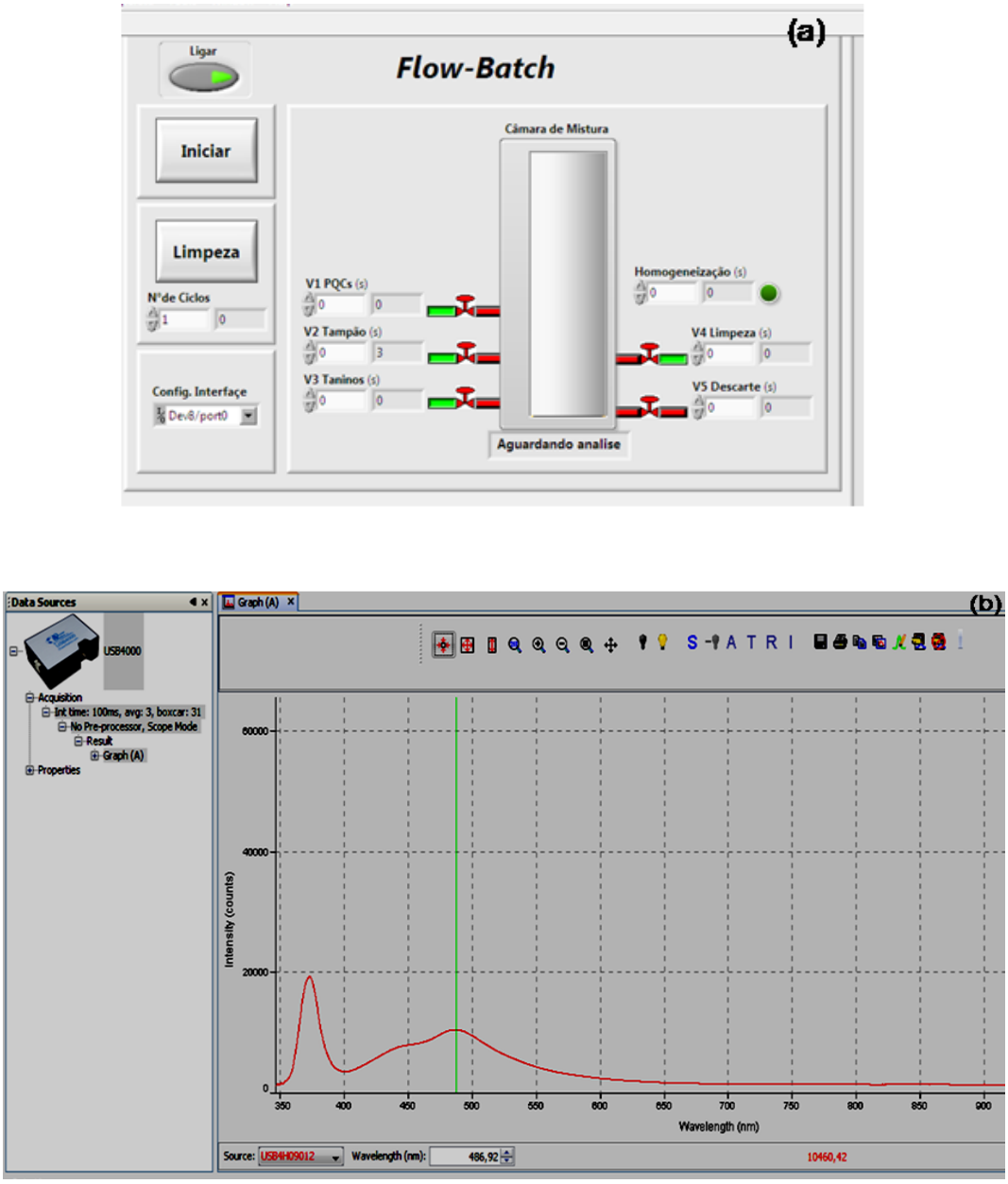



**Figura 3.6 -** (a) Interface de controle do FBA e (b) interface do programa SpectraSuite da Ocean Optics utilizado para aquisição e captura do espectro.

O programa de gerenciamento do FBA (**figura 3.6 (a)** apresenta interface gráfica para administração do usuário, desenvolvida em ambiente de programação LabVIEW 2013. A gerência do software de controle é bastante compreensível, e encontra-se dividida conforme os procedimentos a ele atribuídos para adição, limpeza da câmara e descarte do produto.

O acionamento das válvulas é administrado de acordo com a necessidade da análise (branco, padrões e amostras) e é dependente do tempo, que deve ser

inserido em segundos pelo usuário. O sistema também permite o controle da etapa de limpeza e descartes das soluções.

O registro e armazemanento dos espectros de fluorescência são realizados utilizando o programa SpectraSuite da Ocean Optics, apresentado na **figura 3.6 (b)**.

### 3.5.2 Precisão das válvulas solenoides

O estudo da vazão, razão entre a média do volume e tempo de acionamento das válvulas solenóides faz-se necessário para descobrir tal relação. Sendo assim, a vazão em cada linha de fluxo foi estudada com os tempos de 1 a 7 segundos usando as rotações da bomba de 18, 30 e 48 rpm para cada válvula, a vazão foi determinada pelos volumes de água destilada coletados e medidos em massa numa balança analítica.

O programa de gerenciamento desenvolvido em LabVIEW apresenta umainterface (**figura 3.7**) que permite que este processo seja realizado com maior destreza. Na interface do programa é possível configurar o acionamento de cada válvula e o tempo de abertura de forma independente.

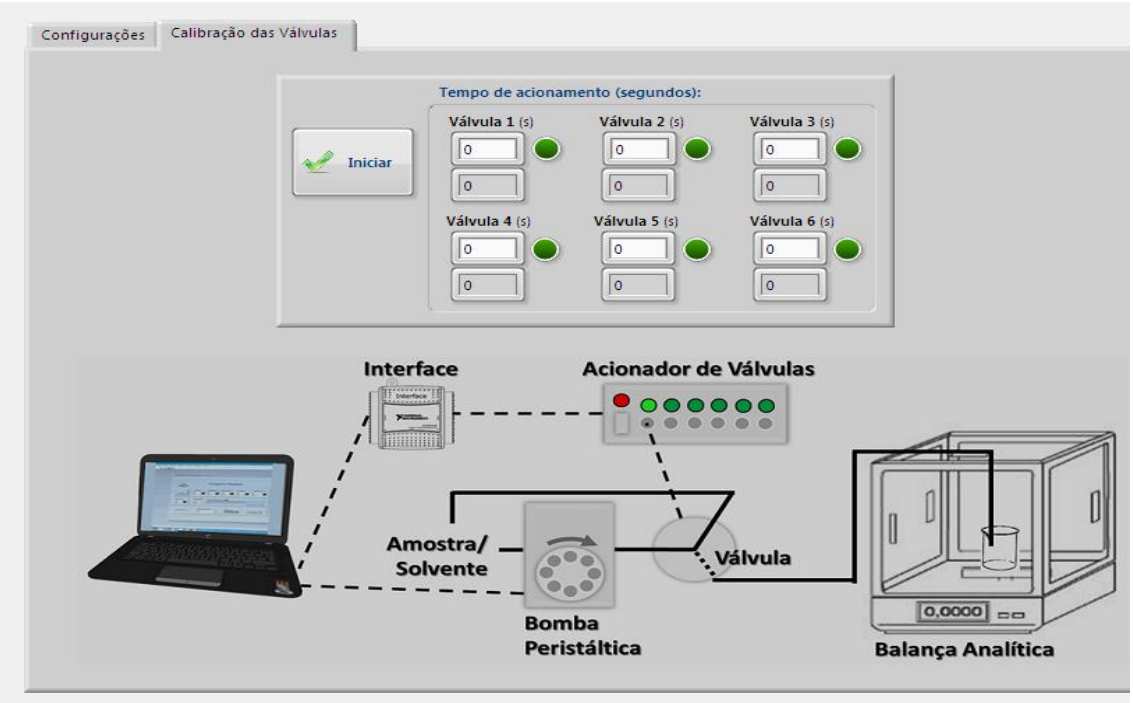



**Figura 3.7**– Interface do programa para realizar o estudo de calibração das válvulas solenoides.

## 3.6 Procedimento automático

O preenchimento dos canais é previamente realizado antes de se iniciar qualquer procedimento analítico. Dessa forma, as válvulas de V1 a V4 são acionadas, uma por vez, e as soluções referentes são bombeadas em direção à câmara de mistura (CM), preenchendo todos os canais localizados entre as válvulas e a câmara. Na sequência o descarte é acionado por 20 s e a CM é esvaziada por aspiração.

O arranjo físico do sistema flow-batch esteve inalterado durante todo o processo analítico aplicado na determinação de taninos. A f**igura 3.8** mostra o diagrama esquemático do sistema proposto.

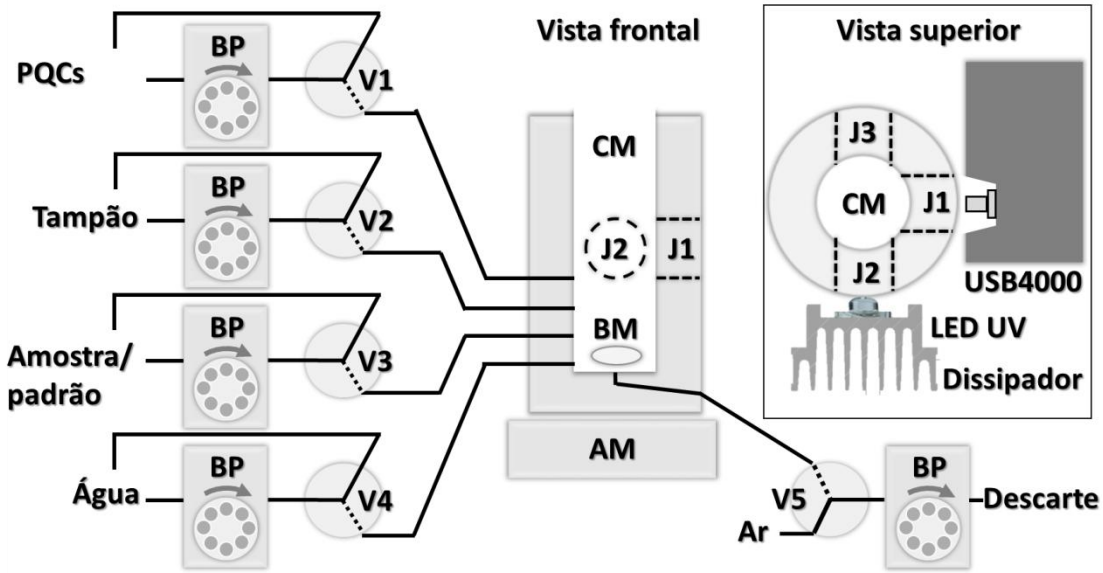



**Figura 3.8**: – Diagrama esquemático do sistema automático em fluxo-batelada proposto. BP: canais da bomba peristáltica, V: válvulas solenoides, CM: câmara de mistura, J: Janelas de quartzo; AM: agitador magnético, BM: barra magnética.

Os PQCs, tampão, padrão ou amostra e água são acrescentados por acionamento das válvulas V1 a V4,nessa ordem, na câmara de mistura. Em seguida, são homogeneizados por 5 s, e é realizado o armazenamento do espectro de fluorescência.Na sequência a válvula V5 é acionada por 5 s para descarte das soluções.

Para o procedimento de limpeza da câmarade mistura a válvula (V4) é acionada, adicionando a água na câmara de mistura. Por conseguinte, a válvula de descarte (V5) é acionada retirando o fluído da CM. Tal procedimento de limpeza e

descarte foi realizado três vezes para uma limpeza apropriada da CM evitando intercontaminação da amostra e efeito de memória.

A tabela 3.1 apresenta, em resumo, as etapas do procedimento automático para análise do padrão/amostras com seu respectivo tempo de acionamento das válvulas solenóides e volume das soluções. As válvulas V1 (PQC) e V2 (tampão) permanecem com os seus tempos e volumes inalterados durante a construção da curva analítica contudo as válvulas do padrão (V3) e água (V4) são modificadas para que a diluição on-line do padrão seja realizado.

**Tabela 3.1** – Etapas do procedimento automático para análise do padrão/amostras.

| Etapa | Descrição | Tempo (s) | Volume (µL) |
|---|---|---|---|
| 1 | Adição do PQC | 2,85 | 250 |
| 2 | Adição do tampão | 3,42 | 300 |
| 3 | Adição do padrão/amostra | 0,91-13,69[b]/0,61[c] | 72-1.080[b]/48c |
| 4 | Adição de água | 2,02-13,99[b]/14,28[c] | 170-1.178[b]/1.202[c] |
| 5 | Homogeneização | 5 | - |
| 6 | Aquisição e armazenamento dos espectros | 5 | - |
| 7 | Descarte | 22,80 | 1.800 |
| 8[a] | Adição de água para limpeza | 22,80 | 1.800 |
| 9[a] | Descarte | 22,80 | 1.800 |

[a] Procedimento realizado em triplicata.[b] adição de padrão. [c] adição das amostras.

A solução do branco é preparada na CM com o acionamento das válvulas V1, V2 e V4, nessa sequência são adicionados 250 µL de PQC, 300 µL de tampão e 1.250 µL de água. Após a homogeneização o espectro de emissão de fluorescência é então capturado empregando o espectrofluorímetro portátil na detecção.

## 3.7 Avaliação do desempenho analítico

Quando se propõe um novo método analítico, é necessário considerar a diferença ente a execução de experimentos que determinam diversos parâmetros e a validação. Essa tem como propósito avaliar a relação entre os resultados experimentais e os parâmetros estatísticos que o método deve satisfazer (Brito et. al 2003).

### 3.7.1 Linearidade

Linearidade é a capacidade do método em originar resultados proporcionais à concentração do analito de interesse, enquadrados em faixa analítica especificada.

A faixa de trabalho linear da curva de calibração deve, necessariamente, contemplar a faixa de concentração esperada para a amostra de ensaio. Sempre que possível, o valor esperado para a amostra de ensaio deve se situar em torno do centro da curva de calibração.

### 3.7.2 Sensibilidade

A sensibilidade é a habilidade do método em discriminar, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Sendo assim, ela pode ser expressa através da equação a seguir:

$$\boldsymbol{S = \frac{d_x}{d_c}}$$

Sendo $d$ um infinitésimo da variação para o sinal analítico que corresponde a $x$, e da concentração, nesse caso $c$ .

De modo simplificado tem se que a sensibilidade é definida como a inclinação da curva analítica, ou seja, o coeficiente angular do gráfico analítico. Método escolhido nesse trabalho. Em métodos sensíveis, uma pequena alteração na concentração do analito ocasiona grande variação no valor do sinal analítico medido. Esse critério expressa a aptidão do processo analítico originar variação no valor da propriedade monitorada ou medida, causada por pequeno acréscimo na concentração ou quantidade do analito. (Amarante Jr et. al, 2001).

### 3.7.3 Precisão

O processo analítico é considerado preciso quando os valores entre várias medidas efetuadas na mesma amostra estão próximos. A precisão é a medida da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas.

As características de desempenho para a precisão incluem desvio padrão amostral, desvio padrão-relativo, coeficiente de variação e variância.Tais termos estão definidos na tabela 3.2.

**Tabela 3.2**:Parâmetros de desempenho para a precisão de métodos analíticos

| Termos | Definição |
|---|---|
| **Desvio-parão amostral, *s*** | $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N}(x_1 - \bar{x})^2}{N-1}}$ |
| **Desvio padrão relativo percentual (DPR%)** | $DPR\% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$ |
| **Desvio padrão da média, $S_m$** | $s_m = {}^{s}/_{\sqrt{N}}$ |
| **Variância** | $s^2$ |

Onde $\bar{x}$ é a média de N medidas

### 3.7.4 Exatidão

A exatidão é definida como a concordância entre o valor estimado pelo processo analítico e o valor fornecido por um método de referência, comumente de maior precisão, sendo parte crucial para o propósito da validação.

O experimento de recuperação é o método mais utilizado para validação da exatidão dos resultados. A recuperação está atrelada a exatidão, pois determina a veracidade ao refletir a quantidade de um determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. Quando a recuperação é obtida a partir de fortificação de matriz branca, o fator de recuperação é calculado através da equação:

$$Recuperação = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3}\right) \times 100\%$$

Onde $C_1$: concentração medida após a fortificação da matriz branca; $C_2$ : a concentração medida na matriz branca não fortificada e $C_3$ é a concetração do analito puro adiocionado a matriz branca.

A exatidão também pode ser estabelecida mediante a comparação entre os valores obtidos pelo método proposto com os valores obtidos para as mesmas amostras com outro método validado ou método de referência.

### 3.7.5 Teste *t* pareado

O teste *t* pareado tem sua implementação baseada no conceito de intervalo de confiança, e estabelece o cálculo da média das diferenças entre os valores de concentração, obtidos por dois métodos distintos, para cada par de resultados.

Sendo Δ a diferença média verdadeira entre os resultados dos dois métodos, o intervalo de confiança para Δ é encontrado utiliizando a seguinte equação:

$$\Delta = \bar{d} \pm t_v \frac{s_d}{\sqrt{n}}$$

Onde: *n* é o número de amostras, $S_d$ é o desvio padrão da média das diferenças e $t_v$ é o ponto de distribuição t correspondente ao número de graus de liberdade (v) no nível de confiança desejado (Neto et al., 2010).

O intervalo de confiança pode ser interpretado da seguinte maneira:

Para que não haja há diferença sistemática significativa entre os resultados dos dois métodos o valor "zero" deve estar contido dentro do intervalo construído. Diante disso, a hipótese nula não pode ser rejeitada e a média das diferenças (d) deve ser um ponto da distribuição t com Δ = 0. Caso contrário, existe uma diferença sistemática significativa entre os resultados dos métodos ao nível adotado de confiança estatística.

### 3.7.6 Limite de detecção e limite de quantificação

O Limite de Detecção (LOD) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três vezes a razão sinal/ruído do equipamento. Sendo assim, a menor concentração da espécie de interesse que pode ser detectada pela técnica instrumental, enquanto o Limitede de Quantificação (LOQ) do procedimento é definido como o nível mais baixo de concentração no qual foi demonstrado que os critéerios de veracidade e precisão foram atendidos, desde que a relação sina/ruído seja superior a seis.

Os limites de detecção e quantificação podem ser, respectivamente, expressos abaixo:

$$LOD = \frac{3 \times s}{S}$$

$$LOQ = \frac{10 \times s}{S}$$

Onde *s* = desvio padrão da resposta; *S*= o coeficiente angular do gráfico de calibração (sensibilidade do aparelho)

### 3.7.7 Análise de variância

A qualidade do ajuste de um modelo é usualmente avaliado pelo método de Análise da Variância, muitas vezes conhecida pelo acrônimo ANOVA. É preciso referir que a curva analítica apenas pode ser empregada para estimar a concentração do analito se tiver a capacidade de descrever o comportamento dos valores experimentais de modo satisfatório.

.As equações referentes estão dispostas na **tabela 3.3** a seguir:

**Tabela 3.3**– Equações para análise de variância (ANOVA) (adaptado de Barros Neto et.al, 2001)

| Fonte de variação | Soma quadrática $(SQ)$ | Graus de liberdade | Média quadrática $(MQ)$ |
|---|---|---|---|
| **Regressão** | $SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{ni} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$ | $p-1$ | $MQ_R = \frac{SQ_R}{p-1}$ |
| **Resíduos** | $SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{ni} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$ | $n-p$ | $MQ_r = \frac{SQ_r}{n-p}$ |
| **Falta de ajuste** | $SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{ni} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$ | $m-p$ | $MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m-p}$ |
| **Erro puro** | $SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{ni} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$ | $n-m$ | $MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n-m}$ |
| **Total** | $SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{ni} (y_{ij} - \bar{y})^2$ | $n-1$ | |

Num modelo bem ajustado os desvios dos valores previstos $(\hat{y}_i)$ pelo modelo são semelhantes aos desvios dos valores observados $(y_{ij})$, ambos em relação à média $(\bar{y})$, As somas de quadrados de desvios costumam ser chamadas de somas quadráticas, ou, abreviadamente, $SQ$.

O teste de falta de ajuste confronta, para os vários níveis da variável x, a média quadrática da falta de ajuste (MQfaj) com a média quadrática devida ao erro puro (MQep). Portanto, se a razão (MQfaj)/(MQep) for menor que o valor do ponto de distribuição *F*, relativos aos graus de liberdade de MQfaj e MQep e para um nível de 95% de confiança, temos um modelo sem falta de ajuste. Sendo assim, as duas médias quadráticas refletirão apenas os erros aleatórios associado aos dados.

A comparação da razão entre a média quadrática devido à regressão (MQreg) e a média quadrática residual (MQr) com o valor do ponto da distribuição F correspondente em geral (95%) . Quando a referida razão for maior que o valor de *F*, conclui-se que a regressão é estatisticamente significativa.Do contrário, não se pode admitir a existência de uma relação funcional entre as variáveis que possa ser descrita pelo modelo seja ele linear, quadrática, polinomial, etc.

Para que o modelo construído seja satisfatório os resíduos devem se distribuir aleatoriamente em torno de zero, assim teremos apenas erros aleatórios associados aos dados experimentais. No gráfico de resíduos é possível identificar o tipo de erro experimental associado aos dados experimentais.

Há casos que embora a distribuição continue aleatória pode-se perceber claramente que os resíduos crescem com o valor da concentração indicando a presença de heterocedasticidade (Pimentel, 1997).

No entanto se os resíduos apresentarem algum perfil ou estrutura teremos um erro sistemático relacionado aos dados experimentais, na análise do gráfico dos resíduos averiguamos o comportamento dos erros de previsão do modelo (resíduos) em analogia aos dados experimentais

# Capítulo 4

# Resultados e Discussão

## 4.1 Síntese e caracterização dos pontos quânticos de carbono

### 4.1.1 Otimização da síntese dos PQCs

Na síntese dos PQCs por meio da síntese hidrotérmica foram escolhidos os bioprecursores regionais mandacaru, palma e xiquexique . Para isso, foi usado como funcionalizante o hidróxido de amônio (AM-PQCs) empregando as mesmas condições de temperatura e tempo, com o intuito de estabelecer o melhor bioprecursor para a determinação do analito, visando também o rendimento quântico.

Uma vez que as propriedades fluorescentes são afetadas pelas condições do meio, um estudo da influência do pH em meio ácido, neutro e básico foi realizado com os diferentes bioprecursores Sendo assim, foi realizado o teste de pH para conhecer qual melhor se ajustava a supressão de fluorescência com a adição do ácido tânico **(Figura 4.1).**

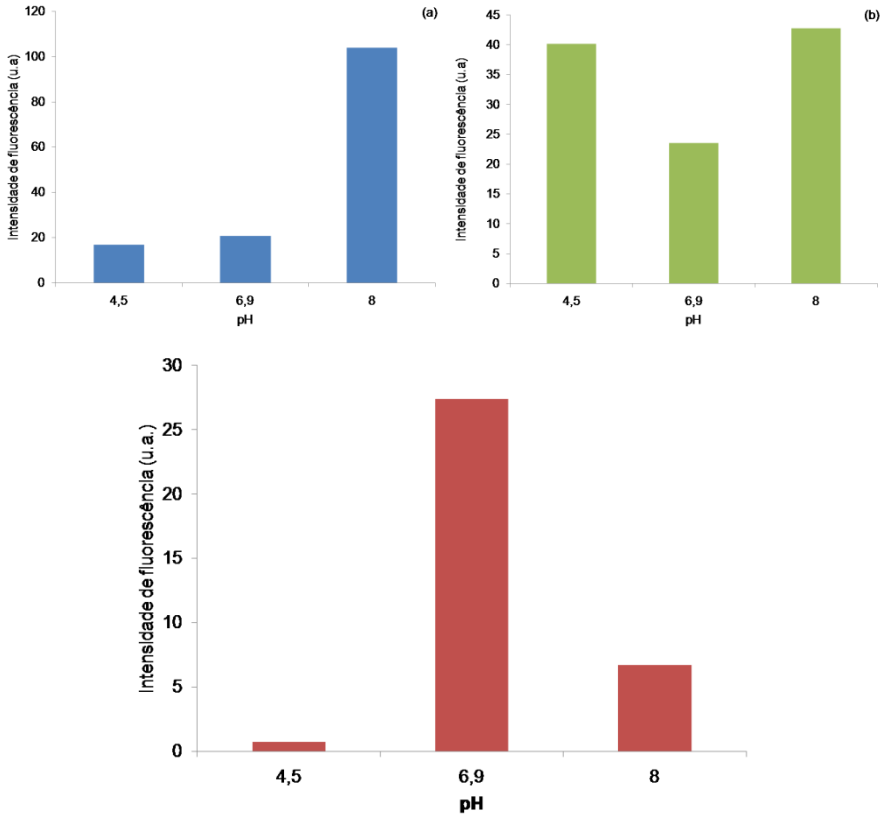



**Figura 4.1** - Teste de pH realizado nas cactáceas (a) xiquexique,(b) palma e (c) mandacaru na faixa de pH tampão fosfato entre 4,5 e 8,0.

Apartir do estudo da influência do pH do tampão fosfato foram escolhidos o pH 8 para construção da curva analítica do xiquexique e da palma e o pH 6,9 para o mandacaru.

Dessa forma, o xiquexique foi selecionado para a análise, visto que obteve uma resposta satisfatória na construção da curva analitica **(Figura 4.2)** com o ácido tânico em comparação com os outros bioprecursores analisados.

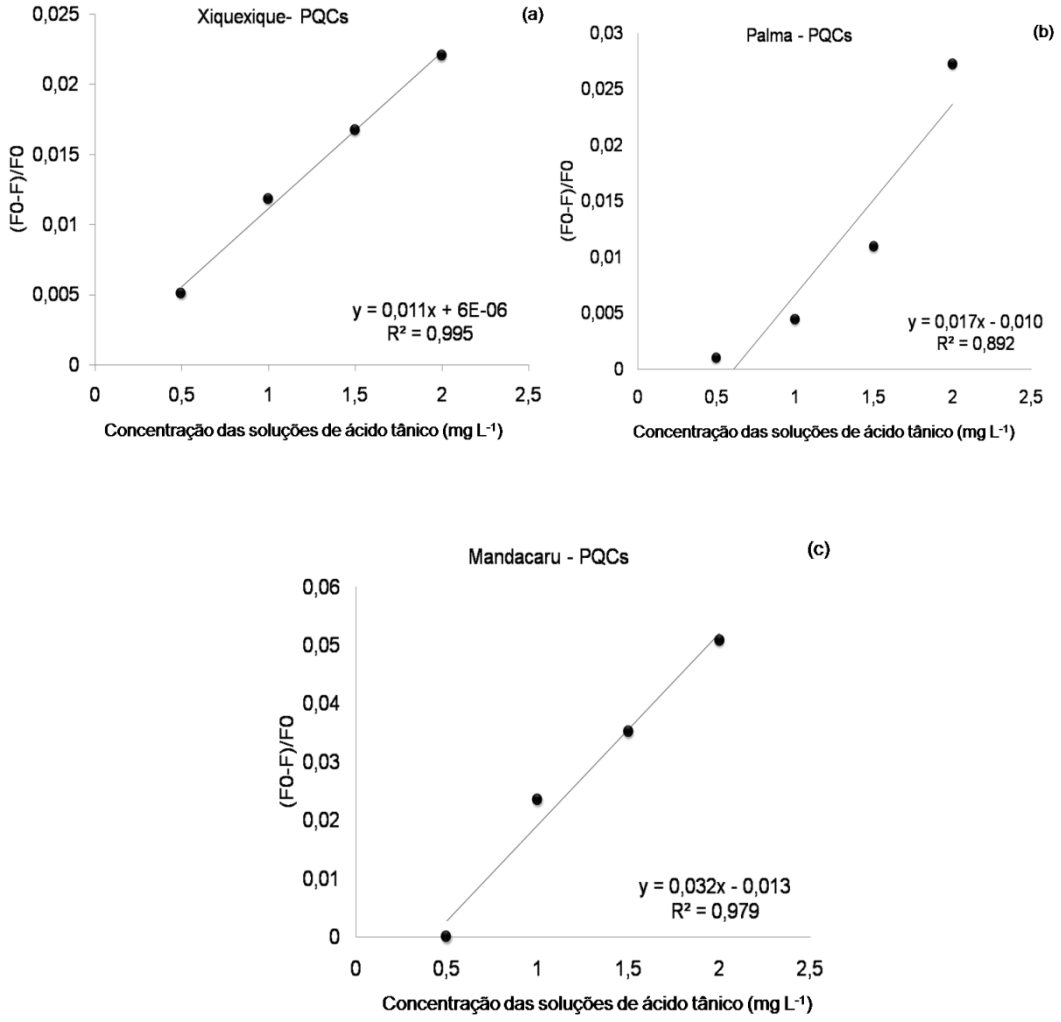



**Figura 4.2** –.Relação (F0-F)/F0 em função da concentração de taninos com o AM-PQCs para os bioprecursores xiquexique, palma , em pH 8 e mandacaru em pH 6,9.

### 4.1.2 Influência do funcionalizante e determinação do rendimento quântico

Definido o bioprecursor, duas novas sínteses foram feitas com o intuito de investigar o melhor rendimento quântico para os pontos quânticos de carbono. Os PQCs foram funcionalizados com polietilenoglicol (PEG-PQCs) e com etanolamina

(ET-PQCs), empregando mesmo processo de síntese via tratamento hidrotérmico do suco de xiquexique sendo mantido constante o tempo de síntese em 8 horas e a temperatura de 200 °C.

As sínteses de carbonização geralmente produzem PQCs na coloração amarelo castanho e quando expostas a radiação ultravioleta, no comprimento de onda de 380nm apresentam uma fluorescência azul relativamente forte (Lecroy et. al, 2016). A **Figura 4.3** apresenta os aspectos coloridos, onde pode-se perceber que cada PQCs apresentam uma tonalidade diferente, refletindo então que o funcionalizante atrelado ao bioprecursor ocasiona emissões fluorescentes diferentes. observar que os AM–PQCs, PEG-PQCs e ET-PQCs após a síntese apresentam coloração semelhante contudo pela sua intensidade de fluorescência foram diluídos para não estourar o sinal do detector. **(Figura 4.3b)**

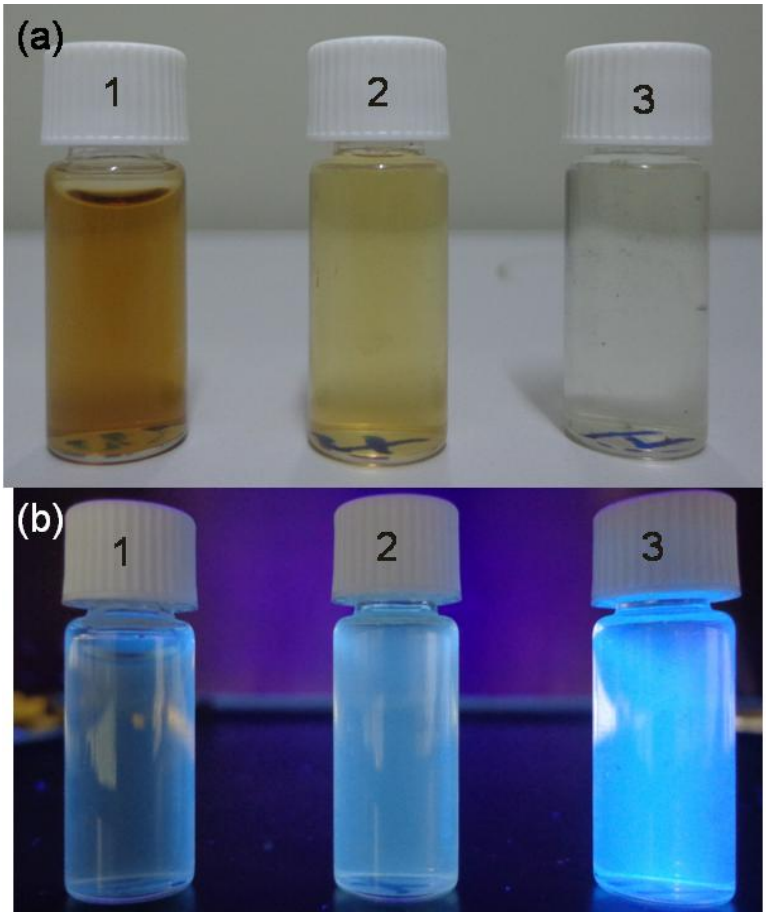



**Figura 4.3** –. Imagens dos PQCs, sintetizados com diferentes funcionalizantes (hidróxido de amônio, polietilenoglicol, etanolamina), sob 1 AM–PQCs, 2 PEG-PQCs e 3 ET-PQCs sob a (a) luz visível e sob a (b) ultravioleta.

A **Figura 4.4** exibe os espectros de absorção molecular dos PQCs nos diferentes funcionalizantes: AM–PQCs, PEG-PQCs e ET-PQCs. Pode-se observar

que o AM–PQCs e o ET-PQCs apresentam espectros com perfis semelhantes. O ET-PQCs exibiu um pico a 280 nm, que é atribuído a absorção típica para a transição n-π* de C=O ou N=O em regiões híbridas $sp^3$ (Dong et al 2014). Já o AM–PQCs apresentaram aparentemente o pico em aproximadamente 268nm que corresponde as transições π -π* provenientes da ligação N=O (Zheng et. al, 2017).

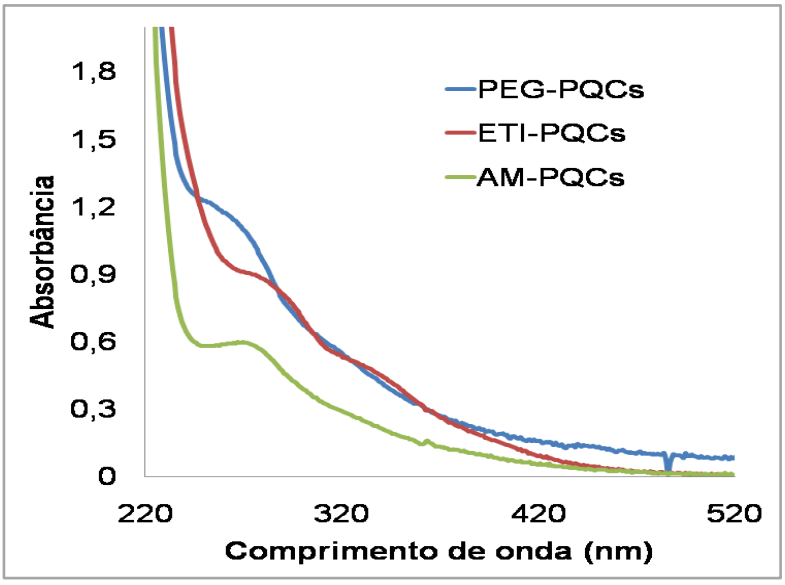



**Figura 4.4** –. Espectros de absorção molecular dos PQCs com diferentes funcionalizantes.

Para o espectro obtido para o PEG-PQCs, pode ser atribuído uma maior absorbância no comprimento de onda de 270 nm, representando uma transição aromática π - π* que é observado principalmente em grafeno de uma ou várias camadas (Alas et. al, 2017). A **Tabela 4.1** mostra as características de absorção resumidas.

**Tabela 4.1** –. Resumo das características de absorção dos PQCs: ET-PQCs, AM-PQCs e PEG-PQCs

| PQCs | Picos | Atribuição da absorção |
|---|---|---|
| ET-PQCs | 280 nm | Transição n-π* de C=O ou N=O em regiões híbridas $sp^3$ |
| AM–PQCs | 268nm | Transições π -π* provenientes da ligação N=O |
| PEG-PQCs | 270 nm | Transição aromática π - π* |

A **Figura 4.5** mostra os espectros de fluorescência do AM–PQCs e PEG-PQCs, ambos obtidos com o comprimento de onda de excitação 350 nm. Todavia, observa-se que a intensidade de FL do ET-PQCs excitado em 390nm apresenta maior intensidade quando comparado aos outros PQCs.

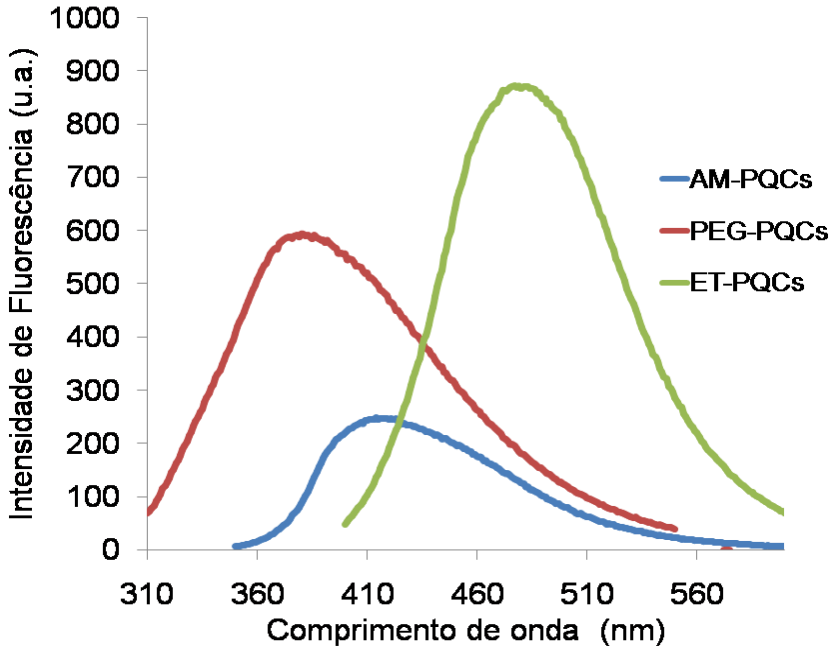



**Figura 4.5** –.Espectros de fluorescência dos AM–PQCs, PEG-PQCs e ET-PQCs.λ=300, 350 e 370 nm

Em relação ao rendimento quântico utilizando o sulfato de quinina como fluoróforo de referência, os PQCs obtiveram rendimentos quânticos de 3,41% (AM–PQCs), 3,65% (PEG-PQCs) e 18,32% (ET-PQCs). Portanto os ET-PQCs foram empregados na determinação de taninos por apresentarem um alto rendimento quântico e mostrarem uma forte emissão fluorecente, quando excitados com o comprimento de onda máximo de 376 nm.

### 4.1.3 Caracterização espectroscópica

Com intuito de analisar o comportamento de fluorescência dos PQCs, foi realizado o estudo para encontrar o comprimento de onda de excitação que permitisse obter uma maior intensidade de emissão de fluorescência dos PQCs. Nesse estudo, conforme apresentado na **Figura 4.6** pode-se visualizar os espectros de emissão de fluorescência dos PQCs com diferentes comprimentos de onda de

excitação (320 a 420nm). Os espectros de emissão dos ET-PQCs apresentaram um deslocamento da banda de fluorescência para a faixa de 400 nm a 480 nm, com o aumento do comprimento de onda de excitação. Esse desvio é acompanhado por uma diminuição significativa da intensidade de fluorescência, revelando que a fluorescência dos PQCs é fortemente dependente do comprimento de onda de excitação. A máxima intensidade de fluorescência dos ET-PQCs foi obtida em 450 nm quando excitados em 370 nm concordando com o comprimento de onda de emissão máximo do LED ultravioleta, eleito como a fonte de excitação dos PQCs.

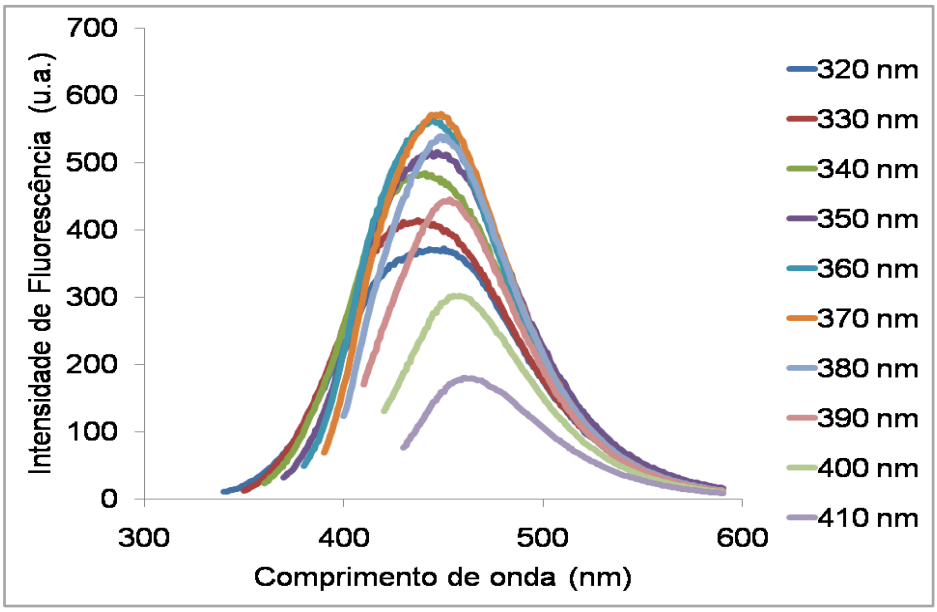



**Figura 4.6** –.Espectros de emissão de fluorescência dos ET-PQCs nos comprimentos de onda de excitação de 320nm a 420 nm.

Os espectros de excitação e de emissão de fluorescência dos ET-PQCs são apresentados na **Figura 4.7**. É possível notar que os ET-PQCs apresentaram um pico de excitação bem definido em torno de 370 nm, e um pico de emissão máxima em 490 nm.

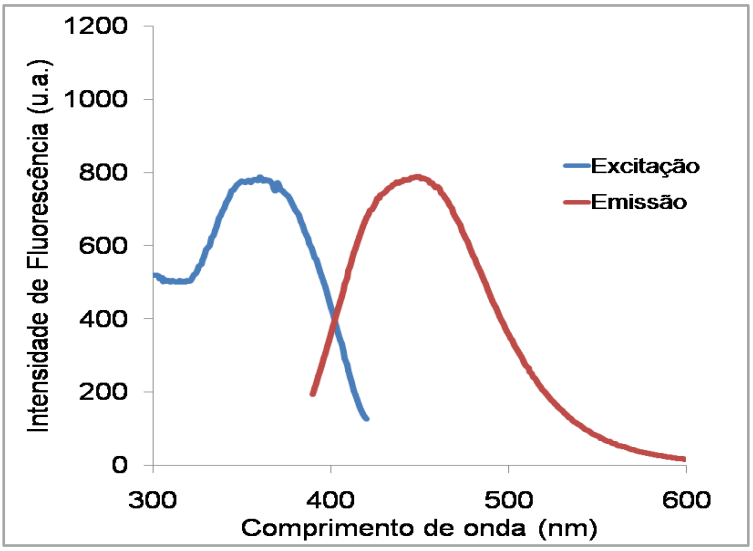



**Figura 4.7** –. Espectros de excitação e de emissão dos ET-PQCs.

### 4.1.4 Caracterização estrutural

A difração de raios X (DRX) fornece informações da fase de cristal da nanopartícula. A espectroscopia no infravermelho com transformada Fourier (FT-IR) é empregada para examinar os grupos funcionais presentes na superfície da nanopartícula sintetizada, e com a espectroscopia de fluorescência e UV-Vis, reconhecemos as propriedades ópticas das nanopartículas relacionando com o tamanho, forma, concentração, estabilidade e índice de refração.

O DRX padrão (**Figura 4.8**) apresenta um pico de difração amplo à cerca de 23,9° (2θ), correspondendo a um carbono amorfo  uma considerável moda aleatória e desordem do carbono do PQC (Han et al., 2016).

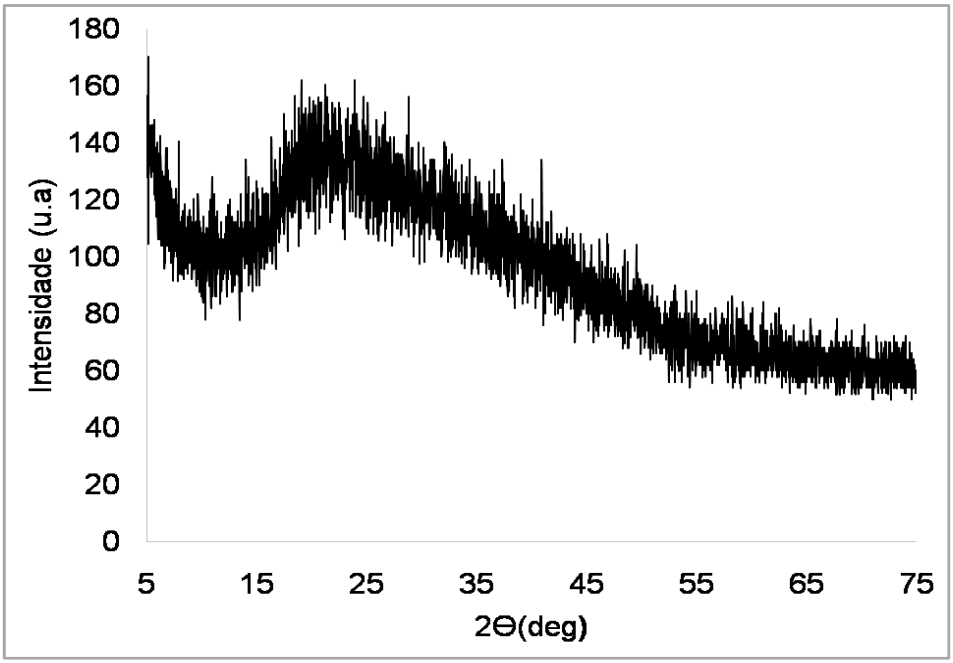



**Figura 4.8** –. Difratograma do ET-PQC.

Os grupos funcionais presentes na superfície dos pontos quânticos de carbono foram obtidos a partir do xiquexique e da etanolamina sendo estes identificados pela espectroscopia FTIR. O espectro FTIR (**Figura 4.9**) exibe bandas de absorção característicasde vibração simétrica do grupo $COO^-$ de e estiramento assimétrico em 1.400 $cm^{-1}$ e 1.606$cm^{-1}$ (Gu et al, 2016, Hsu et al., 2012). Mostra fortes picos de absorção em 3.410 $cm^{-1}$ devido ao grupo -OH (Kumar et al., 2017). As pequenas bandas largas de 1.050 $cm^{-1}$e 2.929$cm^{-1}$são originárias do estiramento de C-N e vibrações de estiramento do C-H respectivamente (Edison et al., 2016, Chen et al., 2016). A existência desses grupos funcionais confere aos PQCs uma excelente solubilidade em água sem a necessidade de qualquer tipo de modificação química.

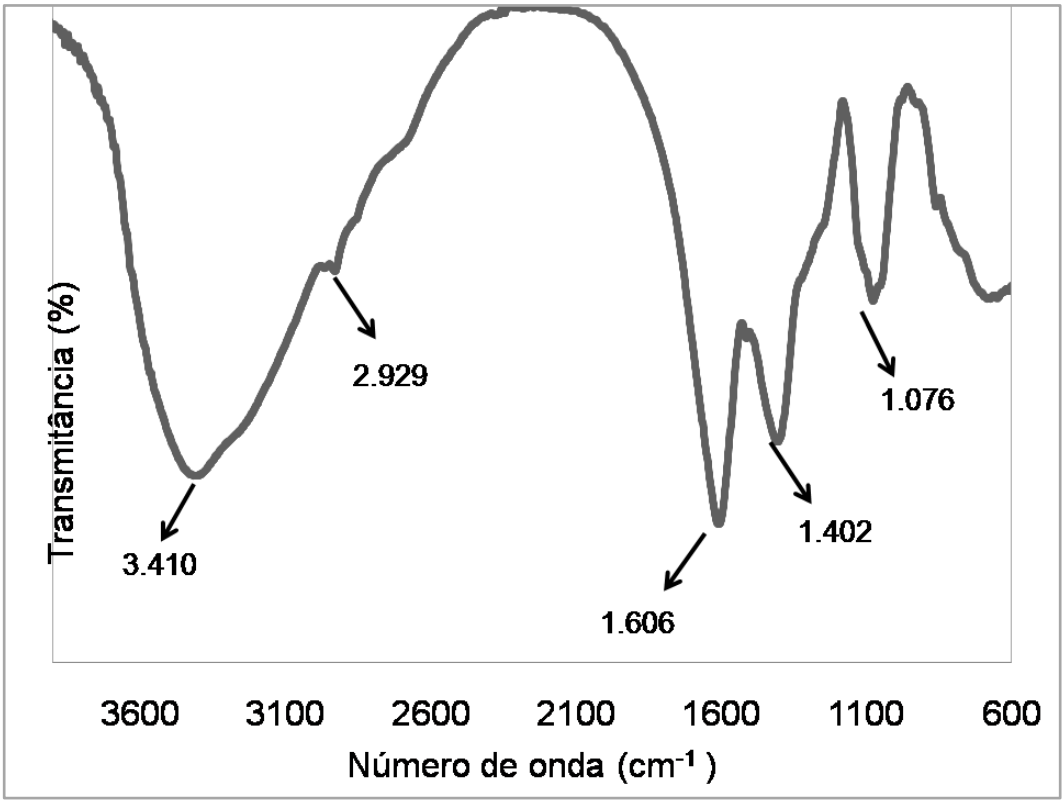



**Figura 4.9** –. Espectro FTIR do ET-PQC.

### 4.1.5 Influência do pH

Estudou-se o efeito do pH na intensidade de fluorescência do ET-PQCs na presença de ácido tânico (Ahmed et al., 2015)

A influência do pH foi avaliada coampão fosfato numa faixa entre 4,5 e 9,6 e os resultados são apresentados na (**Figura 4.10**). O ET-PQCs apresentou o máximo de emissão de fluorescência em 486,9 nm, quando excitado a 376 nm, em pH 8,0. Assim, a melhor resposta de interação entre os PQCs e o analito foi em pH 8,0 utilizado para futuras análises.

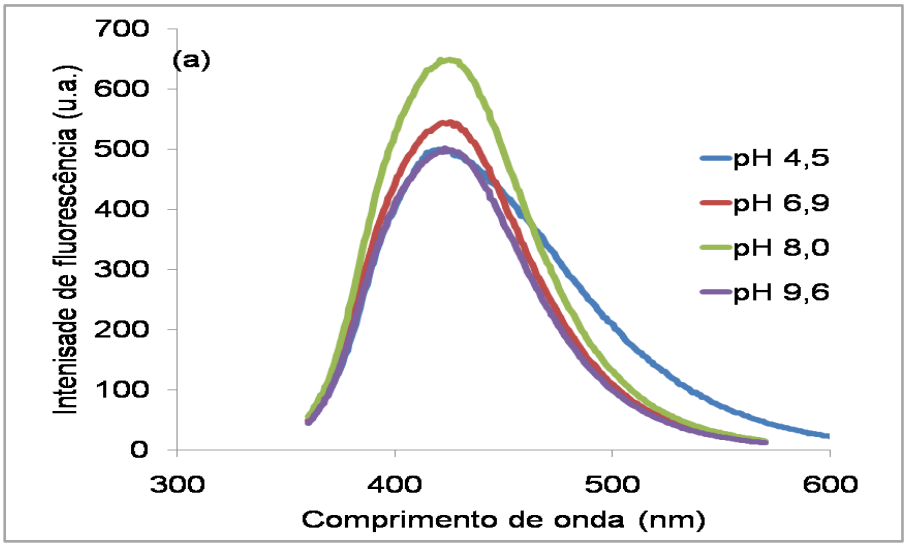



**Figura: 4.10** – Influência do pH na intensidade de fluorescência dos ET-PQCs.

## 4.2 Precisão das válvulas solenoides

O acionamento das válvulas solenoides proporciona a adição de volumes na câmara de mistura do sistema flow-batch. Em decorrência, há necessidade da calibração individual dessas válvulas por meio da medição da massa das soluções empregadas na análise. Para isso, foi verificada a vazão em cada linha de fluxo, em uma balança analítica (Shimadzu modelo Ay 220), usando tempos de acionamento das válvulas previamente estabelecidos. As vazões médias encontradas para os canais com soluções aquosas são apresentadas na **Tabela 4.2**

**Tabela 4.2** Vazões médias dos canais individuais das soluções aquosas.

| Válvulas | Solução | Vazão (mL $s^{-1}$) |
|---|---|---|
| V1 | ET-PQCs | 0,0878 ± 0,0610 |
| V2 | Tampão fosfato pH=8 | 0,0878 ± 0,0115 |
| V3 | Padrão/amostra | 0,0788 ± 0,0011 |
| V4 | Água | 0,0842 ± 0,0012 |

Com relação a válvula solenoide empregada na adição das amostras, por se tratar de uma solução preparada em água e ainda mais diluída para análise em fluxo, não foi necessária nenhuma medida de adequação da vazão no momento de troca do padrão para amostra.

## 4.3 Obtenção de curva analítica

A **Figura 4.11** expõe os espectros de emissão de fluorescência dos PQCs apresentando uma inibição de fluorescência gerada pela presença dos taninos, em meio tampão (pH 8,0). A intensidade de emissão da fluorescência máxima, em 486,9nm, decresce gradualmente com o aumento da concentração de taninos.

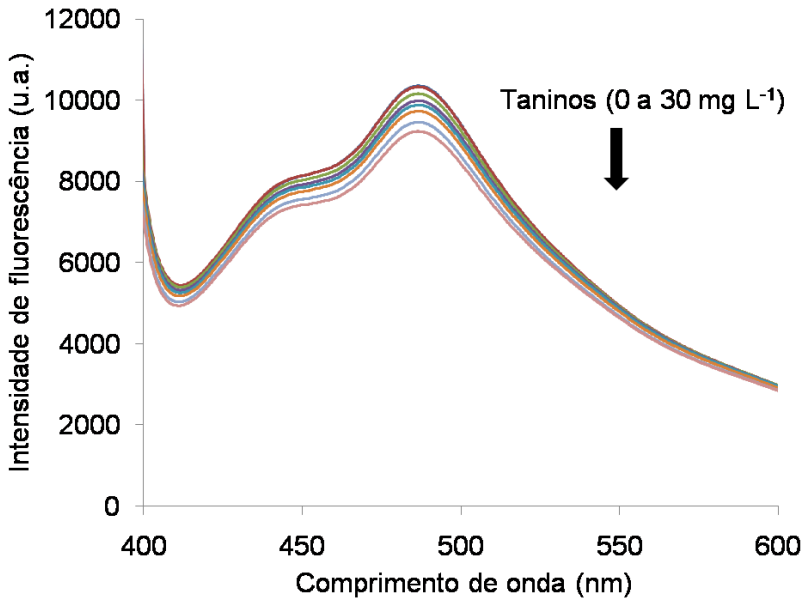



**Figura 4.11** – Espectros de emissão de fluorescência dos PQCs com supressão da fluorescência gerada pela presença dos taninos.

Os PQCs são conhecidos por serem excelentes aceitadores e doadores de elétrons (Lim et. al, 2015). A supressão de fluorescencia, turn off, pode ser justificada pela presença de grupos funcionais na superfície dos PQCs, tais como grupos carboxila, hidroxila, amina, etc. Portanto, um possível mecanismo de extinção possa ser atribuído a um processo de transferência de elétrons da fotoexcitação dos PQCs para os grupos aromáticos presente nos taninos (Ahmed et. al, 2015, Guo et. al, 2015).

## 4.4 Validação da curva analítica

A faixa linear de 2,0 à 30 mg.L$^{-1}$ obedece a relação entre a concentração de taninos e a razão de fluorescência, como já estabelecida pela literatura (Liu et al. 2012; Lin et al., 2014; Yu et al., 2015) é mostrada a seguir.

$$RF = \frac{(F_0 - F)}{F_0}$$

Onde: $F_0$ corresponde o sinal de emissão de fluorescência do branco, PQCs na ausência de taninos, e $F$ corresponde a emissão de fluorescência do PQCs na presença dos taninos (padrão).

A curva analítica foi plotada e os resultados são mostrados na **Figura 4.11**. A equação obtida a partir desta curva é y = 0,003x + 0,002 ($r^2$ = 0,996).

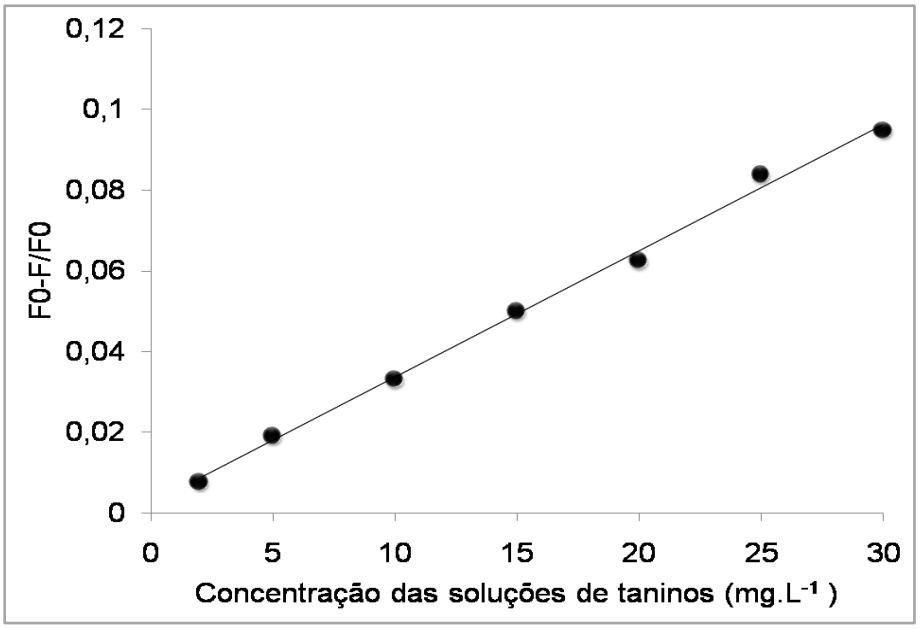



**Figura 4.12** Relação (F0-F)/F0 em função da concentração de taninos.

A **Figura 4.12** mostra que a curva analítica apresenta um comportamento linear entre o valor da relação de fluorescência e a concentração de taninos das soluções padrão. Essa inferência se baseia, a priori, por uma inspeção visual, que por sua vez pode ser, confirmada pela análise do gráfico dos resíduos deixado pelo

modelo, apresentado na **Figura 4.13**, e corroborada pelos resultados da ANOVA apresentados em seguida

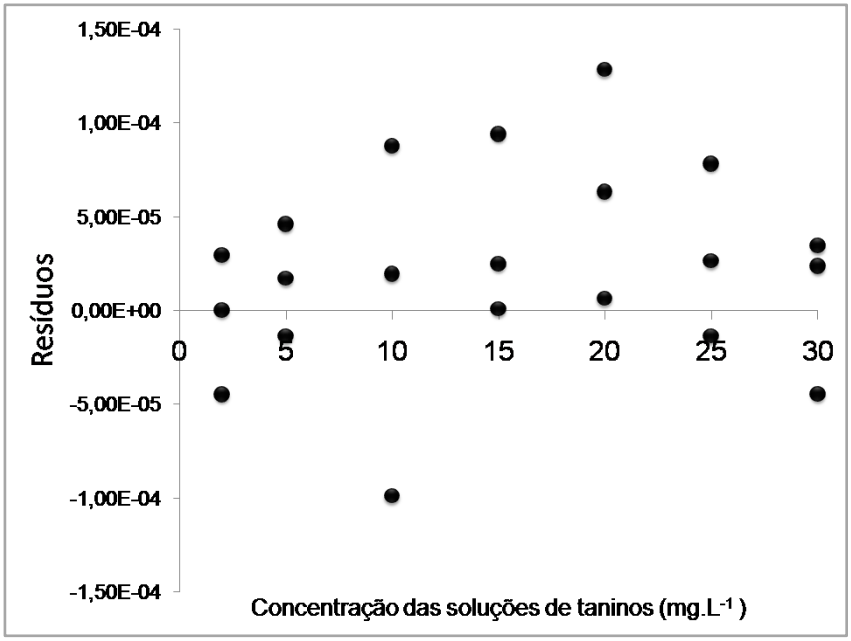



**Figura 4.13:** Gráfico dos resíduos em relação às concentrações de taninos da curva analítica.

Na **Figura 4.13** é possível observar a distribuição aleatória dos resíduos ao longo da faixa de concentração analisada. Pode-se perceber que os resíduos em certo momento crescem com o valor da concentração indicando heteroscedasticidade. (Pimentel, 1996). Efetivamente, não se observa nenhum perfil, estrutura ou tendência sistemática evidenciando uma possível falta de ajuste do modelo construído para o método proposto. Ademais, os resultados da aplicação da ANOVA, empregados para corroborar na validação do modelo de calibração, usando o método fluorescente automático, são apresentados na **Tabela 4.3**.

**Tabela 4.3** –. Validação do modelo pela ANOVA.

| Fonte de variação | SQ | GL | MQ | Test F |
|---|---|---|---|---|
| Regressão (R) | $6{,}72 \times 10^{-4}$ | 1 | $6{,}72 \times 10^{-4}$ | Significância de R |
| Resíduos (r) | $1{,}62 \times 10^{-4}$ | 19 | $8{,}53 \times 10^{-3}$ | $MQ_R/MQ_r$ 788,4 |
| Falta de ajuste (faj) | $6{,}74 \times 10^{-3}$ | 5 | $1{,}35 \times 10^{-3}$ | Falta de ajuste |
| Erro puro (ep) | $8{,}12 \times 10^{-4}$ | 14 | $5{,}8 \times 10^{-4}$ | $MQ_{faj}/MQ_{ep}$ 2,32 |

A avaliação da significância estatística da regressão é realizada após a verificação do modelo postulado com a finalidade de saber se esse não apresenta falta de ajuste. Para isso, compara-se o valor da razão MQfaj/MQep = 2,32 (**Tabela 4.3**) com o valor de $F_{5,14}$(ponto de distribuição F para 5 e 14 graus de liberdade ao nível de confiança de 95%) que é igual a 2,96. Como a razão MQfaj/MQep é menor que $F_{5,14}$, então pode se dizer que não há evidência de falta de ajuste do modelo linear ajustado aos dados experimentais. Sendo assim, comparando-se o quociente MQR/MQr (cujo valor é 788,4 **Tabela 4.3**) com o valor ponto de distribuição $F_{1,14}$ (igual a 4,60), dessa forma, conclui-se que a regressão é altamente significativa. Para o método proposto os parâmetros do modelo de calibração foram obtidos por regressão linear pelo modelo dos mínimos quadrados, esses são apresentados na **Tabela 4.4**. Ponderando que o modelo não apresentou falta de ajuste e descreve uma relação linear adequada entre o sinal analítico (relação de fluorescência) e a concentração de taninos na faixa de calibração, foram estimados os erros padrão dos coeficientes de regressão, $b_0$ e $b_1$. Para isso, foi usado o valor da média quadrática residual (MQr) como estimativa da variância populacional dos erros aleatórios ao longo da regressão.

**Tabela 4.4** –. Coeficientes de regressão e intervalos de confiança para os valores populacionais ($\beta_0$ e $\beta_1$) do modelo linear obtido para o método proposto.

| $y = b_0 + b_1 \times$ | |
|---|---|
| $\beta_0 = b_0 \pm t_{19} \times erro\ padrão\ (b_0)$ | $\beta_1 = b_1 \pm t_{19} \times erro\ padrão\ (b_1)$ |
| **0,003 ± 0,00021** | 0,002 ± 0,00020 |

Diante das estimativas e erros padrão de $b_0$ e $b_1$ obteve-se o intervalo de 95% de confiança para os parâmetros populacionais ($\beta_0$ e $\beta_1$) do modelo. Os limites obtidos mostram que os intervalos de confiança não contêm o valor zero. Assim, ambos os coeficientes estimados para o modelo linear são estatisticamente significativos e devem ser mantidos na respectiva equação.

Em seguida da validação da curva analítica, foram estimados para o método proposto os valores do limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e sensibilidade. Os valores estimados para essas características de desempenho são mostrados na **Tabela 4.5**.

**Tabela 4.5** –. Características de desempenho para o método proposto.

| | |
|---|---|
| **LOD (mg $L^{-1}$)** | **0,102** |
| **LOQ (mg $L^{-1}$)** | 0,340 |
| **Sensibilidade** | 0,002 |

## 4.5 Análise das amostras

Considerando o que foi exposto nas seções anteriores, o método se encontra adequado para a determinação de taninos em amostras de chás preto e verde. A **Tabela 4.6** apresenta os resultados obtidos da determinação de taninos em seis amostras de chás empregando o método automático proposto e método de fotométrico de tartarato.

**Tabela 4.6 –.** Resultados da determinação de taninos em amostras de chás

| Amostras | Sistema Proposto | | Sistema de Referência | | Erro relativo (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| **Chá verde** | Tanino (mg $L^{-1}$± DP) | DPR% | Tanino (mg $L^{-1}$± DP) | DPR% | |
| **1** | 25,34 ±0,0012 | 1,11 | 25,30 ± 0,0011 | 1,03 | 0,22 |
| **2** | 22,10 ± 0,0078 | 0,21 | 22,10 ± 0,0055 | 0,09 | 0 |
| **3** | 3,96 ± 0,0030 | 1,75 | 3,90 ± 0,0021 | 2,22 | 1,81 |
| **Chá preto** | | | | | |
| **1** | 8,85 ± 0,0033 | 2,91 | 8,85 ± 0,0017 | 0,31 | 0 |
| **2** | 13,40 ± 0,0012 | 2,32 | 13,76 ± 0,004 | 1,73 | 2,76 |
| **3** | 5,84 ± 0,0014 | 0,86 | 5,81 ± 0,0011 | 1,62 | 0,62 |

. [a] Desvio padrão. [b] DPR: Desvio padrão relativo

Os resultados obtidos empregando o sistema automático flow-batch quando comparados com o método de referência, apresentaram desempenho semelhante em termos de precisão e exatidão. Quando aplicado o teste t emparelhado, não apresentaram diferenças sistemáticas estatisticamente significativas a um nível de 95% confiança. Efetivamente, os valores do desvio padrão relativo (DPR %) que reflete a precisão do método, mantiveram-se inferior a 2,91% para o método proposto e inferior a 2,22% para o método de referência. Em relação à exatidão, que é representada pelo o erro relativo para o método proposto, os resultados mostraram-se adequados nas análises de todas as fontes, com erros relativos médios entre 0% e 2,76%.

## 4.6 Teste de recuperação

Para avaliar a exatidão do método proposto, quatro amostras de chás, verde e preto foram escolhidas aleatoriamente e empregadas para o teste de recuperação. Foram adicionados 550 µL da mistura de PQCs com a solução tampão (pH 8). Na sequência um volume de 18 µL da amostra foi adicionado a 180 µL, 360 µL, e 540 µL de cada padrão de taninos. Na sequência foi adicionado água de modo a se obter as concentrações finais de 5 mg $L^{-1}$, 10 mg $L^{-1}$ e 15 mg $L^{-1}$. **Tabela 4.7** apresenta os resultados obtidos.

**Tabela 4.8** –.Teste de recuperação para taninos nas amostras de chás verde: 1 e 2 ; preto: 3 e 4 (n = 3).

| **Amostras** | **Recuperação (%)** | | |
|---|---|---|---|
| | 5 ($mg.L^{-1}$) | 10 ($mg.L^{-1}$) | 15 ($mg.L^{-1}$) |
| **1** | 109,1 | 90,5 | 103,4 |
| **2** | 107,3 | 105,7 | 97,6 |
| **3** | 98,1 | 90,9 | 102,3 |
| **4** | 99,3 | 102,4 | 105,5 |

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 4.7**, pode-se observar que os valores das recuperações para as amostras, após a adição dos padrões de taninos, variaram entre 90 e 109% (n = 3). Esse intervalo de recuperação pode ser considerado satisfatório para a determinação do analito.

# Capítulo 5

# Conclusões

## 5 Conclusões

O presente trabalho permitiu o desenvolvimento de um novo método fluorimétrico automático empregando pontos quânticos de carbono para a determinação de taninos soluvéis em chás utilizando um sistema flow-batch com detecção on-line.Os PQCs foram sintetizados por meio do método hidrotérmico, usando o xiquexique como bioprecursor e a etanolamina como funcionalizante. Eles foram caracterizados por DRX, UV–Vis, FTIR, e espectroscopia de fluorescência molecular, e exibiram um satisfatório rendimento quântico de 13,58%. A intensidade de fluorescência dos PQCs obtidos pode ser significativamente extinta na presença de ácido tânico. Observou-se uma relação linear entre a resposta de fluorescência e a concentração de taninos na faixa de 2,0 a 30 mg $L^{-1}$ em tampão pH 8,0, com limite de detecção de 0,102 mg $L^{-1}$.

O método automático desenvolvido foi aplicado, com sucesso, à determinação de taninos em seis amostras de chá verde e preto. O xiquexique apresentou-se como uma alternativa simples e viável na preparação de pontos quânticos de carbono. O uso de um LED UV como fonte de excitação e de um espectrofluorímetro portátil para detecção, permitiram uma maior autonomia do sistema flow-batch, contribuindo para a sua portabilidade. Quando comparado ao método de referência apresenta erro relaitvo(%): para o chá verde menor que 1,8 e para o chá preto menor que 2,8, estando, dessa forma, dentro do limite aceitável. Mostrou-se também como um modelo exato visto que sua faixa de recuperação variou entre 90,5% e 109,1%.

Assim sendo, novas pesquisas que implementam os métodos fluorescentes automáticos utilizando os pontos quânticos de carbono são viáveis, podendo ser utilizados, sobretudo, em análises cujas amostras necessitam de metodolgia, simples, prática e robusta podendo vir a se tornar uma tendêcia valiosa em novas metodologias analíticas.

.

# Referências

## Referências

**Ahmed, H. G. H.,Laíño, R. B., Calzón, J. A. G., García, E. D.** Fluorescent carbon nanodots for sensitive and selective detection of tannic acid in wines. **(2015)**. Talanta132, 252-257.

**Ahmed, S. T., Lee, J. W., Mun H.-S., Yang, C.-J.** Effects of supplementation with green tea by-products on growth performance, meat quality, blood metabolites and immune cell proliferation in goats. J. Animal Physiology and Animal Nutrition, **(2014**).

**Alas, M. O., Genc, A**. An investigation into the role of macromolecules of different polarity as passivating agent on the physical, chemical and structural properties of fluorescent carbon nanodots J Nanopart Res **(2017)** 19: 185

**Almeida, C. A., Figueirêdo, M. F., Queiroz, A. J. M., Oliveira, F. M. N** Physical and chemical characteristics of *xiquexique* pulps Rev. Ciên. Agron., Fortaleza, **(2007)** v.38, n.4, p.440-443, Out.-Dez.

**Amarante Júnior, O. P., Caldas, E. P. A, Brito, N. M. Santos, T. C. R., Vale, M. L. B. F.** Validação de métodos analíticos umas breve revisão*Cad. Pesq., São Luís,* v. 12, **(2001)** *n.* 1/2, *p. 116-l31,j*

**Andrade, S. I. E.** Pontos quânticos de carbono aplicado à determinação fluorimétrica de cobre(II) em óleos usando um sistema em fluxo-batelada com extração em fase única. *Tese de Doutorado*.Programa de Pós Graduação em Química- Universidade Federal da Paraíba, **(2016).**

**Angelo, P. M., Jorge, N.** Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. Rev Inst Adolfo Lutz, **(2007)**66 (1): 1-9,

**Aroyeun, S. O., Jayeola, C. O**. Effects of Green Tea Extracts on the Caffeine, Tannin, Total Polyphenolic Contents and Organoleptic Properties of Milk ChocolateJ Food Process Technol **(2016 )**, 74.

**Baker, S.N., Baker G.A.**, Luminescent carbon nanodots: emergent nanolights. Angew. Chem., Int. **(2010)** Ed. 49, 6726-6744.

**Balzani, V.** Nanoscience and Nanotechnology: A Personal View of a Chemist. Small1, **(2005)** No. 3, 278 –283**.**

**Bansal, S., Chouldhary, S., Sharma, M., Kumar, S.S., Lohan, S. Bhardwaj, V.Syan, N., Jyot, S**. Tea: A native source of antimicrobial. Food Research International 53 **(2013)** 568–584.

**Bao, L., Liu C., Zhang Z. L., Pang D. W**., Photoluminescence-tunable carbon nanodots: surface-state energy-gap tuning. Adv. Mater. **(2015)** 27, 1663-1667.

**Barati A., Shamsipur M., Arkan E., Hosseinzadeh L., Abdollahi H.** Synthesis of biocompatible and highly photoluminescent nitrogen doped carbon dots from lime: Analytical applications and optimization using response surface methodology. Mater. Sci. Eng. C **(2015).**47, 325-332.

**Barbosa, A. S., Araújo A. P., Canuto T. M, Dias S.L, Cavalcanti M. B. A, França V.C.** Caracterização físico-química do xique-xique encontrado no semiárido Nordestino. Campina Grande Universidade Estadual da Paraíba **(2007).**

**Brower, A. M.** Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report). Pure Appl. Chem., **(2011)** Vol. 83,No,12, pp 2213-2228.

**Cabrera,C., Giménez, R, López,M C..** Determination of Tea Components with Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* **2003,** *51,* 4427-4435.

**Campos, B. B., Cáceres, R. C. C., Bandosz, T. J., Jiménezd, J., Castellónd, E.R., Silva, J.C.G.E., Algarrad, M.** Carbon dots coated with vitamin B12 as selective ratiometric nanosensor for phenolic carbofuran, Sensors and Actuators B 239 **(2017)** 553–561.

**Carando, S., Teissedre, P.L., Martinez.,L.P., Cabanis, J. C.**Levels of Flavan-3-ols in French WinesJ. Agric. Food Chem. **(1999)** 47, 4161-4166.

**Claderaforteza, A., Tomasmas, C.m Estelaripoll, J. M., Cerdamartin, V., Rasmisramos, G.**. Determination of Tannins in White Wines by Thermal Lens Spectromety. Microchemical Jounal **(1995)** 52, 28-32,

**Chen, R.L.C., Lin, C.H., Chung, C.Y., Chenng, T.J.**Determination of Tannin in Green Tea Infusion by Flow-Injection Analysis Based on Quenching the Fluorescence of 3-Aminophthalate J. Agric. Food Chem. **(2005**).53, 8443-8446.

**Chen, Y., Wu, Y., Weng, b., Wang, B., Li., C.**Facile synthesis of nitrogen and sulfur co-doped carbon dots and application for Fe(III) ions detection and cell imaging. Sensors and Actuators B: Chemical **(2016)**Volume 223,February 2016, Pages 689-696

**Clement, Y**.. Can green tea do that? A literature review of the clinical evidence Preventive Medicine 49 **(2009)** 83–87.

**Coville, N. J., Mhlanga S.D., Nxumalo E.N., Shaikjee A**. A review of shaped carbon nanomaterials. S Afr J Sci. **(2011)** 107(3/4), Art. #418, 15 pages.

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

**Ding, C., Zhu,A.,Tian, Y.**Functional Surface Engineering of C‐Dots for

Fluorescent Biosensing and in Vivo Bioimaging Accounts of chemical research ’ 20–30 **(2014)** Vol. 47, No. 1.

**Ding, H., Yu S-B., Wei J-S, Xiong H-M.**, Full-color light-emitting carbon dots with a surface-state-controlled luminescence mechanism, ACS Nano, **(2016)** 10, 484-491.

**Dong, X., Su, Y. Geng, H., Li, Z., Yang, C., Li, X., Zhang, Y.** Fast one-step synthesis of N-doped carbon dots by pyrolyzing ethanolamine J. Mater. Chem. C, **(2014)**, 2, 7477.

**Dong,Y., Wang,R., Li,G.,Chen,C., Chi, Y.,Guonan** Polyamine-Functionalized Carbon Quantum Dots as Fluorescent Probes for Selective and Sensitive Detection of Copper Ions Chen Anal. Chem. **(2012)**, 84, 6220−6224.

**Edison, T. N. J. I., Atchudan, R.,Sethuraman, M; G;Shum, J., Lee. Y.R.** Microwave assisted green synthesis of fluorescent N-doped carbon dots:Cytotoxicity and bio-imaging applications. Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology **(2016)**154–161.

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

**Geng, F., Zhao, Z.,Kang, Y., Guo, L.,** Unprecedented Two‐Step Chemiluminescence of Polyamine‐Functionalized Carbon Nanodots Induced by Fenton‐Like System. J. Anal. Test. **(2017)** 1:315–321.

**Geng, S., Chen, Y., Abbasi A.M., Ma, H.,Mo, H, Liu, B**.Tannin fraction from Ampelopsis grossedentata leaves tea (Tengcha) as an antioxidant and a-glucosidase inhibitory nutraceutical. International Journal of Food Science and Technology **(2016)**, 51, 2692–2700.

**Gu, D., Shang, S., Yu, Q., Shen., J.**Green synthesis of nitrogen-doped carbon dots from lotus root forHg(II) ions detection and cell imaging. Applied Surface Science **(2016)** 390, 38–42.

**Guo, Y., Zhang, L., Zhang, S., Yang, Y., Chen, X., Zhang, M.** Fluorescent carbon nanoparticles for the fluorescent detection of metal ions Biosensors and Bioelectronics 63**(2015)** 61–71

**Han, C., Wang, R., Wang, K., Xu, H., Sui, M.,Li, J**. Highly fluorescent carbon dots as selective and sensitive “on-off-on”probes for iron(III) ion and apoferritin detection and imaginginliving cells. Biosensors andBioelectronics **(2016)** 83229–236

**Han,S., Zhang, H., Zhang,J.,Xie,Y., Liu,L Wang,H., Li, X., Liu, X., Tang, W.** Fabrication, gradient extraction and surface polarity-dependent photoluminescence of cow milk-derived carbon dots RSC Adv., **(2014)**, 4, 58084.

**Hola, K., Zhang Y., Wang Y., Giannelis E.P., Zboril R., Rogach A.L**. Carbon dots - Emerging light emitters for bioimaging, cancer therapy and optoelectronics. Nano Today **(2014)**.5, 590-603.

**Honorato, R. S.,Araújo, M. C. U., Lima, R. A. C., Zagatto, E. A., Lapa, R. A. S., Lima, J. L. F. C.** A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimisation algorithm for end point search. Analytica Chimica Acta, **(1999)** v. 396, p. 91-97.7.

**Hosu, A., Cristea, V.M., Cimpoiu, C.**Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content. in Romanian red wines: Prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks Food Chemistry **(2014)** 150 ,113–118.

**Hsu, P.C., Shih Z.Y., Lee C.H., Chang H.T.** Synthesis and analytical applications of photoluminescent carbon nanodots. Green Chem. **(2012)**14, 917-920.

**Hung, Y., Richie, P., Chen, L.C., Cheng. T.** Sequential determination of tannin and total amino acid contents in tea for taste assessment by a fluorescent flow-injection analytical system. Volume 118, Issue 3, 1 February **(2010)** Pages 876-881.

**Hyung, H., Fortner, J.D., Hughes, J.B., Kim, J.H.**Natural Organic Matter StabilizesCarbon Nanotubes in the AqueousPhaseEnviron. Sci. Technol., **(2007)** 41,179-184.

**Iwasa, K.; Torii, H.** A colorimetric determination of tea tannin with ferrous tartrate**. (1962)** *Tea Res. J.* 26,.

**Jaiswal, A., Ghosh, S.S .Chattopadhyay, A.** One step synthesis of C-dots by microwave mediated caramelization of poly(ethylene glycol)w Chem. Commun.,**(2012)**, **48**, 407–409.

**Jiang, C., Wu, H.,Song, X., Mab,X., Wang, J., Tan, M.** Presence of photoluminescent carbon dots in Nescafe original instant coffee: Applications to bioimaging Talanta127 **(2014)** 68–74.

**Kang,Z., Liu, Y, Lee, S.** Small-sized silicon nanoparticles: new nanolights and nanocatalysts. Nanoscale, **(2011)**, 3, 777.

**Krysmann, M.J., Kelarakis, A., Dallas, P., Giannelis, E.P.** Formation Mechanism of Carbogenic Nanoparticles with Dual Photoluminescence Emission J. Am. Chem.Soc. **(2012)**, 134, 747−750.

**Kumar, A., Chwdhuri. A.R., Laha, D., Mahto, T.K., Karmakar, P., Sahu, K.S.** Green synthesis of carbon dots from *Ocimum sanctum* for effective fluorescent sensing of $Pb^{2+}$ions and live cell imaging. Sensors and Actuators B: Chemical (2017).Volume 242, April Pages 679-686 4.

**LeCroy, G. E., Yangb,S., Yang, F. Liu, Y., Fernando, K. A. S,Bunkerd,C.,Hua,Y., Luo, P. G., Sun, Y. P.** Functionalized carbon nan particles:Syntheses and

applications in optical bioimaging and energy conversion Coordination Chemistry Reviews 320-321 **(2016)** 66–81

**Li H., He X., Kang Z., Huang H., Liu Y., Liu J., Lian S., Tsang C.H.A., Yang X., Lee S.T.**, Water-soluble fluorescent carbon quantum dots and photocatalyst design. Angew. Chem. Int. (**2010)** Ed. 49, 4430-4434.

**Li H., Kang Z., Liu Y., Lee S.T.**, Carbon nanodots: synthesis, properties and applications. J. Mater. Chem. **(2012)**. 22, 24230-24253.

**Lim, S.H., Shen, W., Gao, Z.** Carbon quantum dots and their applications Chem. Soc. Rev., **(2015),**44, 362

**Lima, M. B.** Um micro Flow-batch para determinação fotométrica e turbimétrica de Taninos em amostras de chás. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Química- Universidade Federal da Paraíba, **(2012).**

**Lima, M. B., Andrade S. I. E., Hardinga, D.P. Pistonesi, M.F., Band, B.S.F., Araújo, M. C. U.** Turbidimetric and photometric determination of total tannins in tea using a micro-flow-batch analyzer.Talanta 88 **(2012)** 717– 723.

**Lima, M. B., Andrade, S. I. E, Barreto, I. S., Almeida, L. F., Araújo, M.C.U.** A digital image-based micro-flow-batch analyzer Microchemical Journal 106 **(2013)** 238–243.

**Liu, Y., Zhao, Y., Zhang, Y**. One-step green synthesized fluorescent carbon nanodots from bamboo leaves for copper(II) ion detection. Sensors and Actuators B ,(**2014)**196 647–652.

**Liu, Y., Suqin Han, S**.Chemiluminescence of Nitrogen-Doped Carbon Quantum Dots for the Determination of Thiourea and Tannic Acid Food Anal. Methods **(2017)** 10:3398–3406.

**Lorrain, B., Ky, I., Pechamat, L., Teissedre, P.,** Evolution of analysis of polyhenols from grapes, wines, and extracts. Molecules **(2013).**18, 1076-1100.

**Machado C.E., Vieira K.O., Ferrari J.L., Schiavon M.A.**, Pontos quânticos de carbono: síntese química, propriedades e aplicações. Rev. Virtual Quim. (**2015)** 7, 1306-1346.

**Mammela, P., Savolainenb, H., Lindroosa,L., Kangasd,J., Vartiainen, T.** Analysis of oak tannins by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry Journal of Chromatography A, 891 **(2000)** 75–83.

**Martins, N. C. T., Ângelo, A., Girão, A.V. Trindade, T., Andrade, L., Mendes, A.** N-doped carbon quantum dots/$TiO_2$ composite with improved photocatalytic activity, Applied Catalysis B: Environmental 193 **(2016)** 67 74.

**Mehta,V. N., Jhab,S., Basuc,H., Singhalc, R. S., Kailasaa, S. K.**, One-step hydrothermal approach to fabricate carbon dots from apple juice for imaging of mycobacterium and fungal cells Sensors and Actuators B **(2015)** 213 434–443.

**Miao, P. Han, K., Tang, Y., Wang, B., Linc, T., Chenga, W**. Recent advances in carbon nanodots: synthesis, properties and biomedical applications Nanoscale, **(2015)**, 7, 1586.

**Pasquini, C.; Oliveira, W.A.** Monosegmented system for continuous flow analysis. Spectrophotometric determination of chromium(VI), ammonia and phosphorus. Analytical Chemistry,**(1985)** v. 57, p. 2575-2579.

**Pimentel, M. F.** Calibração uma revisão para químicos analíticos. Química Nova **(1996)** 1(3).

**Pires, N.R. Santos,C M. W., Sousa,R. R ., Paula,R. C. M.. Cunha, P. L. R., Feitosa, J. P. A.** Novel and Fast Microwave-Assisted Synthesis of Carbon Quantum Dots from Raw Cashew Gum J. Braz. Chem. Soc., **(2015)** Vol. 26, No. 6, 1274-1282.,

**Rahim, A. A., Rocca, E., Steinmetz, J., Kassim, M. J**. Corrosion Inhibitive action of mangrove tannins and phosphoric acid on pre-rusted steel via electrochemical methods Science 50 **(2008)** 1546–1550

**Reis, B. F. Giné, M. F., Zagatto, E. A. G., Lima, J. L. F. C., Lapa, R. A.**. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. Analytica Chimica Acta,**(1994)** v. 293, p. 129-138.

**Romani, F. Ieri , B. Turchetti , N. Mulinacci , F.F. Vincieri , P. Buzzini** Analysis of condensed and hydrolysable tannins from commercial plant extracts Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41 **(2006)** 415–420.

**Ruzicka J.; Hansen E. H.** Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. Analytica Chimica Acta,**(1975)** v. 78, p. 145-157.

**Ruzicka, J.; Marshall, G. D.** Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. Analytica Chimica Acta, v. **(1990)** 237, p. 329-343.

**Ryu, J., Suh, Y.W., Suh, D. J Ahn, D. J.** Hydrothermal preparation of carbon microspheresfrom mono-saccharides and phenolic compounds Carbon 48 **(2010)** 1990 –1998.

**Sanchez, F., Sobolev, K.**Nanotechnology in concrete – A review. Construction and Building Materials**(2010)** 24 2060–2071.

**Sevilla, M., Fuertes, A.B**. The production of carbon materials by hydrothermal

carbonization of cellulose Carbon **(2009)** 47 2281 –2289.

**Scida, K., Stege, P.W., Haby, G., Messina, G.A., García, C.D**.Recent applications of carbon-based nanomaterials in analytical chemistry: Critical review Analytica Chimica Acta **(2011)** 691 6–17.

**Schofield, P., Mbugua, D.M., Pel, A.N.** Analysis of condensed tannins: a review Volume 91, Issues 1–2, 16 May **(2001)** Pages 21-40.

**Sha, Y., Lou, J., Bai, S., Wua,D., Liu, B., Ling, Y.** Hydrothermal synthesis of nitrogen-containing carbon nanodots as the high-efficient sensor for copper(II) ions. Materials Research Bulletin 48 **(2013)** 1728–1731.

**Skoog, D, West, D., D.M., Holler, F. James, Crouch, S.R.** Fundamentals of analitytical chemistry São Paulo: Cengape Learning **(2010).**

**Silva, J. G. M., Silva, D. D., Ferreira, M. A., Lima, G. F. C., Melo, A. A. S., Diniz, M. C. N. M.** Xiquexique (Pilosocereus gounellei em Substituição à Silagem de Sorgo na Alimentação de Vacas Leiteiras R. Bras. Zootec., (2005) v.34, n.4, p.1408-1417.

**Tian,T, He Y, Ge Y, Song G** One-pot synthesis of boron and nitrogen co-doped carbon dots as the fluorescence probe for dopamine based on the redox reaction between Cr(VI) and dopamine. Sens Actuators B Chem **(2017)** 240:1265–1271.

**Tiwari, J.N., Tiwari, R.N., Kim, K.S.** Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advancedelectrochemical energy devices. Progress in Materials Science **(2012)** 57 724–803.

**Wan, H., Zou, Q., Yan, R., Zhao, F., Zeng, B.** Electrochemistry and voltammetric determination of tannic acid on a single-wall carbon nanotube-coated glassy carbon electrode. Microchim Acta **(2007**). 159: 109–115.

**Wang,J., Wang,C., Chen, S.** Amphiphilic Egg-Derived Carbon Dots: Rapid Plasma Fabrication, Pyrolysis Process, and Multicolor Printing Patterns Angew. Chem. **(2012)** 124, 9431–9435.

**Wang ,W., Lu, Y.C., Huang, H, Wang A.J., Chen JR, Feng J. J.** Facile synthesis of N, S-codoped fluorescent carbon nanodots for fluorescent resonance energy transfer recognition of methotrexate with high sensitivity and selectivity. BiosensBioelectron **(2015)** 64:517–522.

**Wang Y., Hu A.**, Carbon quantum dots: synthesis, properties and applications. J. Mater. Chem. C. (**2014)**. 2, 6921-6940.

**Wei, J., Zhang, X., Sheng, Y., Shen, J., Huang, P., Guo, S., Pan, J., Feng, B.** Dual functional carbon dots derived from cornflour via a simple one-pot hydrothermal route Materials Letters 123 **(2014)** 107–111.

**Ye, Q., Yan, F., Shi, D., Zheng. T., Wang, Y., Zhou, Y., Chen, Li**. N, B-doped carbon dots as a sensitive fluorescence probe for Hg2+ ions and 2,4,6-trinitrophenol detection for bioimaging a Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology 162 **(2016)** 1–13.

**Xie, C., Cui, H.** Detection of tannic acid at trace level in industrial waste waters using a highly sensitive chemiluminescence method Water Research 37 **(2003)** 233–237.

**Xu, Y., Wu M., Liu Y., Feng X.Z., Yin X.B., He X.W., Zhang Y.K.**, Nitrogen doped carbon dots: a facile and general preparation method, photoluminescence investigation, and imaging applications. Chem. Eur. J. **(2013)**.19, 2276-2283.

**Xu, X., Ray R., Gu Y., Ploehn H.J., Gearheart L., Raker K., Scrivens W.A.**, Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments. J. Am. Chem. Soc. (**2004)**.126, 12736-12737.

**Xuczaj, W., Skrzydlewska, E.** Antioxidative properties of black tea Preventive Medicine 40 **(2005)** 910– 918.

**Xue, M., Zhan., Z., Zou,M., Zhang, L., Zhao, S.** Green synthesis of stable and biocompatible fluorescent carbon dots from peanut shells for multicolor living cell imaging New J.Chem., **(2016)**,40, 1698

**Zhang, X., Liu, M., Zhang, X. Deng, F., Zhou, C., Hui, J., Liu, W., Wei, Y**. Interaction of Tannic Acid with Carbon Nanotubes: Enhancement of Dispersibility and Biocompatibility. Toxicology. Research. (**2015)** 4, 160–168.

**Zheng, B., Chen, Y., Li, P., Wang, Z., Cao, B. Qi, F., Liu, J., Qiu, Z., Zhang, W.** Ultrafast ammonia-driven, microwave-assisted synthesis of nitrogen-doped graphene quantum dots and their optical properties Nanophotonics **(2017)**; 6(1): 259–267

**Zhou, J., Sheng, Z., Han, H., Zou, M., Li. C.** Facile synthesis of fluorescent carbon dots using watermelon peel as a carbon source Materials Letters 66 **(2012)** 222–224.