



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – BACHARELADO

Tassio de Araújo Nunes

**Desenvolvimento de uma metodologia voltamétrica para determinação de
aminas biogênicas usando eletrodo de carbono vítreo modificado com pontos
quânticos de carbono**

João Pessoa - PB

2021

Tassio de Araújo Nunes

Desenvolvimento de uma metodologia voltamétrica para determinação de aminas biogênicas usando eletrodo de carbono vítreo modificado com pontos quânticos de carbono

Trabalho de Conclusão de Curso, requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Química, submetido ao Curso de Graduação em Química – Bacharelado da Universidade Federal da Paraíba.

Orientador: Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo

Coorientadora: Dra. Anabel Santos Lourenço

João Pessoa - PB

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

N972d Nunes, Tássio de Araújo.

Desenvolvimento de uma metodologia voltamétrica para determinação de aminas biogênicas usando eletrodo de carbono vítreo modificado com pontos quânticos de carbono / Tássio de Araújo Nunes. - João Pessoa, 2021.
45 p. : il.

Orientação: Mário César Ugulino de Araújo.

Coorientação: Anabel Santos Lourenço.

TCC (Graduação/Bacharelado em Química) - UFPB/CCEN.

1. Aminas biogênicas. 2. Pontos quânticos de carbono.
3. Eletrodo de carbono vítreo. 4. Voltametria de onda quadrada. I. de Araújo, Mário César Ugulino. II. Lourenço, Anabel Santos. III. Título.

UFPB/CCEN

CDU 547(043.2)

Desenvolvimento de uma metodologia voltamétrica para determinação de aminas biogênicas usando eletrodo de carbono vítreo modificado com pontos quânticos de carbono

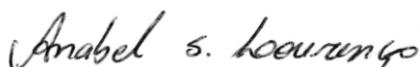
Trabalho de Conclusão de Curso, requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Química, submetido ao Curso de Graduação em Química – Bacharelado da Universidade Federal da Paraíba.

Data da avaliação: 14/10/2021

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Mário Cesar Ugulino de Araújo
(Presidente/Orientador)



Profª. Dra. Anabel Santos Lourenço
(2º. Orientadora)



Prof. Dr. Williane Farias Ribeiro
(Examinador)



Profª. Drª. Amanda Cecília da Silva
(Examinadora)

“A ciência não é apenas uma discípula da razão, mas também do romance e da paixão.”

(Stephen Hawking)

AGRADECIMENTOS

Dedico esse trabalho aos meus pais, que por todos esses anos me deram incondicional apoio e carinho, agradecer especialmente a minha mãe, Rosane Maria, por todos esses anos de absoluto apoio nos momentos bons e ruins.

Gostaria de agradecer a inesquecível turma 2016.1 pela amizade e companheirismo durante esses anos de graduação, agradecer a Alice, Alexandra, Ana Paula, Breno, Erico, Gabriela Coutinho, Gabriela Pereira, Giulia, Isabelle, Jordan, Julyanna, Larissa, Leonardo, Mahara, Maria Eugenia, Nicholas, Paulo, Pedro, Rondynelly, Samantha, Taiane, Thiago e Vivian.

Agradecer ao pessoal da salinha de estudos do LAQA por todo apoio e companheirismo, agradecer a Ana Rosa, Carla Priscila, Daniella, Jainny, João Batista, Juliana, Kelly, Laila, Thyago Marques e Wallis.

Por fim, gostaria de agradecer ao professor Dr. Mário César Ugulino, por ter depositado sua confiança em mim e ter acreditado em meu potencial, pois sou grato por todo o conhecimento que me foi transmitido durante esses anos de graduação, agradecer também a Dra Anabel Lourenço, pelos ensinamentos que me foram de grande valia para o desenvolvimento e término desse trabalho.

RESUMO

Aminas biogênicas (ABs) são compostos nitrogenados que apresentam um baixo peso molecular, são formadas a partir da degradação de compostos nitrogenados pela ação de enzimas, podendo ser associado ao processo de deterioração ou fermentação de alimentos. Atualmente há um interesse no estudo das aminas biogênicas, por conta da atividade toxicológica que alguns destes compostos podem apresentar aos seres humanos. A histamina (HTM) está associada a problemas de intoxicação alimentar, podendo provocar reações alérgicas, como exemplo, falta de ar, vômito, febre, hipertensão etc. A triptamina apresenta efeitos tóxicos, promovendo o aumento da pressão arterial. A literatura reporta a utilização dos métodos cromatográficos para a determinação de ABs em diversas matrizes, no entanto alguns inconvenientes encontrados no desenvolvimento desses métodos tornam necessária a busca por métodos alternativos para determinação desses compostos. O presente trabalho tem como objetivo principal a utilização da voltametria de onda quadrada (VOQ) fazendo uso de um eletrodo de carbono vítreo (ECV) modificado com pontos quânticos de carbono (PQCs) para a determinação de triptamina e histamina. A metodologia utilizada para a síntese das nanopartículas foi realizada a partir da abordagem do tipo *bottom-up*, já bem fundamentada na literatura. A modificação do ECV consistiu na realização de 8 varreduras consecutivas na voltametria cíclica, numa velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , utilizando uma mistura de pontos de carbono, β -Ciclodextrina e tampão fosfato pH 7. O uso do eletrodo modificado com pontos de carbono apresentou melhores respostas para a medida simultânea da triptamina ($12,5 - 25,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e histamina ($25,0 - 50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), apresentando limites de detecção e quantificação de $0,2529 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,8429 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para triptamina e $0,6789 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e $2,263 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para histamina, respectivamente.

Palavras-chave: Aminas biogênicas; Pontos quânticos de carbono; Eletrodo de carbono vítreo; voltametria de onda quadrada.

ABSTRACT

Biogenic amines (BAs) are nitrogenous compounds that have a low molecular weight, are formed from the degradation of nitrogenous compounds by the action of enzymes and can be associated with the process of deterioration or fermentation of food. Currently, there is an interest in the study of biogenic amines, due to the toxicological activity that some of these compounds can present to humans. Histamine (HTM) is associated with food poisoning problems and can cause allergic reactions, such as shortness of breath, vomiting, fever, hypertension, etc. While tryptamine has toxic effects, promoting an increase in blood pressure. The literature reports the use of chromatographic methods for the determination of BAs in several matrices, but some inconveniences found in the development of these methods make it necessary to search for alternative methods for the determination of these compounds. The main objective of the present work is the use of square wave voltammetry (SWV) using a glassy carbon electrode (GCE) modified with carbon quantum dots (CQDs) for the determination of tryptamine and histamine under physiological conditions (pH 7). The methodology used for the synthesis of nanoparticles was carried out from the bottom-up approach, which is already well-founded in the literature. The modification of the GCE consisted of performing 8 consecutive scans in cyclic voltammetry, at a scan speed of 50 mV s^{-1} , using a mixture of carbon dots, β -Cyclodextrin and phosphate buffer pH 7. The use of the modified electrode with carbon dots presents better responses for the simultaneous measurement of tryptamine ($12,5 - 25,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) and histamine ($25,0 - 50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), with limits of detection and quantification of $0,2529 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ and $0,8429 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ for tryptamine and detection and quantification limits of $0,6789 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ and $2,263 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ for histamine, respectively.

Keywords: Biogenic amines; Carbon quantum dots; Modified electrodes; Voltammetric techniques; Electrochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Conversão de aminoácidos em aminas biogênicas pelo mecanismo de descarboxilação	16
Figura 2 – Mecanismo de transporte de massa do analito na interface eletrodo solução	19
Figura 3 – Medidas de potencial em VC: A) medidas de potencial por varredura linear, B) medidas de potencial por staircase e C) voltamograma de um processo reversível.....	21
Figura 4 – (A) Esquema de aplicação de potencial e (B) Voltamograma típico para DPV (<i>I</i> vs. <i>E</i>).....	22
Figura 5 – (A) Esquematização do sinal de excitação da VOQ e voltamogramas de um sistema reversível (B) e irreversível (C)	23
Figura 6 – Esquematização dos métodos de obtenção dos PQC's a partir de métodos bottom-up e top-down e subsequente modificação.	25
Figura 7 – Esquematização do processo de síntese dos PQC's a partir do ácido cítrico.....	28
Figura 8 – (A) Voltamogramas cíclicos de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, em pH = 7,0 em diferentes velocidades de varredura. (B) Relação de i_p vs. $v^{1/2}$ (V s^{-1}) ^{1/2}	31
Figura 9 – Voltamograma cíclico da modificação do ECV utilizando PQC's.	32
Figura 10 – Voltamogramas de onda quadrada das ABs (10 $\mu\text{mol/L}$) em tampão fosfato pH 7,0. (a) Triptamina e (b) Histamina usando o ECV não modificado (—) e ECV modificado com PQC's/ β -CD (—)	33
Figura 11 – Influência do pH na resposta voltamétrica das ABs usando ECV modificado com PQC's em tampão acetato pH 3,5 (—) e pH 4,5 (—); e em tampão fosfato pH 6,0 (—); pH 7,0 (—) e pH 8,5 (—), tetraborato pH 9,5 (—) e tetraborato pH 10,5 (—).....	34
Figura 12 – Gráficos de E_p em função do pH dos voltamogramas de pulso diferencial da (A) TPM e (B) HTM.	35
Figura 13 – Ilustração dos mecanismos redox para a TPM e HTM.....	35
Figura 14 – (A) Voltamograma cíclico em diferentes velocidades de varredura para uma solução de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TPM em tampão fosfato 0,2 mol L^{-1} (pH 7,0); (B) Gráfico de i vs $v^{1/2}$; (C) Gráfico de $\text{Log } i$ vs $\text{Log } v$	37
Figura 15 – (A) Voltamograma cíclico em diferentes velocidades de varredura para uma solução de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HTM em tampão fosfato 0,2 mol L^{-1} (pH 7,0); (B) Gráfico de $\text{Log } i$ vs $\text{Log } v$	38
Figura 16 – Curva analítica SW. (A) Voltamogramas obtidos usando o ECV modificado com PQC's/ β -CD para várias concentrações de TPM (L^{-1}) e HTM (B) Curva de calibração obtido para TPM; (C) Curva de calibração obtido para HTM; $f = 150 \text{ Hz}$, $\Delta E_p = 100 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das aminas biogênicas	15
Tabela 2 – Soluções usadas como eletrólito de suporte	26
Tabela 3 – Estudo dos parâmetros ótimos para as medidas voltamétricas em voltametria de onda quadrada (VOQ)	29
Tabela 4 – Determinação dos limites de detecção e quantificação da TPM e HTM	40

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Equação da corrente de pico de um voltamograma	20
Equação 2 – Representação gaussiana da corrente de pico	22
Equação 3 – Limite de detecção (LOD)	30
Equação 4 – Limite de quantificação (LOQ)	30
Equação 5 – Equação linear para triptamina (TPM)	39
Equação 6 – Equação linear para histamina (HTM)	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABs	Aminas biogênicas
β - CD	Beta – Ciclo Dextrina
b	Coefficiente Ângular
CE	Contra Eletrodo
i_p	Corrente de Pico
S_b	Desvio padrão amostral
ECV	Eletrodo de Carbono Vítreo
ER	Eletrodo de Referência
ET	Eletrodo de Trabalho
FDA	Food and Drug Administration
f	Frequência
HTM	Histamina
ΔE_s	Incremento de potencial
W1/2	Largura de pico a meia altura
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
PQCs	Pontos Quânticos de Carbono
E_p	Potencial de pico
v	Velocidade de varredura
VC	Voltametria cíclica
VOQ	Voltametria de onda quadrada
VPD	Voltametria de pulso diferencial
TPM	Triptamina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivos específicos	14
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1 Aminas Biogênicas	15
3.2 Técnicas eletroanalíticas	17
3.2.1 Voltametria Cíclica	20
3.2.2 Voltametria de Pulso Diferencial	21
3.2.4 Voltametria de Onda Quadrada	23
3.3 Pontos quânticos de carbono	24
4. METODOLOGIA	26
4.1 Reagentes e soluções	26
4.1.1 Instrumentação e software	26
4.2 Estudo da área eletroativa do eletrodo de trabalho (ET)	27
4.2.1 Procedimento eletroquímico.....	27
4.3 Síntese dos pontos quânticos de carbono	27
4.4 Modificação do ECV com PQCs	28
4.5 Determinação simultânea de Triptamina (TPM) e Histamina (HTM)	29
4.6 Estudo de pH	29
4.7 Curva analítica, Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ) ..	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Área eletroativa do eletrodo de trabalho	30
5.2 Modificação do ECV	31
5.3 Comportamento eletroquímico da triptamina e da histamina sobre o ECV modificado e não modificado	32
5.4 Estudo de pH da Triptamina (TPM) e da Histamina (HTM)	33
5.5 Estudo de velocidade.....	36
5.5 Curva analítica.....	38
5.6 Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ).....	39
6. CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

Compostos a base de nitrogênio são muito comuns em diversas funções biológicas, seja no metabolismo nas células, na formação de proteínas etc. A decomposição dessas substâncias nas células dá origem as aminas biogênicas (ABs), que são produzidas pelos seres vivos a partir da ação enzimática (Santos, 1996). As aminas biogênicas podem influenciar o organismo vivo no controle da temperatura corporal, na mudança da pressão sanguínea etc. (GOMES et al., 2014).

Há diversos estudos na literatura que evidenciam a presença de algumas ABs em alimentos e bebidas. As principais aminas encontradas são a histamina, putrescina, cadaverina, tiramina e triptamina (GOMES et al., 2014). A presença desses compostos nos alimentos é considerada um indicativo em relação ao grau de degradação e qualidade do alimento comercializado, como também na toxicidade desses alimentos em diferentes graus a depender de qual substância está presente (GOMES et al., 2014). As ABs podem ser encontradas em vinhos, queijo, peixe, produtos cárneos fermentados, vegetais, cerveja etc. (FERNÁNDEZ-GARCÍA e NUNÉZ, 2000).

Nos últimos tempos, os métodos cromatográficos foram os mais utilizados na determinação desses compostos em amostras reais, mas em virtude das desvantagens acerca do tempo de resposta, baixa sensibilidade, alto custo de instrumentação e reparos, se tornou necessário a busca de novas metodologias analíticas para determinação de ABs em alimentos, dentre os métodos mais usados atualmente, há de se destacar os métodos eletroquímicos (HOLLER, 2009).

Na voltametria se faz uso de eletrodos quimicamente modificados como mediadores de elétrons, visando aumentar a sensibilidade para determinação de diferentes analitos e, em alguns casos visa diminuir o sobrepotencial redox apresentado por algumas espécies químicas. Um exemplo de bons agentes modificadores são os pontos quânticos de carbono (PQCs), esses compostos representam uma classe emergente de nanopartículas fluorescentes de carbono, com grande potencial para aplicações analíticas e bioanalíticas. Essas nanopartículas se destacam por suas atraentes propriedades ópticas, além disso, apresentam baixa toxicidade, facilidade de funcionalização, resistência à fotodegradação e fluorescência (SUN e LEI, 2017; WANG e QIU, 2016).

Neste trabalho, foi proposto o uso de um eletrodo de carbono vítreo modificado com PQCs para eletrocatalisar reações de oxidação de triptamina e histamina utilizando a voltametria de onda quadrada, visando alcançar baixos limites de detecção e quantificação.

2. OBJETIVOS

Desenvolvimento de uma metodologia voltamétrica para determinação simultânea de triptamina e histamina utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com pontos quânticos de carbono.

2.1 Objetivos específicos

- Desenvolver uma metodologia simples para síntese dos pontos quânticos de carbono;
- Investigar o comportamento voltamétrico da triptamina e histamina em relação ao sensor modificado e não modificado;
- Otimizar os parâmetros voltamétricos para a determinação da triptamina e histamina;
- Desenvolver um método voltamétrico para a determinação simultânea de triptamina e histamina;
- Avaliar o desempenho do sensor para a determinação dos analitos.

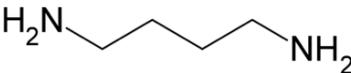
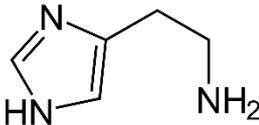
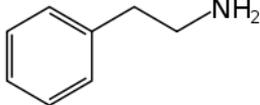
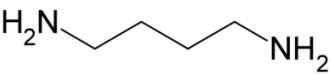
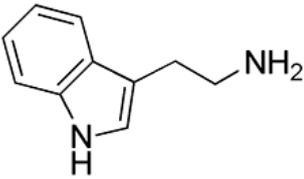
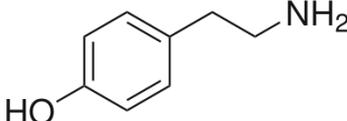
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Aminas Biogênicas

As aminas biogênicas (ABs) são uma classe de compostos nitrogenados que apresenta um baixo peso molecular, são formadas pela descarboxilação de aminoácidos ou pela aminação de aldeídos e cetonas. As ABs são formadas a partir da degradação de compostos nitrogenados pela ação de enzimas, podendo ser associado ao processo de deterioração ou fermentação de alimentos (SANTOS, 1996).

Esses compostos nitrogenados são classificados em três tipos de estruturas distintas: (1) Estruturas alifáticas, como exemplo, putrescina, cadaverina, espermina e espermidina; (2) Estruturas heterocíclicas, como exemplo, histamina e triptamina; (3) Estruturas aromáticas, como exemplo, feniletilamina e tiramina (GOMES et al., 2014).

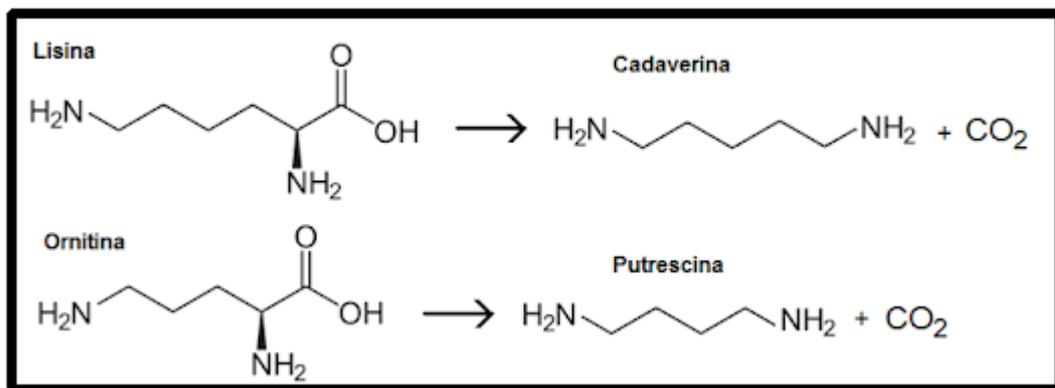
Tabela 1. Classificação das aminas biogênicas

Estruturas alifáticas	Estruturas Heterocíclicas	Estruturas Aromáticas
<p data-bbox="384 1272 541 1308">Putrescina</p> 	<p data-bbox="767 1272 911 1308">Histamina</p> 	<p data-bbox="1110 1272 1310 1308">Feniletilamina</p> 
<p data-bbox="379 1659 549 1695">Cadaverina</p> 	<p data-bbox="762 1659 916 1695">Triptamina</p> 	<p data-bbox="1145 1659 1267 1695">Tiramina</p> 

Fonte: Adaptado pelo autor

Nos alimentos as AB são formadas a partir da ação de microorganismos sobre os aminoácidos durante o processo de maturação e deterioração, pelo qual muitas bactérias são capazes de descarboxilar os aminoácidos, convertendo-os em aminas biogênicas. A conversão de aminoácidos em ABs é ocasionada em virtude de um mecanismo de autodefesa dessas bactérias promovendo a alcalinização do meio (MARCOBAL et al., 2004; GARAI et al., 2007). Como exemplo, pode-se citar as bactérias dos gêneros Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc e Pediococcus, que atuam em diversos alimentos como queijo, carne e bebidas fermentadas (MAIJALA, 1993; MORENO-ARRIBAS et al., 2003).

Figura 1. Conversão de aminoácidos em aminas biogênicas pelo mecanismo de descarboxilação.



Fonte: SANTOS,1996

Atualmente há um interesse no estudo das aminas biogênicas, devido a eventual atividade toxicológica que alguns destes compostos podem apresentar aos seres humanos. A histamina (HTM) está associada a problemas de intoxicação alimentar, podendo provocar reações alérgicas, como falta de ar, vômito, febre, hipertensão etc. A HTM atua como um neurotransmissor no sistema nervoso central (SNC) e como vasodilatador no sistema cardiovascular (HERNANDEZ-JOVER, et al., 1997; YONGMEI et al., 2009; NAILA et al., 2010). A tiramina e a β-feniletilamina estão associadas com problemas de hipertensão, caracterizada pelo aumento da pressão sanguínea (TIL et al., 1997; MOHAN et al., 2009; KALAC, 2009).

A triptamina apresenta efeitos tóxicos, como aumento da pressão arterial, sendo que não há estudos sobre a relação entre sua toxicidade com o limite de

concentração deste composto em seres humanos. As poliaminas (como exemplo, a putrescina, espermina, espermidina e cadaverina), são encontrados naturalmente em alimentos, esses compostos na sua forma de amins não apresentam efeitos toxicológicos em organismos vivos, mas quando reagem com nitritos, podem formar nitrosaminas carcinogênicas (SHALABY, 1996; KALAC, 2009; KIM et al., 2009).

Na Europa, há leis de controle sobre o nível de contaminação dos alimentos por amins biogênicas, sendo 100 mg kg^{-1} o limite máximo de concentração de histamina em peixes frescos, 400 mg kg^{-1} de histamina em produtos curados. Enquanto nos EUA, a Food and Drug Administration (FDA), considera 500 mg kg^{-1} o limite máximo de histamina em alimentos (GOMES et al., 2014; FDA, 2001).

No Brasil há apenas uma legislação sobre o controle de histamina, que considera somente os níveis de histamina em pescados frescos e os seus derivados, em virtude dessa limitação, outros produtos que apresentem esta ou outras ABs com o mesmo potencial toxicológico estão sendo normalmente comercializadas (GOMES et al., 2014).

Em virtude dos problemas associados a esses compostos, diversos estudos têm sido realizados, para determinação quantitativa em matrizes alimentícias, sobretudo em produtos fermentados, as medidas cromatográficas são as mais empregadas para determinação destes constituintes em amostras líquidas e sólidas (BUENO-SOLANO et al., 2012; CONTRERAS et al., 2007; LOUKOU e ZOUTOU, 2003; ANLI et al., 2004; KALAC e KRIZEK, 1997)

Entretanto as medidas cromatográficas (sobretudo a cromatografia líquida de alta eficiência) apresenta um alto custo de instrumentação e operação, necessita de preparo prévio de amostra etc. De forma alternativa, as técnicas eletroanalíticas são promissoras para a determinação de ABs em matrizes alimentícias, por implicarem menores custos e tempos de análise, elevada seletividade e sensibilidade, possibilitando a obtenção de informações fundamentais sobre propriedades intrínsecas das substâncias de interesse analítico (IARC, 2010; BIGGER, 2000; SOUZA et al., 2003; BARD e FAULKNER, 2001; BRETT e BRETT, 1996).

3.2 Técnicas eletroanalíticas

A eletroanalítica consiste num grupo de métodos analíticos utilizados na determinação, caracterização e quantificação das espécies químicas, baseadas nas propriedades elétricas de um analito em solução. As técnicas eletroanalíticas

apresentam baixos limites de detecção e oferecem um amplo conjunto de informações acerca da descrição e caracterização de um sistema eletroquímico (SKOOG et al., 2013).

A voltametria é um dos métodos da eletroanalítica, que consiste na medição da corrente em função de um potencial aplicado (I vs E_p), promovendo a polarização do eletrodo de trabalho. A diferença de potencial aplicada à célula eletroquímica provoca reações de oxidação e/ou redução em compostos que apresentam eletroatividade (HOLLER, 2009).

A medição de I vs E_p em voltametria é realizada numa célula eletroquímica composta por três tipos de eletrodos imersos em uma solução eletrolítica, onde há dois tipos de correntes produzidas, (I) a corrente faradaica, que é produzida pelo processo de oxirredução do analito e (II) a corrente capacitiva, que é a corrente proveniente do carregamento/descarregamento da dupla camada elétrica na interface eletrodo-solução (BARD e FAULKNER, 2001).

Os eletrodos são denominados como, Eletrodo de Trabalho (ET), Eletrodo de Referência (ER) e Contra Eletrodo (CE). Em voltametria, a célula é composta por três eletrodos que apresenta uma boa adequação para realização de medidas em sistemas diluídos, favorecendo o uso de eletrólitos diluídos e pela aplicabilidade em sistemas que apresente uma alta resistência a transferência de carga (PACHECO et al., 2013). É preferível o uso de eletrólitos de suporte que apresentem uma baixa resistência elétrica com a finalidade de facilitar o processo redox na célula eletroquímica.

Os principais materiais utilizados como ET são cobre, platina, ouro, diamante dopado com boro (DDB), carbono vítreo (CV), fibra de carbono, grafite pirolítico, pasta de carbono (que consiste numa mistura de óleo mineral, grafite) dentre outros. (BARD et al., 2001, 2008, HOLLER, 2009). Os eletrodos de CV são os mais utilizados (frente aos eletrodos de metais nobres) por apresentarem baixa corrente de fundo, inercia química e uma ampla janela de potencial para as medidas voltamétricas (USLU e OZKAN, 2007).

O ER apresenta uma alta resistência a passagem de corrente, conferindo um potencial constante durante todo o processo de oxirredução, atribuindo ao ET e CE a passagem de corrente durante todo o processo eletroquímico.

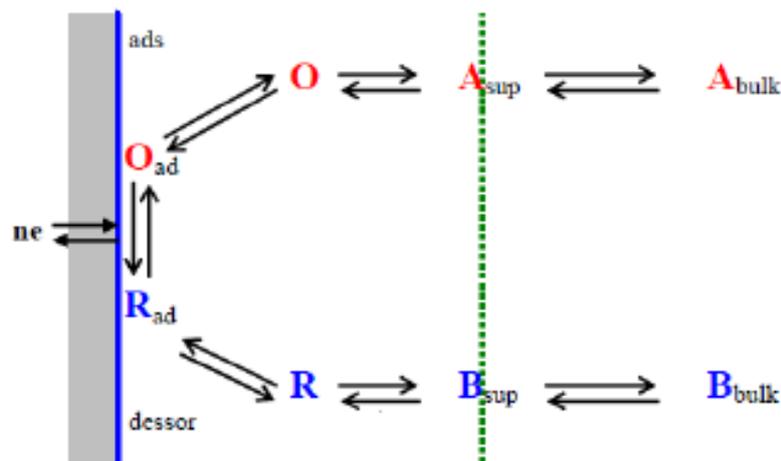
Eletrodos de referência que apresentam uma fácil aplicação, manufatura e que são robustos em diversas aplicações são os mais utilizados como substituinte

ao antigo eletrodo padrão de hidrogênio (EPH), os mais comuns e utilizados atualmente como ER em medidas voltamétricas são o eletrodo de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) e o eletrodo de calomelano saturado (ECS) (HOLLER, 2009).

O CE tem como função a promoção da passagem de corrente entre a fonte de sinal e o eletrodo de trabalho (ET), os materiais mais comuns usados para construção do CE são de espécies químicas inertes como ouro, platina etc. Eletrodos de bastão de platina são os mais comumente empregados em medidas voltamétricas (SKOOG, 2013).

O processo redox é promovido quando espécies químicas se aproximam da superfície do ET, ocorrendo assim uma reação de oxidação e/ou redução do analito. A aproximação do analito à superfície eletroativa do ET é promovido pelo processo de transferência de massa, que ocorre na chamada interface eletrodo-solução. Como pode-se ver na **Figura 2**, num processo redox, primeiramente ocorre a transferência de massa do analito para superfície do eletrodo, pelo qual em seguida, há a transferência de carga entre o ET e o analito, que por fim é acompanhado por processos químicos promovidos pela transferência de elétrons entre o analito e o eletrodo (PACHECO et al., 2013).

Figura 2. Mecanismo de transporte de massa do analito na interface eletrodo solução.



Fonte: PACHECO et al., 2013

Durante as medidas voltamétricas podem ocorrer três mecanismos de transporte de massa na interface eletrodo-solução, convecção, migração e difusão.

A convecção é promovida por processos mecânicos, como exemplo, agitação magnética do meio. A migração é caracterizada pela mobilidade de íons em solução, que sofrem atração de um campo magnético, como por exemplo, quando as espécies apresentam cargas positivas (cátion) são atraídas pelo eletrodo com excesso de cargas negativas em sua superfície. Já a difusão é promovida por um gradiente de concentração, devido a diferença de concentração entre duas regiões na interface eletrodo-solução, os íons ou moléculas neutras tendem a difundir da região mais concentrada para a região mais diluída (HOLLER, 2009).

As técnicas voltamétricas mais utilizadas para realização de estudos eletroquímicos são a voltametria cíclica (VC), a voltametria de pulso diferencial (VPD) e a voltametria de onda quadrada (VOQ).

3.2.1 Voltametria Cíclica

A Voltametria Cíclica (VC) é uma técnica bastante importante, que fornece uma análise quantitativa e qualitativa de um processo redox, sendo importante no estudo da formação de intermediários de uma reação, como também, na análise de produtos formados na superfície do eletrodo de trabalho. A VC nos dá informações acerca da termodinâmica dos processos de oxirredução e nos fornece informações acerca da cinética da reação da transferência de elétrons no processo eletroquímico (WANG, 2000; SKOOG, 2013).

Na VC as varreduras de potencial são realizadas de forma geral em duas direções, as medidas são realizadas na direção de potenciais positivos (+E), e em seguida são realizadas na direção de potenciais negativos (-E). As medidas podem ser realizadas em um ciclo inteiro, ciclos parciais ou vários ciclos (SKOOG, 2013).

Para uma reação totalmente reversível, existem dois componentes principais que determinam as reações que ocorrem no eletrodo, a transferência de massa de natureza difusional e a transferência heterogênea de carga entre o analito e a solução. A corrente de pico é descrita pela equação 1 para sistemas que apresentam caráter nernstiano (PACHECO et al., 2013).

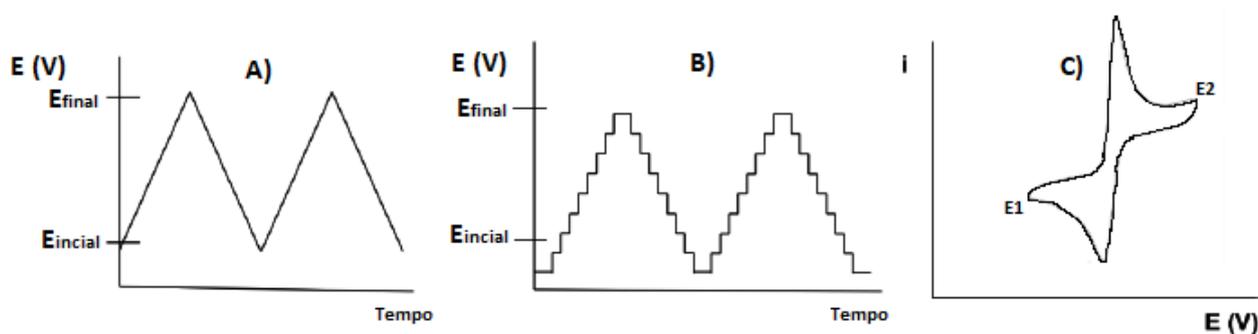
$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{2/3} A D_0^{1/2} \nu^{1/2} C_0$$

Equação 1

Onde, i_p é a corrente de pico (que pode ser catódica ou anódica) em ampères, n é o número de elétrons envolvidos no processo, A é a área do eletrodo em cm^2 , D_0 é o coeficiente de difusão em $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$, v é a velocidade de varredura em V s^{-1} e C_0 é a concentração inicial do analito em mol cm^{-3} (PACHECO et al., 2013).

Em voltametria cíclica o sinal de excitação é obtido de medidas de potencial em função do tempo, obtendo-se um perfil de excitação na forma triangular descrita na **Figura 3A**, com rampa de potencial entre E_{inicial} e E_{final} . Na **Figura 3B** é realizada a varredura de potencial na forma de escada (*staircase*), com degraus de potenciais da ordem de 10 mV e tempo de duração de 50 ms. Na **Figura 3C** é mostrada a medida de corrente em função do potencial aplicado ao ET, em sistemas reversíveis, obtém-se perfis quase simétricos nos processos catódicos e anódicos (PACHECO et al., 2013, HOLLER, 2009).

Figura 3. Medidas de potencial em VC: A) medidas de potencial por varredura linear, B) medidas de potencial por staircase e C) voltamograma de um processo reversível.



Fonte: PACHECO et al., 2013.

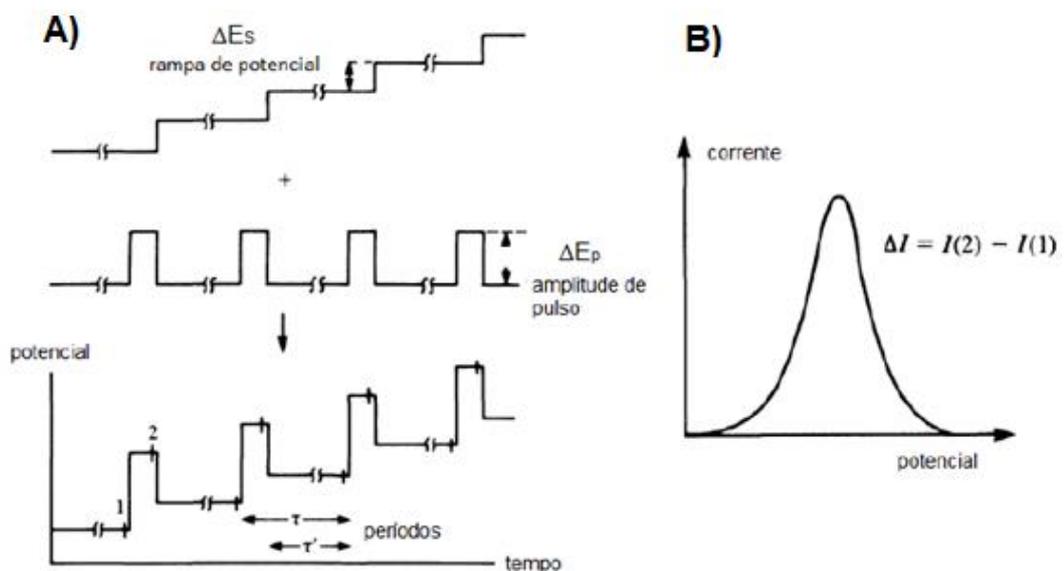
3.2.2 Voltametria de Pulso Diferencial

A voltametria de pulso diferencial (VPD) é uma técnica que apresenta alta sensibilidade, com limites de detecção da ordem de 10^{-7} a $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, resultado da diferença entre a corrente faradaica e a capacitiva (\uparrow corrente faradaica e \downarrow corrente capacitiva), contribuindo no aumento da razão sinal-ruído. Nesta técnica, pulsos de potencial (ΔE_p) sucessivos são aplicados sobre uma rampa ou escada de potencial (ΔE_s) com incremento em intervalos periódicos de tempo e iguais amplitudes, onde a corrente medida é lida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso e a outra no

final da vida do pulso, o objetivo de realizar duas medidas de corrente é obter uma contribuição essencialmente faradaica ao final da medida. (BARD et al., 2001, 2008).

A **Figura 4A** mostra como o potencial é aplicado ao eletrodo de trabalho e a **Figura 4B** mostra o voltamograma resultante para a VPD.

Figura 4. (A) Esquema de aplicação de potencial e (B) Voltamograma típico para DPV (I vs. E).



Fonte: BARD et al., 2008.

O voltamograma em VPD apresenta uma corrente de pico que apresenta forma gaussiana, sendo a área abaixo da curva diretamente proporcional a concentração do analito de interesse. Cujas forma é definida pela equação a seguir:

$$i_p = \frac{nFACD^{1/2}}{\sqrt{\pi t_m}} \left(\frac{1-\sigma}{1+\sigma} \right) \quad \text{Equação 2}$$

Onde i_p corresponde a corrente de pico (μA), n é o número de elétrons envolvidos na reação, F é a constante de Faraday (C), A é a área eletroativa do eletrodo de trabalho (cm^2), t_m é a diferença de tempo entre a segunda e a primeira medida (s), C é a concentração do analito ($mmol L^{-1}$), D é o coeficiente de difusão

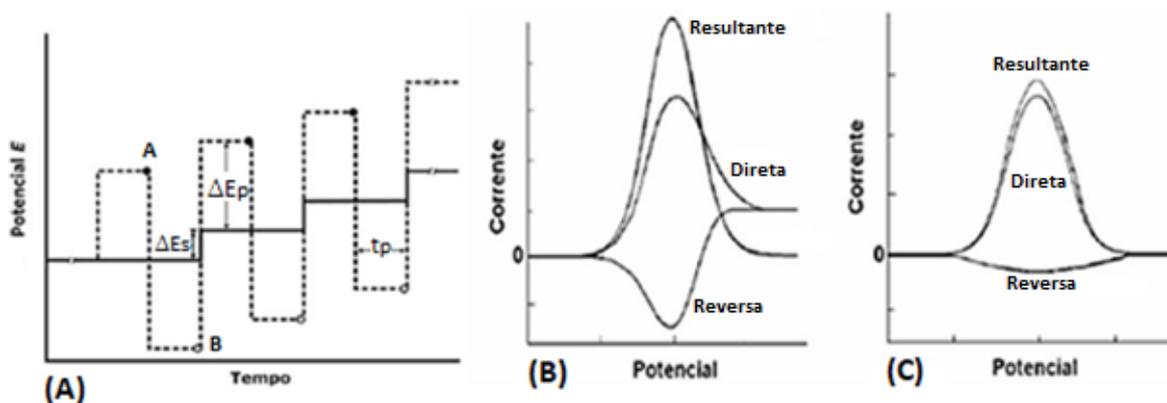
($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$) e σ é a relação $\exp(nF\Delta E/2RT)$ (BRETT E BRETT, 1996; BARD et al., 2008).

3.2.4 Voltametria de Onda Quadrada

A voltametria de onda quadrada (VOQ) é uma técnica que apresenta uma alta sensibilidade e alta velocidade de varredura. O sinal de excitação dessa técnica é obtido a partir da combinação de um conjunto de pulsos (ΔE_p) de iguais amplitudes com escada de potencial (ΔE_s) oscilando em períodos iguais ($2t_p$), conforme a **Figura 5A**. A corrente resultante (Δi) é obtida pela diferença entre a corrente direta e reversa ($\Delta i = i_{\text{direta}} - i_{\text{reversa}}$). Em sistemas reversíveis, onde a corrente direta e reversa apresenta valores quase semelhantes de amplitude, a soma da corrente resultante (Δi) é maior que a das correntes individuais (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

Melhores resoluções são obtidas em sistemas reversíveis como descrito na **Figura 5B**, pois nesse sistema a soma dos valores da corrente direta e reversa produz uma corrente resultante (Δi) com pico acentuado. Em sistemas irreversíveis há um pequeno incremento na corrente resultante pois a corrente reversa apresenta valor próximo de zero ($i_{\text{direta}} \leq \Delta i$), como representado na **Figura 5C** (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

Figura 5. (A) Esquemática do sinal de excitação da VOQ e voltamogramas de um sistema reversível (B) e irreversível (C).



Fonte: BRETT e BRETT, 1996; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002; SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003.

A VOQ apresenta sensibilidade próxima as técnicas cromatográficas, esse fato está atribuído à eliminação da corrente capacitiva, que é minimizada pelo fato de todas as medidas serem realizadas no mesmo intervalo de tempo, em outras palavras, há uma melhoria na resolução das medidas de corrente em função do potencial Δi vs E_p (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

3.3 Pontos quânticos de carbono

Os pontos quânticos de carbono (PQCs) são nanopartículas descobertas acidentalmente em 2004, a partir de uma análise eletroforética e de purificação de nanotubos de carbono de parede simples (XU et al., 2004). Desde sua descoberta, esses nanomateriais orgânicos vem ganhando cada vez mais espaço em aplicações científicas, sobretudo, por apresentarem propriedades como, resistência a fotodegradação, facilidade de bioconjugação, fotoestabilidade, baixa toxicidade, solubilidade em solventes orgânicos, transferência eletrônica fotoinduzida, eletroquimioluminescência (ECL), e eficiência quântica (MACHADO et al., 2015; LIU et al., 2009; BAKER et al., 2010).

Em virtude de sua capacidade de absorção óptica em toda região UV-Vis, e por apresentarem ótima solubilidade em solventes orgânicos e facilidade de funcionalização de sua superfície, os PQCs tem sido empregado no desenvolvimento de biosensores, como também, de dispositivos fotovoltaicos e fotocatalíticos (MACHADO et al., 2015).

Esses nanomateriais orgânicos apresentam rotas sintéticas simples e de baixo custo, e por isso têm sido amplamente empregados em medidas analíticas e bioanalíticas (WANG e HU, 2014). Recentemente diversos trabalhos têm sido desenvolvidos utilizando os PQCs para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos.

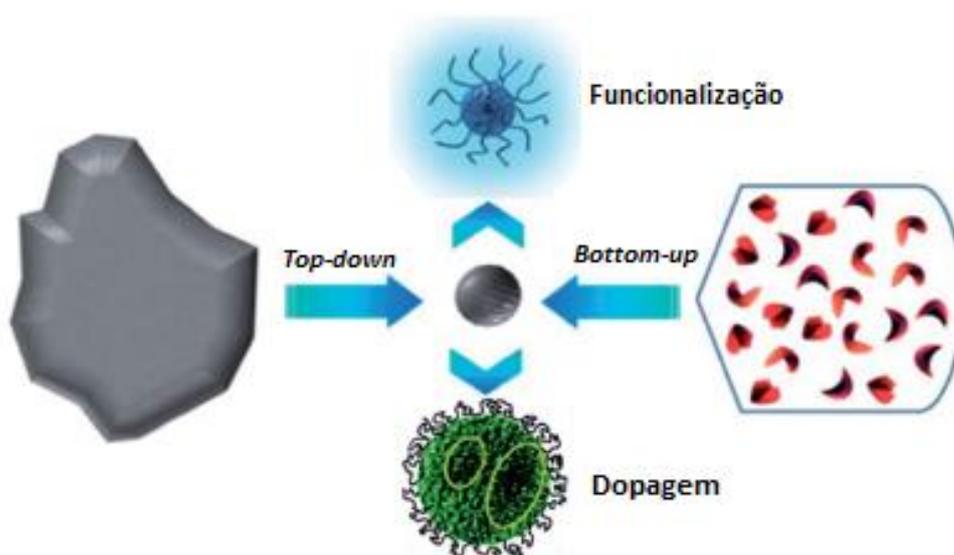
Os PQCs apresentam estrutura quase-esférica de tamanhos menores que 10 nm, com estruturas gráficas de carbonos sp^2 em seu interior, apresentando diversos grupos polares (hidroxila, carbonila, alquila e radicais de carboxila). As propriedades ópticas (fotoluminescência) dos PQCs é exclusivamente dependente do tamanho

das nanopartículas, como também da rota sintética (WANG e HU, 2014; MACHADO et al., 2015).

Esses nanomateriais podem ser produzidos por métodos químicos ou físicos, a depender do precursor utilizado para síntese. Os métodos físicos são chamados de *top-down* e os métodos químicos de *bottom-up*. Na abordagem do tipo *top-down*, faz-se uso de técnicas de irradiação por micro-ondas, descarga de arco voltaico, ablação a laser, tratamento com plasma, tratamento ultrassônico etc. (LU et al., 2009; TIAN et al., 2009; PENG e TRAVAS-SEJDIC, 2009; PAN et al., 2012; WANG et al., 2011; JIONG et al. 2011). Na abordagem do tipo *bottom-up*, são empregados um tratamento do tipo hidrotermal/solvotermal, combustão, oxidação ácida, pirolise térmica etc. (KWON et al., 2014; CAO et al., 2007; HU et al., 2009).

No método físico utiliza-se precursores de carbono de cadeias grandes, como exemplo, diamante, grafite, óxido de grafite e nanotubos de carbono. Nos métodos químicos é empregado precursores de carbono moleculares, como exemplo, ácido cítrico, frutose, glicose, ureia e resina, que podem ser purificadas a partir da centrifugação, filtração, eletroforese, dialise etc. (WANG e HU, 2014). A **Figura 6** ilustra a via de obtenção dos PQC's e a subsequente modificação de sua estrutura (funcionalização ou modificação).

Figura 6. Esquemática dos métodos de obtenção dos PQC's a partir de métodos *bottom-up* e *top-down* e subsequente modificação.



Fonte: WANG e HU, 2014.

4. METODOLOGIA

4.1 Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (Milli-Q, condutividade de $0,1 \leq \mu\text{S cm}^{-1}$). Os reagentes utilizados para o preparo das soluções tampão, triptamina, histamina e ferrocianeto de potássio são de pureza analítica, adquiridos da Sigma-Aldrich. Na **Tabela 2**, estão listadas as composições das soluções tampão usadas como eletrólito de suporte. Para os estudos eletroquímicos, as soluções de triptamina e histamina foram preparadas pela dissolução dos respectivos sólidos em água deionizada (Milli-Q).

Tabela 2. Soluções usadas como eletrólito de suporte

pH	Composição (Volume em mL)
3,5	0,2 mol L ⁻¹ CH ₃ COONa (3,7) + 0,2 mol L ⁻¹ CH ₃ COOH (46,3) + H ₂ O (50)
4,5	0,1 mol L ⁻¹ CH ₃ COONa (50) + 0,2 mol L ⁻¹ CH ₃ COOH (50)
6,0	0,2 mol L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ (6,15) + 0,2 mol L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ (43,85) + H ₂ O (50)
7,0	0,2 mol L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ (30,5) + 0,2 mol L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ (19,5) + H ₂ O (50)
8,5	0,2 mol L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ (47,35) + 0,2 mol L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ (2,65) + H ₂ O (50)
10,5	0,025 mol L ⁻¹ Na ₂ B ₄ O ₇ .10 H ₂ O (50) + 0,1 mol L ⁻¹ NaOH (22,7) + H ₂ O (27,3)

4.1.1 Instrumentação e software

As medidas voltamétricas foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato Eco Chemie Autolab (Modelo PGSTAT 302N) controlado pelo software NOVA 2.1.3, com célula eletroquímica de 40 mL, composta pelo eletrodo de carbono vítreo, eletrodo de Ag/AgCl (KCl, 3,0 mol L⁻¹) e um fio de platina, como eletrodos de trabalho, de referência e contra eletrodo respectivamente.

4.2 Estudo da área eletroativa do eletrodo de trabalho (ET)

4.2.1 Procedimento eletroquímico

Inicialmente o ECV foi polido com spray de diamante em papel filtro, sendo a limpeza efetuada através de movimentos circulares do eletrodo em relação ao papel e posterior lavagem (de forma abundante) com água deionizada. As medidas foram realizadas com diluição do ferrocianeto de potássio diretamente na célula eletroquímica contendo 20 mL de tampão fosfato pH 7. Foi empregado a voltametria cíclica (VC), com os parâmetros pré-definidos em janela de potencial de -0,3 a +0,7 V vs. Ag/AgCl, sendo realizadas 10 medidas individuais com velocidade de varredura de 15, 25, 35, 50, 75, 100, 150, 200, 300 e 500 mV s⁻¹ respectivamente.

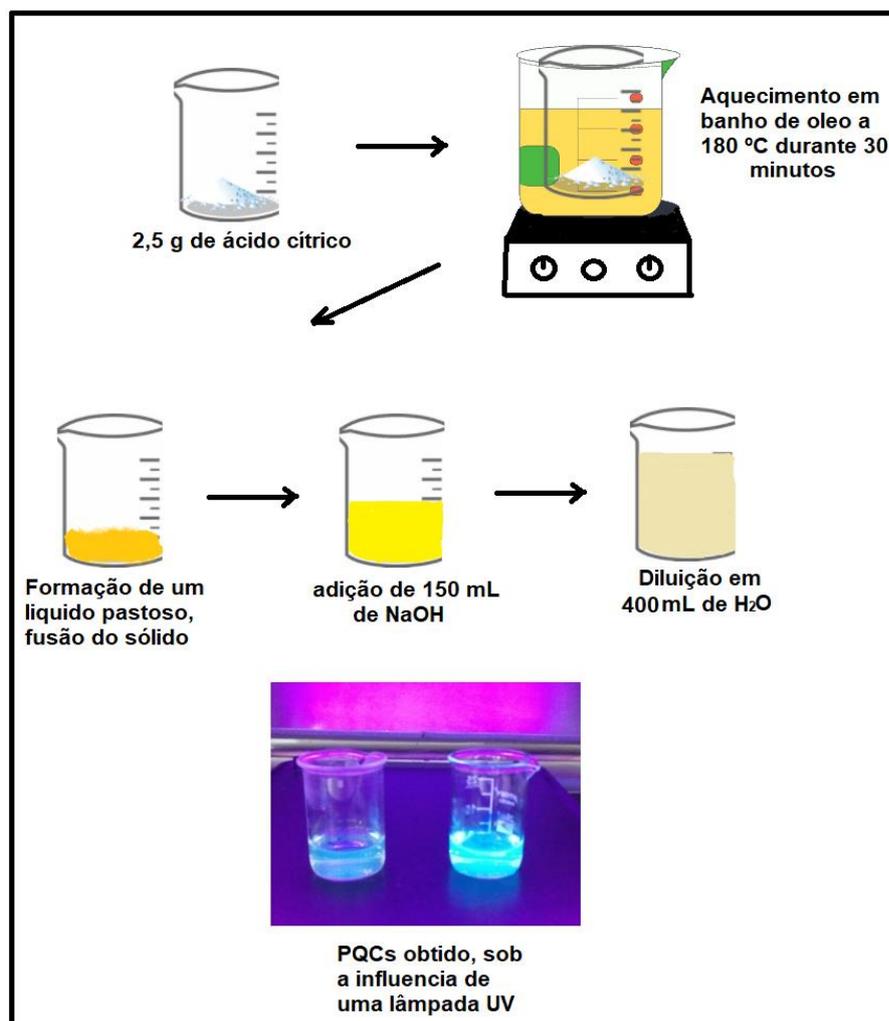
4.3 Síntese dos pontos quânticos de carbono

Os pontos quânticos de carbono (PQCs) foram obtidos via tratamento hidrotérmico, a partir do ácido cítrico (ou ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico) como bioprecursor, juntamente com NaOH (0,25 mol L⁻¹), o procedimento foi realizado com base na literatura (CHEN et al, 2017).

A metodologia utilizada foi a partir de uma abordagem do tipo *bottom-up*, que consiste num tratamento hidrotérmico, por aquecimento em banho de óleo. Primeiramente, 2,50 g de ácido cítrico foram aquecidos e fundidos em banho de óleo a temperatura controlada de 180 °C durante 30 minutos, após esse período de aquecimento obtém-se um líquido laranja, indicando a formação dos PQCs (CHEN et al, 2017), posteriormente foi adicionado a esse líquido, 125 mL de solução de NaOH (0,25 mol L⁻¹) sob agitação vigorosa em pH 7, por fim, os PQCs foram diluídos em 400 mL de água deionizada e refrigerados a 3,0 °C, todo o procedimento foi realizado seguindo a literatura (CHEN et al, 2017).

A **figura 7** esquematiza de forma didática o processo de síntese dos PQCs pelo uso de uma metodologia do tipo *bottom-up*.

Figura 7. Esquemática do processo de síntese dos PQC's a partir do ácido cítrico.



Fonte: Adaptado pelo autor

4.4 Modificação do ECV com PQC's

Inicialmente, o ECV foi polido em spray de diamante para garantir a limpeza da superfície do eletrodo antes da modificação química. O método de modificação foi realizado segundo o procedimento da literatura (Chen et al, 2017). Uma solução para realização da modificação foi feita a partir da mistura de 5 mL do PQC's (discutido no item 4.3) com 25 ml de tampão acetato pH 3,5 e 7,1 mg de β -Ciclodextrina (β -CD), que foi solubilizado com o emprego de um ultrassom durante 30 minutos de sonicação. A modificação do eletrodo de carbono vítreo foi realizada na solução modificante (PQC's/ β -CD) em tampão acetato pH 3,5 ($\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$), realizando 8 (oito) ciclos sucessivos, utilizando a VC, com janela de potencial de -1,0 a +1,0 V e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

4.5 Determinação simultânea de Triptamina (TPM) e Histamina (HTM)

Após a modificação eletroquímica, foi realizada a medida simultânea da TPM e HTM utilizando o procedimento de voltametria de onda quadrada. As medidas voltamétricas foram realizadas em tampão fosfato pH 7, onde a concentração dos analitos estudados foi de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. Foi realizado o estudo dos parâmetros voltamétricos (**Tabela 3**) fazendo uso da voltametria de onda quadrada.

Tabela 3. Estudo dos parâmetros ótimos para as medidas voltamétricas em voltametria de onda quadrada (VOQ).

Parâmetros VOQ	Faixa
Janela de potencial	0 – 1,4 V
Amplitude de pulso	10 - 100 mV
Frequência de pulso	15 - 150 Hz
Incremento	1 - 10 mV

4.6 Estudo de pH

Subseqüentemente, foi realizado o estudo do pH para as medidas simultâneas da TPM e HTM, fazendo uso das soluções tampão mostradas na (**Tabela 2**). Esse estudo foi realizado a partir do uso da VPD com janela de potencial de 0,0 a +1,4 V, incremento de potencial de 5 mV, amplitude de pulso 25 mV e tempo de modulação de 50 ms. A faixa de pH estudada foi de $3,5 \leq \text{pH} \leq 10,5$ e a concentração dos analitos (HTM e TPM) em $50 \mu\text{mol L}^{-1}$.

4.7 Curva analítica, Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)

Foi realizado o levantamento da curva analítica numa faixa de concentração de $12,5 - 25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para TPM e de $25,0 - 50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para HTM. Em seguida

foi determinado o limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação, onde o LOD indica a menor quantidade de um analito presente em uma respectiva matriz que uma técnica de interesse analítico pode mensurar e o LOQ determina a menor concentração do analito com precisão e exatidão consideráveis. Os cálculos de LOD e LOQ foram realizados com o emprego das equações 3 e 4 descritas abaixo.

$$LOD = \frac{3s_b}{b} \quad \text{Equação 3}$$

$$LOQ = \frac{10s_b}{b} \quad \text{Equação 4}$$

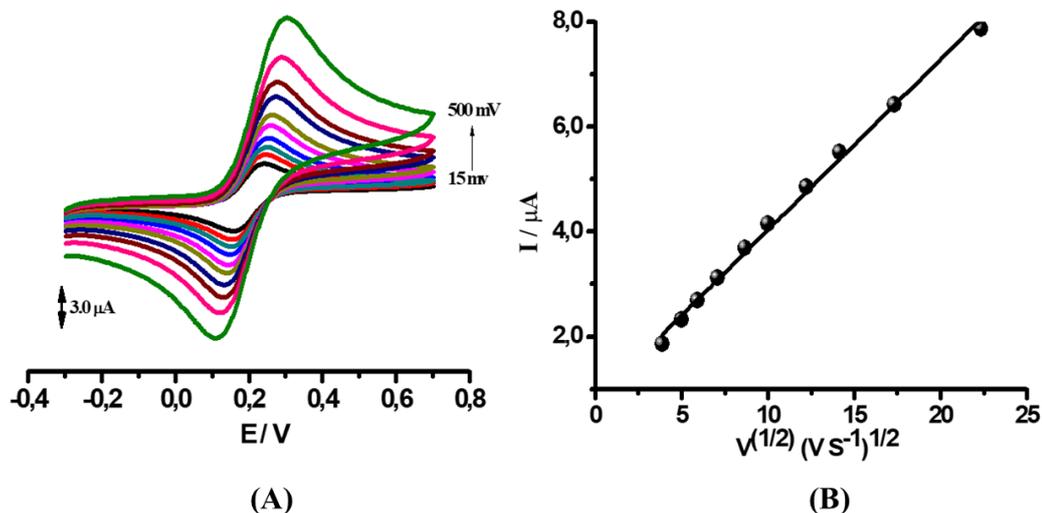
Onde, s_b é o desvio padrão do sinal da curva analítica e b é o coeficiente angular da curva analítica. Para os cálculos foi determinado o desvio padrão a partir das medidas de 10 brancos em tampão fosfato pH 7,0. Fazendo uso da VOQ, com os mesmos parâmetros obtidos no levantamento da curva analítica (discutido no item 4.5).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Área eletroativa do eletrodo de trabalho

Primeiramente, a partir de medidas voltamétricas de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ utilizando a VC, com velocidades de varredura de 15 – 500 mV s^{-1} , foram obtidos valores de correntes de pico referentes ao processo de oxidação do Fe(II) / Fe(III). Para o cálculo da área eletroativa (A) do ECV, foi necessário plotar um gráfico com os valores de corrente ($I_{p,a}$) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($V \text{ s}^{-1})^{1/2}$, como pode ser visto na **figura 8**, o cálculo de (A) só foi possível com o emprego da equação 1.

Figura 8. (A) Voltamogramas cíclicos de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, em $\text{pH} = 7,0$ em diferentes velocidades de varredura. (B) Relação de I_p vs. $v^{1/2}$ (V s^{-1}) $^{1/2}$.



A - Área eletroativa do eletrodo (cm^2);

n - Número de elétrons;

D_0 - Coeficiente de difusão;

[D] - Concentração da espécie oxidada na solução (mol cm^{-3});

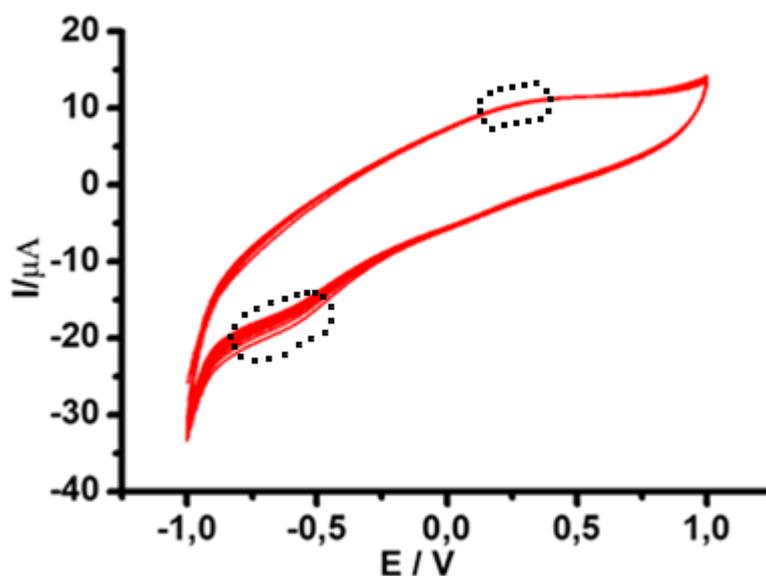
v - Velocidade de varredura (V s^{-1}).

Sabendo que $D = 7,35 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $C_0 = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, obteve-se o valor de $0,137 \text{ cm}^2$, valor correspondente a área eletroativa (A) do ECV.

5.2 Modificação do ECV

O processo de modificação foi realizado com base na literatura (CHEN et al, 2017), a partir de uma solução de 5 mL de PQC's, 25 mL de tampão acetato ($\text{pH} 3,5$) e 7,1 mg de β -CD, onde foi possível observar a partir dos 8 ciclos de varredura efetuados, que há um perfil redox referente à modificação do ECV com as nanopartículas que pode ser visualizada na **Figura 9**. Um perfil de oxidação pode ser visto entre 0,25 a 0,50 V (corrente de pico em $10 \mu\text{A}$) e perfil de redução entre -0,75 a -0,50V (corrente de pico em aproximadamente $-20 \mu\text{A}$), como destacado na figura abaixo.

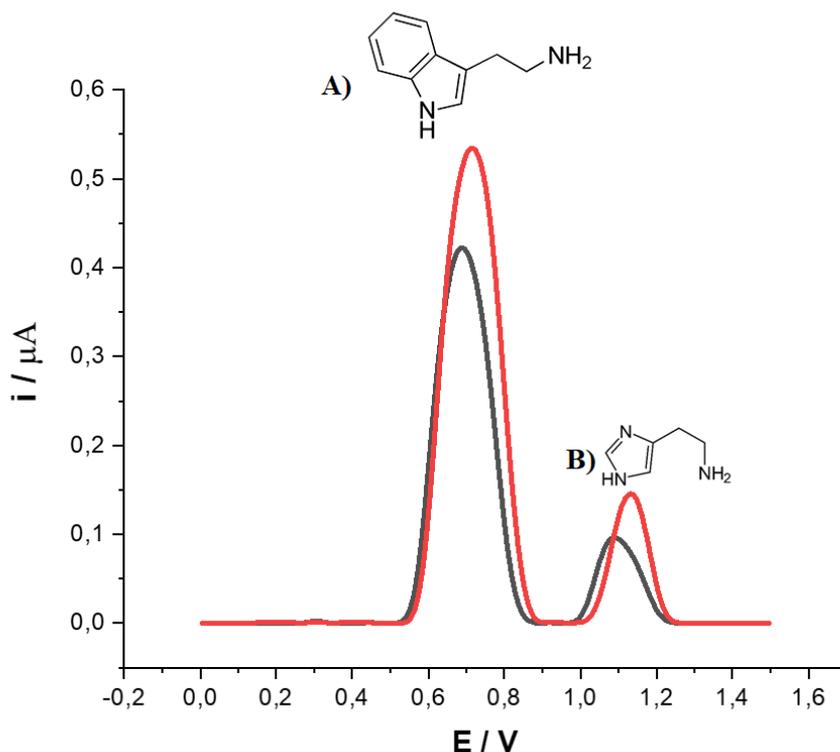
Figura 9. Voltamograma cíclico da modificação do ECV utilizando PQC.



5.3 Comportamento eletroquímico da triptamina e da histamina sobre o ECV modificado e não modificado

O comportamento eletroquímico da TPM e HTM sobre os eletrodos de carbono vítreo modificado e não modificado foi investigado por VOQ, numa janela de potencial de 0,0 V a 1,4 V em solução tampão fosfato pH 7,0. A partir desses resultados observou-se um ganho significativo na corrente de pico quando utilizou-se o ECV modificado com os PQC/ β -CD, o ganho adicional na corrente de pico pode ser visto na **Figura 10**. Para o ECV modificado com PQC/ β -CD foram obtidas as seguintes medidas de corrente de pico: $5,345 \times 10^{-7}$ A para a TPM e $1,455 \times 10^{-7}$ A para a HTM.

Figura 10. Voltamogramas de onda quadrada das ABs (50 $\mu\text{mol/L}$) em tampão fosfato pH 7,0. (A) Triptamina e (B) Histamina usando o ECV não modificado (—) e ECV modificado com PQC/ $\beta\text{-CD}$ (—).

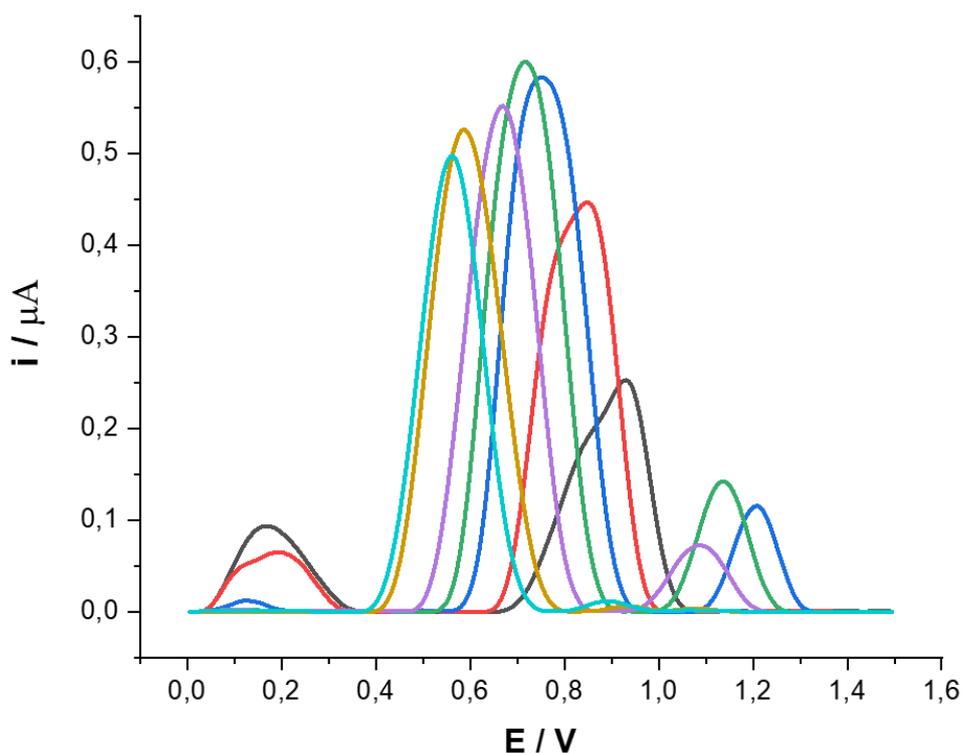


De acordo com Chen et al (2017), os PQCs promoveram a formação de uma película condutora, que produz uma diminuição na resistência à transferência de carga, causando assim um aumento no valor das correntes de pico após a modificação do ECV e, conseqüentemente aumentando a sensibilidade do método desenvolvido.

5.4 Estudo de pH da Triptamina (TPM) e da Histamina (HTM)

A voltametria de pulso diferencial foi utilizada para avaliar a influência do pH nas medidas voltamétricas dos dois analitos (**Figura 11**). Para realização desse estudo foi utilizada uma solução de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ da mistura entre a TPM e a HTM numa faixa de pH de 3,5 a 10,5. A partir desse estudo foi observado que a melhor resposta eletroquímica foi obtida numa solução tampão fosfato pH 7,0, com resposta voltamétrica em torno de 0,72 V para a TPM e 1,14 V para a HTM.

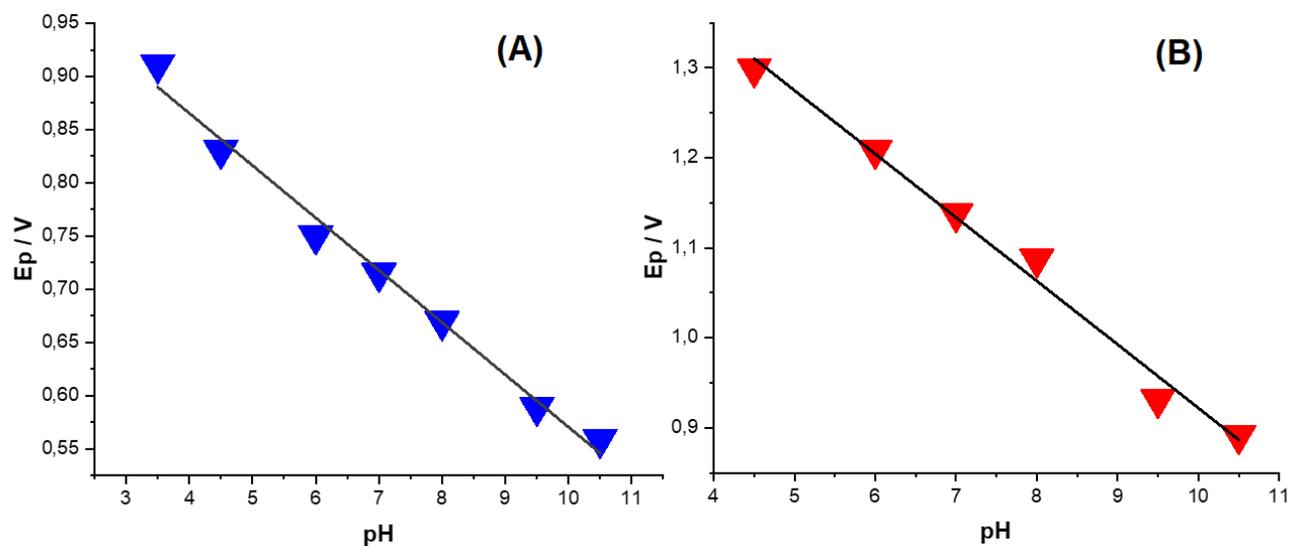
Figura 11. Influência do pH na resposta voltamétrica das ABs usando ECV modificado com PQCs em tampão acetato pH 3,5 (—) e pH 4,5 (—); e em tampão fosfato pH 6,0 (—); pH 7,0 (—) e pH 8,5 (—), tetraborato pH 9,5 (—) e tetraborato pH 10,5 (—).



Os sinais que surgiram na faixa de 0,0 a 0,3 V são referentes ao processo redox dos PQCs, onde os maiores sinais são obtidos em condição ácida.

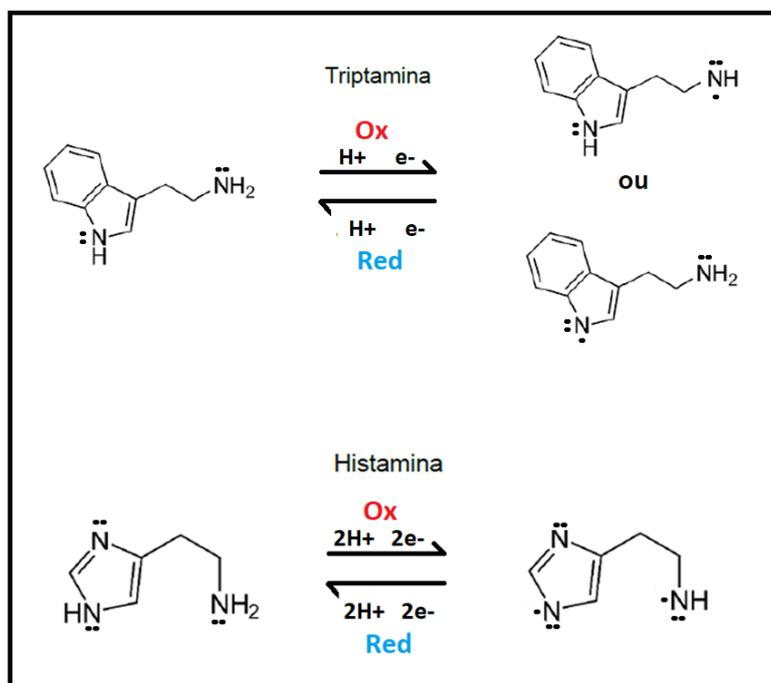
Foi determinado o número de elétrons envolvidos no processo redox da TPM e HTM através da largura de pico à meia altura ($W_{1/2}$) obtidos na faixa $3,5 \leq \text{pH} \leq 10,5$ para a TPM e de $4,5 \leq \text{pH} \leq 10,5$ para a HTM. Para a TPM foi obtido um valor de $W_{1/2}$ igual a 92 mV, de acordo com a equação ($W_{1/2} = 90/n$), a oxidação da TPM envolve a transferência de apenas 1 elétron. Para a HTM foi obtido um valor de $W_{1/2}$ igual a 53 mV, indicando que a reação de oxidação da HTM envolve a transferência de 2 elétrons. A relação entre o E_p vs. pH (**Figura 12**), forneceu um coeficiente angular de $-49,2$ mV/pH para TPM e $-70,6$ mV/pH para a HTM, esses resultados indicam que as reações de oxidação das amins envolvem o mesmo número de prótons e elétrons, ou seja, $(1\text{H}/1\text{e}^-)$ um próton e um elétron para a TPM e, $(2\text{H}/2\text{e}^-)$ dois prótons e dois elétrons para a HTM.

Figura 12. Gráficos de E_p em função do pH dos voltamogramas de pulso diferencial da (A) TPM e (B) HTM.



Foi proposto um mecanismo referente ao processo redox da TPM e HTM em pH 7,0 ilustrado na **Figura 13**. Sendo que para a TPM é proposto a obtenção de dois produtos igualmente prováveis.

Figura 13. Ilustração dos mecanismos redox para a TPM e HTM.



5.5 Estudo de velocidade

O estudo de velocidade foi realizado com a finalidade de estudar os processos envolvidos na transferência de massa das espécies para a superfície do eletrodo, como também, na investigação do grau de reversibilidade da reação. Para isto, foi utilizada a técnica de VC em uma faixa de velocidade de varredura de 15 – 200 mV/s com a janela de potencial fixada de 0,0 a 1,5 V vs Ag/AgCl, em tampão fosfato pH 7,0.

As ABs apresentam perfis oxidativos em potenciais de resposta em $E_p \approx +0,82$ V para a TPM e $E_p \approx +1,16$ V para a HTM. Ambos os analitos apresentam uma eletroquímica irreversível, pelo qual pode-se notar que não há perfis de redução referente as varreduras catódicas da TPM e HTM.

As figuras 13 e 14 mostram a influência da velocidade de varredura sobre as respostas voltamétricas da triptamina e histamina respectivamente. A partir das curvas i vs $v^{1/2}$ (**figuras 14B**), observou-se que para a TPM a corrente de pico variou linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, enquanto para a HTM foi obtido um perfil não linear. Segundo a literatura, processos que apresentam linearidade são governados por difusão. Constata-se que para a TPM o processo de transferência de massa é governado por difusão, enquanto para a HTM não ocorre um processo difusional na superfície do ECV modificado com PQC β -CD. Aplicando o logaritmo de base 10 nas medidas de corrente em função da velocidade de varredura (**figuras 14C e 15B**), obtém-se os valores correspondentes aos coeficientes angulares para a TPM e HTM respectivamente. Para a TPM foi obtido um coeficiente angular de 0,65, entretanto para a HTM foi obtido um coeficiente angular de 1,31. Segundo a literatura valores próximos a 0,5 são processos governados por difusão, e valores próximos a 1,0 são processos governados por adsorção.

Figura 14. (A) Voltamograma cíclico em diferentes velocidades de varredura para uma solução de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TPM em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0); (B) Gráfico de i vs $v^{1/2}$; (C) Gráfico de $\text{Log } i$ vs $\text{Log } v$.

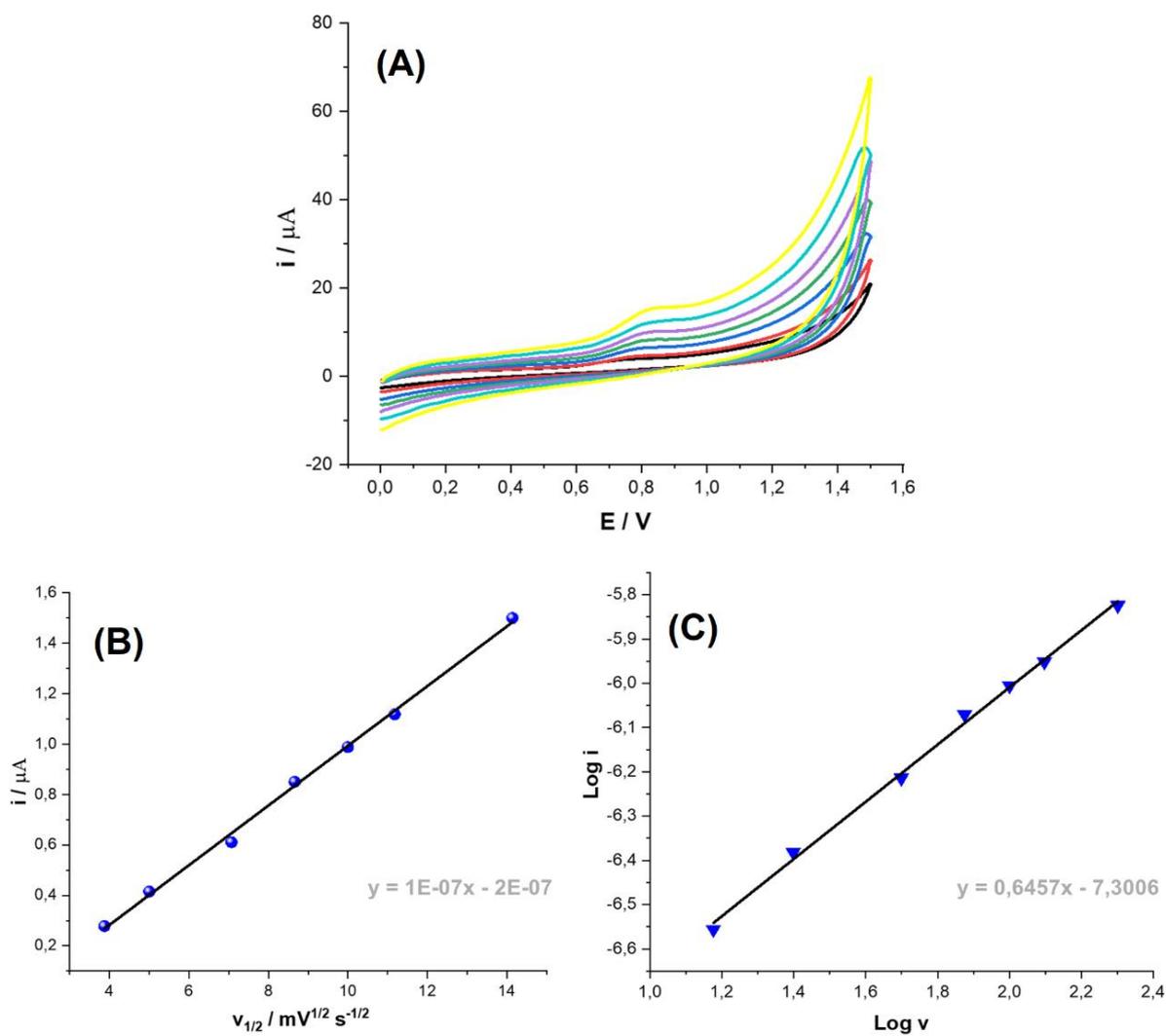
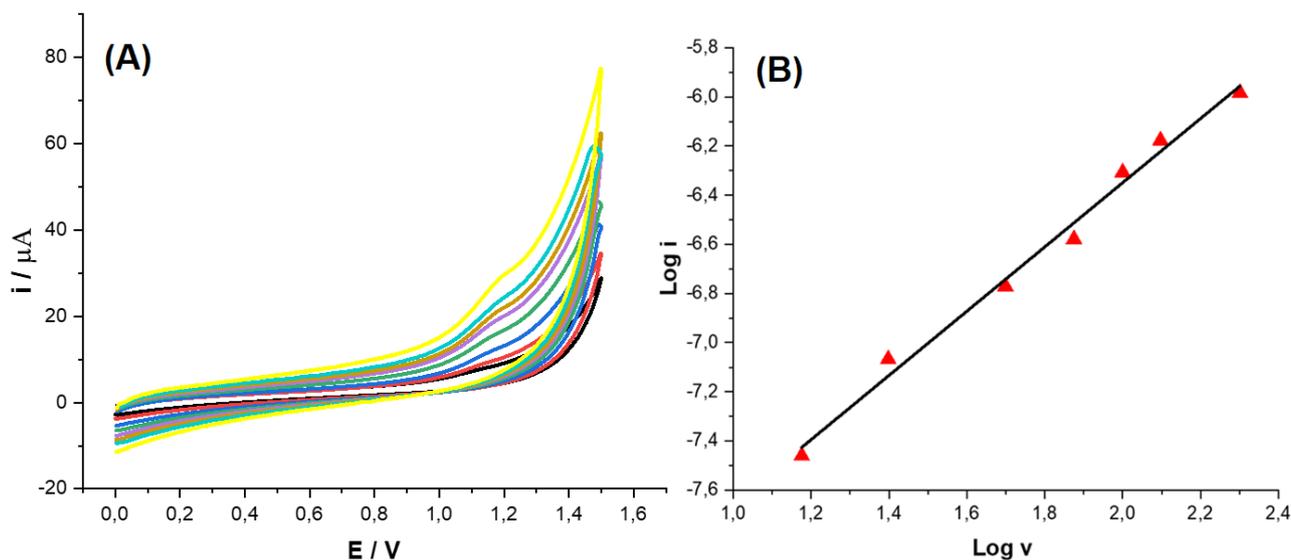


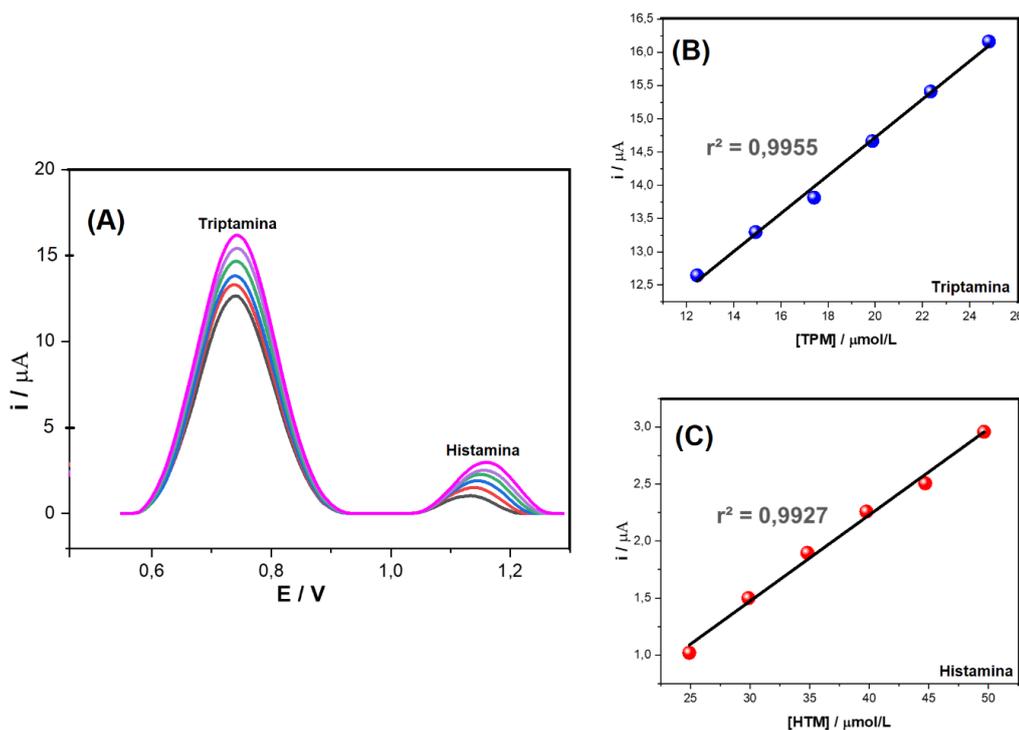
Figura 15. (A) Voltamograma cíclico em diferentes velocidades de varredura para uma solução de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HTM em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0); (B) Gráfico de $\text{Log } i$ vs $\text{Log } v$.



5.5 Curva analítica

Para a obtenção da curva analítica (**Figura 16**), utilizou-se uma solução de Triptamina $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e Histamina $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, sendo adicionadas alíquotas subsequentes de $5 \mu\text{L}$ de Triptamina ($2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e $20 \mu\text{L}$ de Histamina ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na célula eletroquímica contendo 20 mL de tampão fosfato pH 7,0. Foram realizadas 6 medidas sucessivas, resultando em uma faixa de concentração de $12,5 - 25 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a TPM e $25 - 50 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a HTM. A resposta voltamétrica para a TPM apresentou uma boa relação linear ($r^2 = 0,9955$, $n = 6$) o mesmo pode ser dito para a HTM ($r^2 = 0,9927$, $n = 6$).

Figura 16. Curva analítica SW. (A) Voltamogramas obtidos usando o ECV modificado com PCs/ β -CD para várias concentrações de TPM ($12,5 - 25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e HTM ($25,0 - 50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) Curva de calibração obtido para TPM; (C) Curva de calibração obtido para HTM; $f = 150 \text{ Hz}$, $\Delta E_p = 100 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$.



Foram obtidas as respectivas equações para TPM (Eq. 5) e HTM (Eq. 6):

$$i = 0,2864[\text{TPM}] + 9 \times 10^{-6} \quad \text{Equação 5}$$

$$i = 0,0755[\text{HTM}] - 8 \times 10^{-7} \quad \text{Equação 6}$$

5.6 Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)

Foram efetuadas 10 medidas de branco, pelo qual foi determinado a corrente de pico residual da TPM e HTM no ECV modificado com PQC/s/ β -CD sob tampão fosfato pH 7 usando a VOQ com os parâmetros otimizados (Tabela 2), onde foi obtido o desvio padrão amostral das 10 medidas do branco da TPM e HTM simultaneamente.

Para a TPM foi obtido um desvio padrão amostral (s_b) de $0,02414 \mu\text{A}$, sabendo que o coeficiente angular (b) obtido da curva analítica é igual a $0,2864 \text{ A L mol}^{-1}$, enquanto para a HTM foi obtido um desvio padrão amostral (s_b) de $0,01709 \mu\text{A}$, sabendo que o coeficiente angular (b) obtido da curva analítica é igual a $0,0755 \text{ A L mol}^{-1}$, se obtém os seguintes LOD e LOQ (tabela 4).

Tabela 4. Determinação dos limites de detecção e quantificação da TPM e HTM.

Sensibilidade	[TPM] / μmolL^{-1}	[HTM] / μmolL^{-1}
LOD	0,2529	0,6789
LOQ	0,8429	2,263

Os baixos limites de detecção e quantificação dão um bom indicativo acerca da sensibilidade do método empregado, demonstrando que a metodologia desenvolvida pode ser utilizada em amostras reais.

6. CONCLUSÃO

A partir dos estudos realizados com as ABs, foi possível observar que o uso do ECV modificado com os PQCs demonstrou que as nanopartículas contribuíram para um ganho adicional na corrente de pico, tanto para a triptamina quanto para a histamina em tampão fosfato, pH 7, tal comportamento está associado com a diminuição da resistência a transferência de carga do ECV.

Os estudos realizados em VPD mostraram que o pH da solução influencia na resposta voltamétrica das ABs, com valores ótimos de correntes em tampão fosfato, pH 7. Além disso, o estudo de velocidade mostrou que as reações de oxidação dessas ABs são governadas predominantemente por difusão para TPM e por adsorção para HTM.

A curva analítica foi obtida a partir do uso da técnica da VOQ, em uma faixa de 12,5 – 25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para TPM e 25,0 – 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para HTM em tampão fosfato, pH 7,0, utilizando uma frequência de pulso de 150 Hz, incremento de potencial de 5 mV, amplitude de pulso de 100 mV e janela de potencial de 0,0 – 1,4 V. Por fim, os estudos utilizando ECV modificado com PQC β -CD mostraram-se promissores, apresentando baixos limites de detecção e de quantificação, abrindo espaço para determinação simultânea desses analitos em amostras reais.

REFERÊNCIAS

ALGARRA, M.; GONZÁLEZ-CALABUIG, A.; RADOTIC, C.; MUTAVDZIC, D.; ANIA, C.O.; LAZARO-MARTINEZ, J.M.; JIMENEZ-JIMENEZ, J.; RODRIGUEZ-CASTELLON, E.; VALLE, M. **Enhanced electrochemical response of carbon quantum dot modified electrodes.** *Talanta*, 178, 679. 2018.

ANLI, R. E., VURAL, N., YILMAZ, S., & VURAL, Y. H. **The determination of biogenic amines in Turkish red wines.** *Journal of Food Composition and Analysis*, n.17, p. 53–62. 2004.

BAKER, S. N.; BAKER, G. A. **Luminescent carbon nanodots: emergent nanolights.** *Angewandte Chemie International Edition*, 49, 6726. 2010.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R., **Electrochemical Methods Fundamentals and Applications.** 2^a ed. New York: John Wiley & Sons, INC, 2001.

BHADRA, B. N.; SONG, J. Y.; LEE, S. -K.; HWANG, Y. K.; JHUNG, S. H. **Adsorptive removal of aromatic hydrocarbons from water over metal azolate framework-6-derived carbons.** *Journal of Hazardous Materials*, 344, 1069- 1077. 2018.

BIGGER, C.A.; PONTEN, I.; PAGE, J.E.; DIPPLE, A. **Mutational spectra for polycyclic aromatic hydrocarbons in the supF target gene.** *Mutation Research*, 450,75. 2000.

BUENO-SOLANO, C.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; SÁNCHEZ-MACHADO, D. I.; CAMPAS-BAYPOLI, O. N. **HPCL determination of histamine, tyramine and amino acids in shrimp by-products.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 1, n. 23, p. 96–102. 2012.

Brett, A. M. O.; Brett, C. M. A. **Eletroquímica princípios, métodos e aplicações.** Coimbra: Livraria Almedina, 1996.

CAO, L.; WANG, X.; MEZIANI, M. J.; LU, F.; WANG, H.; LUO, P. G.; LIN, Y.; HARRUFF, B. A.; VECA, L. M.; MURRAY, D.; XIE, S.-Y.; SUN, Y.-P. **Carbon dots for multiphoton bioimaging.** *Journal of The American Chemical Society*, 129, 11318. 2007.

CHEN, J.; HE, P.; BAI, H.; HE, S.; ZHANG, T.; ZHANG, X.; DONG, F. **Poly(β -cyclodextrin)/carbon quantum dots modified glassy carbon electrode: Preparation, characterization and simultaneous electrochemical determination of dopamine, uric acid and tryptophan.** *Sensors and Actuators B: Chemical*, 252, 9–16. 2017.

CONTRERAS, M. et al. **Determinación de aminas biógenas en quesos madurados.** *Rev. Cient. (Maracaibo)*, Maracaibo, v. 17, n.1, p. 89-95, 2007.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E. J. T.; NUNEZ, M. **Formation of biogenic amines in raw milk Hispánico cheese manufactured with proteinases and different levels of starter culture.** *J Food Prot*; 63(11):1551-1555, 2000.

FDA (CFSAN). **Scombrototoxin (histamine) formation.** In: **Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood.** *Fish and fishery products hazards and controls guide.* 3th ed. Washington: Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood; 2001.

FU, L.; WANG, A.; LAI, G.; LIN C.T.; YU, J.; YU, A.; LIU, ZHONG, XIE, K.; SU, W. **Correction to: A glassy carbon electrode modified with N-doped carbon dots for improved detection of hydrogen peroxide and paracetamol.** *Microchimica Acta*, 2019.

GARAI, G.; DUENAS, M.T.; IRASTORZA, A.; MORENO-ARRIBAS, M.V. **Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider.** *Lett Appl Microbiol*, v. 5, n.45, p. 473-478, 2007.

GOMES, M. B., PIRES, B. A. D., FRACALANZZA, S. A. P., & MARIN, V. A. **O risco das aminas biogênicas nos alimentos.** *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 4, n.19, p. 1123–1134, 2014.

Hernandez-Jover, T.; Izquierdo-Pulido, M.; VecianaNogues, M.T.; Marine-Font A.; Vidal-Carou, M.C. **Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products.** *Journal of Agriculture Food Chemical*, v. 6, n.45, p. 2098-2102, 1997.
Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R. **Principles of instrumental analysis.** 6 ed. Bookman, 2009.

HU, S.L.; NIU, K.Y.; SUN, J.; YANG, J.; ZHAO, N.Q.; DU, X.W. **One-step synthesis of fluorescent carbon nanoparticles by laser irradiation.** *Journal of Materials Chemistry*, 19, 484. 2009.

IARC – International Agency for Research on Cancer. IARC. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, 92 (2010) 773.

IARC, International Agency for Research on Cancer. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans.** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, 2006b. [Acesso em 10/02/2020]. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono98.pdf>.

JIONG, L.; PEI SHAN EMMELINE, Y.; CHEE KWAN, G.; PING, W.; KIAN PING, L. **Transforming C60 molecules into graphene quantum dots.** *Nature Nanotechnology*, 6, 247. 2011.

KALAC, P., HLAVATA, V., & KRIZEK, M. **Concentrations of five biogenic amines in Czech beers and factors affecting their formation.** *Food Chemistry*, n.58, p. 209–214, 1997.

KALAC, P. **Recent advances in the research on biological roles of dietary polyamines in man.** *Journal of Applied Biomedicine*, v. 2, n.7, p. 65-74, 2009.

KIM, M.K; MAH J.H; HWANG, H.J. **Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish.** *Food Chemical*, v. 1, n.116, p. 87-95, 2009.

KWON, W.; KIM, Y.-H.; LEE, C.-L.; LEE, M.; CHOI, H. C.; LEE, T.-W.; RHEE, S.-W. **Electroluminescence from graphene quantum dots prepared by amidative cutting of tattered graphite.** *Nano Letters*, 14, 1306. 2014.

LANDETE, J.M.; DE LAS RIVAS, B.; MARCOBAL, A.; MUÑOZ, R. **Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods.** *Int J Food Microbiol*; 117(3):258-269.2007.

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 carbono quantum dots and photocatalyst design.** *Angewandte Chemie International Edition*, 49, 4430. 2010.

LI, H.; KANG, Z.; LIU, Y.; LEE, S.-T. **Carbon nanodots: synthesis, properties and applications.** *Journal of Materials Chemistry*, 22, 24230, 2012.

LI, Q.; XU, Z.; TANG, W.; WU, Y. **Determination of Dopamine with a Modified Carbon Dot Electrode** *Analytical Letters*, v.2040. 2015.

LIU, R.; WU, D.; LIU, S.; KOYNOV, K.; KNOLL, W.; LI, Q. **An aqueous route to multicolor photoluminescent carbon dots using sílica spheres as carriers.** *Angewandte Chemie International Edition*, 48, 4598. 2009.

LOUKOU, Z., & ZOTOU, A. **Determination of biogenic amines as dansyl derivatives in alcoholic beverages by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection and characterization of the dansylated amines by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A*, n.996, p. 103–113. 2003.

LU, J.; YANG, J.-X.; WANG, J.; LIM, A.; WANG, S.; LOH, K. P. **One-pot synthesis of fluorescente carbon nanoribbons, nanoparticles, and graphene by the exfoliation of graphite in ionic liquids.** *ACS Nano*, 3, 2367. 2009.

MACHADO, C.E.; VIEIRA, K.O.; FERRARI, J.L.; SCHIAVON, M.A. **Pontos quânticos de carbono: síntese química, propriedades e aplicações.** *Rev. Virtual Quim.* 7, 1306-1346, 2015.

MARCOBAL, A.; de LAS RIVAS, B.; MORENO-ARRIBAS MV, MUNOZ, R. **Identification of the ornithine decarboxylase gene in the putrescine-producer *Oenococcus oeni* BIFI-83.** *FEMS Microbiol Lett*, v. 2, n.239, p. 213-220, 2004.

MAIJALA, R.L. **Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS broth and modified decarboxylation agar.** *Lett Appl Microbiol*, v. 1, n.17, p. 40-43, 1993.

MIRTCHEV, P.; HENDERSON, E. J.; SOHEILNIA, N.; YIP, C. M.; OZIN, G. **A.Solution phase synthesis of carbon quantum dots as sensitizers for nanocrystalline TiO₂ solar cells.** *Journal of Materials Chemistry*, 22, 1265. 2012.

MORENO-ARRIBAS, V.; POLO, M.C.; JORGANES, F.; MUNOZ, R. **Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine.** *Int J Food Microbiol*, v. 2, n.84, p. 117-123, 2003.

MOHAN, C.O.; RAVISHANKAR, C.N.; GOPAL, T.K.S.; KUMAR, K.A.; LALITHA, K.V. **Biogenic amines formation in seer fish (*Scomberomorus commerson*) steaks packed with O₂ scavenger during chilled storage.** *Food Research International*, v. 3, n.42, p. 411-416, 2009.

NAILA, A.; FLINT, S.; FLETCHER, G.; BREMER, P.; MEERDINK, G. **Control of Biogenic Amines in Food—Existing and Emerging Approaches.** *J Food Sci*, v. 7, n.75, p. 139- 150, 2010.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. **Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos.** *Rev. Virtual Quim.*, 2013, 5 (4), 516-537.

PAN, D.; GUO, L.; ZHANG, J.; XI, C.; XUE, Q.; HUANG, H.; LI, J.; ZHANG, Z.; YU, W.; CHEN, Z.; LI, Z.; WU, M. **Cutting sp² clusters in graphene sheets into colloidal graphene quantum dots with Strong green fluorescence.** *Journal of Materials Chemistry*, 22, 3314. 2012.

PENG, H.; TRAVAS-SEJDIC, J. **Simple aqueous solution route to luminescent carbogenic dots from carbohydrates.** *Chemistry of Materials*, 21, 5563. 2009.

Plambeck, J. A.; **Electroanalytical Chemistry: Basic Principles and Applications**, John Wiley & Sons: New York, 1982.

SHEN, M.; LIU, G.; YIN, H.; ZHOU, L. **Distribution, sources and health risk of PAHs in urban air-conditioning dust from Hefei, East China.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 194, 110442. 2020.

SOUZA, D. DE; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A.; **Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos.** *Química Nova*, v.26, 81-89. 2003.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN T. A. **Princípios de análise Instrumental.** 5ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentals of analytical chemistry.** Mason: Cengage Learning, 2013.

SUN, X.; LEI, Y. **Fluorescent carbon dots and their sensing applications.** *Trends Analyt. Chem.*, v.89,163. 2017.

SUN, W.; DU, Y.; WANG, Y. **Study on fluorescence properties of carbogenic nanoparticles and their application for the determination of ferrous succinate.** *Journal of Luminescence* 2010, 130, 1463.

TIAN, L.; GHOSH, D.; CHEN, W.; PRADHAN, S.; CHANG, X.; CHEN, S. **Nanosized carbon particles from natural gas soot.** *Chemistry of Materials*, 21, 2803. 2009.

TIL, H.P.; FALKE, H.E.; PRINSEN, M.K.; WILLEMS, M.I. **Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats.** *Food Chem Toxicol* 1997; 35(3-4):337-348.

TVRDIKOVA, J.; DANHEL, A.; VYSKOCIL, V.; BAREK, J. **Voltammetric Determination of Dinitronaphthalenes Using a Silver Solid Amalgam Paste Electrode.** *Analytical Sciences*, 28, 411. 2012.

USLU, B.; OZKAN, S. A. **Solid Electrodes in electroanalytical chemistry: present applications and prospects for high throughput screening of drug compounds.** *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 10: 495, 2007.

WANG, F.; KREITER, M.; HE, B.; PANG, S.; LIU, C.Y. **Synthesis of direct white-light emitting carbogenic quantum dots.** *Chemical Communications*, 3309. 2010.

WANG, J.; **Analytical Electrochemistry**, 2nded., Wiley-VCH: New Jersey, 2000.

WANG, J.; QIU, J. **A review of carbon dots in biological applications.** *J. Mater. Sci.*, v.51, 4728. 2016.

WANG, X.; QU, K.; XU, B.; REN, J.; QU, X. **Microwave assisted one-step green synthesis of cell-permeable multicolor photoluminescent carbon dots without surface passivation reagents.** *Journal of Materials Chemistry*, 21, 2445. 2011.

WANG, Y.; HU, A. **Carbon quantum dots: synthesis, properties and applications.** *J. Mater. Chem. C*, 2, 6921-6940, 2014.

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.* 126, 12736-12737, 2004.

YANG, S.T.; CAO, L.; LUO, P. G.; LU, F.; WANG, X.; WANG, H.; MEZIANI, M. J.; LIU, Y.; QI, G.; SUN, Y.P. **Carbon dots for optical imaging in vivo.** *Journal of the American Chemical Society*, 131, 11308. 2009.

YU, S.J.; KANG, M.W.; CHANG, H.C.; CHEN, K.M.; YU, Y.C. **Bright fluorescent nanodiamonds: no photobleaching and low cytotoxicity.** *Journal of the American Chemical Society*, 127, 17604. 2005.