



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

TESE DE DOUTORADO

**Pontos quânticos de carbono aplicado à determinação
fluorimétrica de cobre(II) em óleos usando um sistema
em fluxo-batelada com extração em fase única**

Stéfani Iury Evangelista de Andrade

**João Pessoa – PB - Brasil
Fevereiro de 2016**



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

TESE DE DOUTORADO

**Pontos quânticos de carbono aplicado à determinação
fluorimétrica de cobre(II) em óleos usando um sistema
em fluxo-batelada com extração em fase única**

Stéfani Iury Evangelista de Andrade*

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

Orientador: Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo

* Bolsista CNPq e CAPES

João Pessoa – PB - Brasil
Fevereiro de 2016

A553p Andrade, Stéfani lury Evangelista de.
Pontos quânticos de carbono aplicado à determinação
fluorimétrica de cobre (II) em óleos usando um sistema em
fluxo-batelada com extração em fase única / Stéfani lury
Evangelista de Andrade.- João Pessoa, 2016.
118f. : il.
Orientador: Mário César Ugulino de Araújo
Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN
1. Química analítica. 2. Pontos quânticos de carbono.
3. Fluorescência. 4. Análise - fluxo-batelada. 5. Extração - fase
única. 6. Cobre. 7. Óleos comestíveis.

UFPB/BC

CDU: 543(043)

Pontos Quânticos de carbono aplicado a determinação fluorimétrica de cobre (II) em óleos usando um sistema em fluxo-batelada com extração em fase única.

Tese de Doutorado apresentada pelo aluno Stefani Iury Evangelista de Andrade e aprovada pela banca examinadora em 29 de fevereiro de 2016.



Prof. Dr. Mario César Ugulino de Araújo
Orientador/Presidente



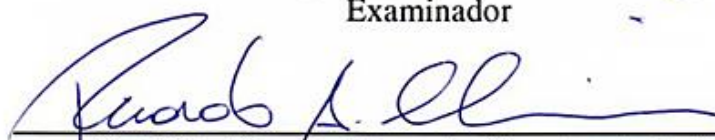
Prof. Dr. Sérgio Ricardo Bezerra dos Santos
Examinador



Prof. Dr. Pablo Nogueira Teles Moreira
Examinador



Prof. Dr. Edvan Cirino da Silva
Examinador



Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcante de Lima
Examinador

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por tudo.

Aos meus pais, Tito e Rosa, pelo amor incondicional, pelas palavras de motivação e confiança.

Aos meus irmãos, Sabrina, Steniel e Séfora, e ao meu cunhado Joab, pela constante presença, carinho, e apoio.

Ao Professor Mário César Ugulino de Araújo pela orientação, dedicação e confiança.

Aos Professores Edvan Cirino, Ricardo Alexandre, Sergio Ricardo e Pablo Moreira, pela participação na banca examinadora da Defesa de Tese e pelas sugestões que enriqueceram este trabalho.

Aos amigos Marcelo Batista, Sófacles Figueredo e Inakã Barreto pela amizade, companheirismo e pelas constantes contribuições científicas.

A todos os demais membros do LAQA, pela amizade, convivência e bons momentos.

Ao LACOM e ao LCCQS pela disponibilização de equipamentos, os quais contribuíram para realização deste trabalho. Em especial aos amigos Arnayra Silva, Laís Chantelle, Juliana Kelly e Israel Ferreira, pela colaboração.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas concedidas e apoio financeiro.

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido um novo método automático em fluxo-batelada baseado em pontos quânticos de carbono (PQCs) para determinação fluorescente de cobre(II) em óleos comestíveis. O método analítico proposto apresenta como estratégia de pré-tratamento da amostra a disponibilização *on-line* do cobre por meio de extração em fase única utilizando uma mistura de solventes álcool isopropílico/clorofórmio na proporção 70:30 (v/v). Para a preparação dos PQCs, foi empregado o tratamento hidrotérmico, simples e de baixo custo, do suco de abacaxi, como bioprecursor. Foi constatado que a fluorescência dos PQCs pode ser significativamente reduzida na presença do Cu(II) simplesmente utilizando um tampão PBS pH 4,0. O mecanismo de extinção da fluorescência pode ser atribuído as interações entre os grupos presentes na superfície dos PQCs com os íons Cu(II). Concernente ao sistema automático fluxo-batelada uma nova câmara de mistura foi construída em politetrafluoretileno, provida de três janelas de quartzo, com o objetivo de permitir a excitação e aquisição dos espectros de fluorescência *on-line*. Para isso, foi utilizado um LED-ultravioleta como fonte de excitação e um espectrofluorímetro portátil como detector. Os limites de detecção e os desvios padrão relativo foram estimados como sendo $2,9 \mu\text{g L}^{-1}$ e $< 2,5 \%$ ($n = 3$), respectivamente. A análise de íons interferentes foi realizada com êxito para os principais íons metálicos presentes na matriz da amostra, não revelando interferência percentual significativa ($\leq 5 \%$). A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação (96 a 106 %). A robustez do método foi avaliada por comparação intra e inter-dia dos resultados obtidos e empregando o método de referência com detecção por absorção atômica em forno de grafite, a um nível de 95% de confiança estatística. Por fim, o sistema apresentou frequência analítica bastante satisfatória (60 h^{-1}) com uma redução considerável do consumo de produtos químicos. Desta forma, é evidenciado de modo apreciável a viabilidade do novo método fluorescente, permitindo, dessa maneira, o desenvolvimento de novas estratégias analíticas potencialmente úteis baseadas em nanopartículas de carbono e automação em sistemas fluxo-batelada.

Palavras-chave: Pontos quânticos de carbono; Fluorescência; Análise em fluxo-batelada; Extração em fase única; Cobre; Óleos comestíveis.

ABSTRACT

In this work, a novel fluorescence method using flow-batch analysis for the determination of copper in edible oil, employing carbon quantum dots (CDs) was developed. The in-line single-phase extraction of iron consisted of the addition of a mixture of isopropyl alcohol/chloroform (70:30, v/v) to dissolve the oil samples. Moreover, an eco-friendly, simple, and low-cost hydrothermal method was developed for preparation of water-soluble fluorescent carbon quantum dots using pineapple juice as carbon precursors. The fluorescence properties of CDs were examined by fluorescent detection of Cu(II) in oil. Their photoluminescence can be significantly quenched by simply using the buffer solution PBS of pH 4.0. This mechanism was presumably explained by the interactions between the surface groups of CDs with metal ions studied. Concerning the flow-batch analysis a new mixing chamber was developed in polytetrafluoroethylene provided with quartz windows in order to allow the excitation and fluorescence detection online. For this, an LED UV was used as the excitation source and a portable spectrofluorometer as detector. The limits of detection and relative standard deviation were estimated as $2.9 \mu\text{g L}^{-1}$ and $< 2.5 \%$ ($n=3$). The analysis of interfering was successful for the major ions present in solution, revealing significant percentage interference ($\leq 5 \%$). The precision of the method was evaluated by recovery test (96 to 106 %). The robustness of the method was evaluated by intra- and inter- day comparison of the results obtained and using the reference method with detection by atomic absorption graphite furnace at a 95% level of statistical confidence. Finally, the system showed quite satisfactory analytical frequency (60 h^{-1}) and considerably reducing the consumption of chemicals. Thus, it is demonstrated appreciably the viability of new fluorescent method, thus allowing the development of new analytical strategies employing potentially useful carbon quantum dots and flow-batch analyzer.

Keywords: Carbon quantum dots; Fluorescence; Flow-batch analysis; Single-phase extraction; Copper; Edible oils.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1. Representação de nanomateriais de carbono. Figura adaptada de Baptista et al. (2015). 19
- Figura 2.2. Representação de uma possível estrutura química dos PQC's. Adaptado de Lim et al. (2014). 20
- Figura 2.3. Estudo da fotodegradação dos PQC's obtidos de vários precursores (Trp: triptofano; Leu: leucina, Asp: ácido aspártico) em comparação com Isotiocianato de fluoresceína (FITC) e outras nanopartículas (NPs) fluorescentes (CdTe, SiO₂ e Poli NPs: nanopartículas de polímero dopado com corante). Figura adaptada de Wei et al. (2014). 21
- Figura 2.4. Espectro de absorção molecular de PQC's obtidos a partir de bioprecursores. Imagens dos PQC's sob radiação (a) visível e (b) ultravioleta. Figura adaptada de Xu et al. (2015). 23
- Figura 2.5. Ilustração esquemática do possível mecanismo de CL dos pontos de carbono na presença de NaOH. Ilustração adaptada de Zhao et al. (2013). 24
- Figura 2.6. (a) Ilustração esquemática da EQL dos PQC's. Banda de valência (BV); Banda de condução (BC). (b) Mecanismo da EQL do sistema PQC's/K₂S₂O₈. Ilustração adaptada de Feng et al. (2013). 26
- Figura 2.7. Fotografia das soluções de PQC's sob radiação (a) visível e ultravioleta (365 nm). (b) Espectros de FL dos PQC's de tamanhos 1,2; 1,5; 3,0 e 3,8 nm. (c) Representação da emissão de FL ajustável dos PQC's. Figura modificada de Li et al. (2010). 30
- Figura 2.8. (a) Fotografia de oito amostras de PQC's excitadas sob a luz ultravioleta (365 nm) com máximos de emissão em 440, 458, 517, 553, 566, 580, 594 e 625 nm. (b) Modelo da emissão de FL ajustável dos PQC's. Ilustração adaptada de Ding et al. (2016). 31
- Figura 2.9. Diagrama esquemático da preparação dos PQC's via abordagens “*top-down*” e “*bottom-up*”, e etapas de modificações (funcionalização, dopagem ou nanohíbrido). Ilustração modificada de Wang & Hu (2014). 32
- Figura 2.10. Esquema de síntese dos PQC's por meio do tratamento hidrotérmico do suco de laranja. Ilustração adaptada de Sahu et al. (2012). 35

Figura 2.11. Representação da determinação de fosfato baseada na fluorescência da sonda de PQC's dopado com Eu^{3+} . Figura modificada de Zhao et al. (2011).	37
Figura 2.12. (a) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), (b) espectros de FTIR, (c) absorção molecular UV-Vis, e (d) fluorescência das nanopartículas de carbono. Figura adaptada de De & Karak (2013).	38
Figura 2.13. (a) Representação esquemática da extinção de fluorescência dos PQC's na presença do íon Cu(II) .	40
Figura 2.14. Diagrama representando a linha do tempo para os principais analisadores automáticos em fluxo.	44
Figura 2.15. Exemplos (a) de sistemas para propulsão dos fluidos, (b) de sistemas de injeção, (c) de sistemas de homogeneização e (d) de detectores.	44
Figura 2.16. Esquema ilustrativo dos principais componentes do FBA. (a) bomba peristáltica, (b) câmara de mistura, (c) válvulas solenoides, (d) agitador magnético, (e) sistema de detecção, (f) computador e (g) acionador de válvulas.	46
Figura 3.1. Esquema ilustrativo da síntese hidrotérmica de PQC's a partir do suco de abacaxi.	57
Figura 3.2. Fotografia do sistema automático em fluxo-batelada utilizado. (a) bomba peristáltica, (b) acionador e interface, (c) válvulas solenoides, (d) câmara de mistura, (e) espectrofluorímetro portátil, e (f) computador.	62
Figura 3.3. Diagrama esquemático da ligação do circuito eletrônico do acionador com as válvulas solenoides, agitador magnético e a interface NI USB-6009.	63
Figura 3.4. Detalhes do sistema fluxo-batelada. (a) câmara de mistura, (b) espectrofluorímetro e (c) LED ultravioleta.	64
Figura 3.5. Espectro de emissão do LED ultravioleta.	65
Figura 3.6. Interface do programa de controle do sistema automático fluxo-batelada proposto.	66
Figura 3.7. Interface do programa para gerenciar as configurações de comunicação com a interface, bomba peristáltica e espectrofluorímetro portátil.	67
Figura 3.8. Interface do programa para gerenciar o estudo da vazões individuais em cada linha de fluxo.	68

Figura 3.9. Diagrama esquemático do sistema automático em fluxo-batelada proposto. BP: bomba peristáltica, V: válvulas solenoides, CM: câmara de mistura, J: Janelas de quartzo; AM: agitador magnético, BM: barra magnética.	69
Figura 4.1. Imagens dos PQCs, sintetizados em diferentes temperaturas (120, 130, 140, 150°C), sob a (a) luz visível e sob a (b) ultravioleta (380 nm).	80
Figura 4.2. Espectros de absorção molecular Uv-Vis dos PQCs em diferentes temperaturas.	81
Figura 4.3. Espectros de emissão de fluorescência dos PQCs ($\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$) obtidos com diferentes temperaturas.	82
Figura 4.4. (a) Influência do pH nos espectros de emissão de fluorescência dos PQCs. (b) Variação da intensidade de fluorescência com a mudança do pH.	83
Figura 4.5. Espectros de emissão dos PQCs obtidos à temperatura de 140°C, excitados em diferentes comprimentos de onda (340 a 470 nm).	84
Figura 4.6. Espectros de excitação e de emissão dos PQCs obtidos à temperatura de 140°C.	84
Figura 4.7. Espectro FTIR dos PQCs obtidos com temperatura de síntese de 140°C.	85
Figura 4.8. Emissão de fluorescência dos PQCs ($\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$) na presença de diferentes íons metálicos divalentes. Dados referentes a concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada íon metálico. Onde F e F_0 são as intensidades de fluorescência na ausência e presença do íon metálico, respectivamente.	87
Figura 4.9. Influência da extração em fase única na emissão de fluorescência do sistema PQC/Cu(II). F e F_0 são as intensidades de fluorescência na ausência e presença do íon metálico, respectivamente.	89
Figura 4.10. Espectros de fluorescência dos PQCs com diferentes concentrações de cobre(II) (0 a $150 \mu\text{g L}^{-1}$), excitados em 400 nm.	91
Figura 4.11. Curva analítica para a determinação de cobre(II) em óleos comestíveis.	92
Figura 4.12. Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo do método proposto.	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Características básicas da fluorescência dos PQCs exploradas em aplicações analíticas (Demchenko & Dekaliuk, 2013; Guo et al.,2015; Lim et al., 2015).	27
Tabela 2.2. Características dos diferentes métodos de sínteses de PQCs.	34
Tabela 3.1. Procedimento automático para análise da amostra oleosa com pré-tratamento para extração de cobre <i>on-line</i> .	70
Tabela 3.2. Equações para ANOVA aplicada a um modelo obtido pelo método dos mínimos quadrados.	72
Tabela 4.1. Densidades dos óleos comestíveis empregados na avaliação do método proposto (n=3).	90
Tabela 4.2. Vazões médias dos canais individuais das soluções.	90
Tabela 4.3. Análise de variância (ANOVA) para o modelo linear obtido pelo método proposto.	94
Tabela 4.4. Coeficientes de regressão e intervalos de confiança para os valores populacionais (β_0 e β_1) do modelo linear obtido para o método proposto.	95
Tabela 4.5. Características de desempenho para o método proposto.	95
Tabela 4.6. Resultados obtidos para determinação de cobre(II) em óleo comestível (mg Kg ⁻¹) usando o sistema automático com detecção fluorescente e o método de referência (n=3).	96
Tabela 4.7. Teste de recuperação para o cobre(II) nas amostras de óleo comestível (n = 3).	97

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Caracterização da problemática	14
1.2. Objetivo e metas	16
1.2.1. Objetivo geral	16
1.2.2. Metas	17
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1. Breve abordagem sobre os nanomateriais de carbono	19
2.2. Pontos quânticos de carbono e suas propriedades ópticas	22
2.2.1. Absorbância	22
2.2.2. Quimiluminescência	23
2.2.2.1. Eletroquimiluminescência	25
2.2.3. Fluorescência	26
2.2.3.1. Mecanismos de emissão de fluorescência	29
2.3. Técnicas de síntese de pontos quânticos de carbono	32
2.3.1. Tratamento hidrotérmico para pontos quânticos de carbono	34
2.3.2. Funcionalização da superfície dos PQCs	36
2.4. Consideração sobre as técnicas de caracterização dos PQCs	37
2.5. Aplicação de pontos quânticos de carbono na determinação fluorescente de íons metálicos	39
2.6. Considerações sobre sistemas automáticos de análise química	42
2.7. Sistemas automáticos em fluxo-batelada	45
2.7.1. Aplicações analíticas em sistemas fluxo-batelada	48
2.8. Determinação de cobre em óleos comestíveis	50
3. EXPERIMENTAL	54
3.1. Síntese dos pontos quânticos de carbono	55
3.1.1. Bioprecursor de carbono	55
3.1.2. Equipamento e material	55
3.1.3. Procedimento de síntese e purificação	56

3.2.	Determinação de cobre em óleos	57
3.2.1.	Reagentes e soluções	57
3.2.2.	Amostras	58
3.2.3.	Instrumentação	59
3.2.4.	Procedimento de análise	59
3.2.4.1.	Pré-tratamento das amostras oleosas	59
3.2.4.2.	Determinação de cobre por EAA-FG	60
3.3.	Desenvolvimento do sistema fluxo-batelada	61
3.3.1.	Equipamentos e montagem	61
3.3.2.	Desenvolvimento do <i>software</i> de controle	65
3.3.3.	Precisão das válvulas solenoides	67
3.4.	Procedimento automático de análise	68
3.5.	Avaliação do desempenho analítico	71
3.5.1.	Linearidade	71
3.5.1.1.	Análise de variância	71
3.5.2.	Limite de detecção e quantificação	73
3.5.3.	Sensibilidade	74
3.5.4.	Seletividade	74
3.5.5.	Exatidão	75
3.5.6.	Precisão	76
3.5.7.	Teste <i>t</i> pareado	76
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.1.	Síntese e caracterização dos pontos quânticos de carbono	79
4.1.1.	Mecanismo de síntese	79
4.1.2.	Influência da temperatura	79
4.1.3.	Influência do pH	82
4.1.4.	Caracterização espectroscópica dos PQCs	83
4.1.5.	Caracterização estrutural dos PQCs	85
4.2.	Determinação do rendimento quântico dos PQCs	86
4.3.	Estudo de potenciais interferentes	86

4.4.	Estudo de pré-tratamento das amostras	88
4.5.	Parâmetros do sistema automático em fluxo-batelada	89
4.5.1.	Precisão das válvulas solenoides	89
4.5.2.	Obtenção da curva analítica	90
4.5.3.	Validação da curva analítica	92
4.5.4.	Análise das amostras	95
4.5.5.	Teste de recuperação	96
5.	CONCLUSÃO	98
5.1.	Perspectivas	100
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
ANEXO: Produção científica		113
Artigos publicados		114

1

INTRODUÇÃO

1.1. Caracterização da problemática

A nanotecnologia vem apresentando um desenvolvimento exponencial nas últimas décadas (Costas-Mora et al., 2014). Diversos nanocristais semicondutores (NCs) têm atraído muita atenção devido as suas propriedades ópticas singulares e seu grande potencial para aplicações em sistemas analíticos e bioanalíticos (Wang & Hu, 2014). Contudo, a maioria dos NCs convencionais possuem certas limitações, tais como a elevada toxicidade, devido à utilização de metais pesados (Hg, Cd, Pb, Te) em seu processo de síntese (Kong et al., 2014). Nessa perspectiva, tem havido um esforço considerável da comunidade científica na busca por nanomateriais ambientalmente amigáveis com propriedades ópticas satisfatórias (Luo et al., 2013).

Dentre as alternativas promissoras para os NCs tradicionais destacam-se os pontos quânticos de carbono (PQCs), descobertos em 2004, durante a separação e purificação de nanotubos de carbono de parede simples (Xu et al., 2004). Ao contrário dos NCs tradicionais, essas nanopartículas apresentam baixa toxicidade, excelente solubilidade em água, fácil funcionalização orgânica, alta resistência à fotodegradação e boa biocompatibilidade (Hsu et al., 2012; Li et al., 2012). Além disso, os PQCs podem ser facilmente obtidos por tratamento hidrotérmico, empregando diversos bioprecusores naturais de carbono, como laranja, maçã, banana e batata (Barati et al., 2015).

Desde sua descoberta (Xu et al., 2004), os PQCs vêm apresentando grande potencial em diversas aplicações tais como: fotocatalise, biosensores, dispositivos optoeletrônicos e várias aplicações analíticas e bioanalíticas (Silva & Gonçalves, 2011; Li et al., 2012; Wang & Hu, 2014). Dentre as aplicações analíticas, os PQCs vem sendo comumente empregados na determinação fluorescente de vários íons metálicos em diversas matrizes (Guo et al., 2015). Entretanto, o seu uso envolvendo matrizes oleosas ainda vem sendo pouco explorado na

literatura especializada, sendo ainda um extenso campo a ser investigado quanto a novas aplicações e novos métodos analíticos.

A complexidade das matrizes oleosas impõe dificuldades quanto à análise química, especialmente quando envolve procedimentos que utilizam sistemas automáticos em fluxo. Dentre os problemas relacionados, destacam-se a viscosidade, a elevada carga orgânica, a intercontaminação das amostras e a dificuldade na implementação de pré-tratamento *on-line* (Burguera & Burguera, 2011). Desse modo, o desenvolvimento de novas estratégias de análise fica comprometido, sobretudo para a análise direta de substâncias traço nesse tipo de matriz. Um exemplo dessa problemática consiste na determinação direta de metais em óleos comestíveis.

A presença de metais traço em óleos comestíveis, tais como o cobre, ferro e o zinco, pode promover a degradação oxidativa do produto comercial, prejudicando a sua qualidade e validade (Trindade et al., 2015). Parâmetros como sabor, odor, cor, e características nutricionais podem ser comprometidos (Pinto et al., 2006). Além disso, dependendo da concentração, alguns íons metálicos são considerados tóxicos para a alimentação humana.

Nessa perspectiva, metais como o cobre, estão presentes em óleos comestíveis, como resultado de contaminação durante etapas de processamento, transporte e armazenamento (Pinto et al., 2006). Assim sendo, a determinação desse metal é considerada um critério importante para avaliação da qualidade dos óleos comestíveis, bem como um desafio analítico, devido à complexidade da matriz e dos baixos níveis desse analito (Lima et al., 2015).

Vários métodos têm sido desenvolvidos e aplicados para determinação de cobre em óleos comestíveis, geralmente empregando a espectrometria atômica (Pinto et al., 2006; Barreto et al., 2013). Entretanto, a necessidade de pré-tratamento da amostra é um ponto decisivo para a maioria dos procedimentos propostos (Trindade et al., 2015).

Nesse contexto, o uso do sistema automático em fluxo-batelada (Diniz et al. 2012) corrobora com o desenvolvimento de novos métodos de análise que proporcionam uma elevada velocidade analítica, flexibilidade e versatilidade operacionais, com adição de volumes discretos das soluções e homogeneização rápida e eficiente das misturas, além disso, possibilita a implementação de procedimentos de pré-tratamento *on-line*, incluindo em matrizes viscosas (Barreto et al., 2013; Lima et al., 2015).

Diante do exposto, e empregando os recentes pontos quânticos de carbono como reagente fluorescente, que permite a proposição de métodos analíticos sensíveis e seletivos, o presente trabalho busca explorar as vantagens inerentes a estes nanocristais. Nessa pesquisa, os pontos de carbono foram obtidos a partir da síntese de hidrotérmica do suco de abacaxi, e utilizados para o desenvolvimento de um novo método fluorescente automático para a determinação de cobre(II) em óleos comestíveis. Para isso, foram trabalhadas a flexibilidade e versatilidade do sistema em fluxo-batelada para a realização *on-line* do pré-tratamento baseado no processo de extração em fase única das amostras oleosas, empregando um LED ultravioleta como fonte de excitação e um espectrofluorímetro portátil como detector.

1.2. Objetivo e metas

São propostos como objetivo e metas para este trabalho de pesquisa o que segue.

1.2.1. Objetivo geral

Desenvolver um novo método fluorimétrico empregando pontos quânticos de carbono para determinação de cobre(II) em óleos comestíveis utilizando um sistema em fluxo-batelada com extração *on-line* em fase única.

1.2.2. Metas

- Síntese hidrotérmica, a baixa temperatura, dos pontos quânticos de carbono, preparados a partir do suco de abacaxi;
- Caracterização das nanopartículas obtidas quanto às propriedades químicas e estruturais;
- Desenvolvimento de um método fluorimétrico para determinação direta de cobre(II) empregando PQCs;
- Desenvolvimento de um método para extração *on-line* de cobre(II) em matrizes de óleos comestíveis;
- Desenvolvimento de um sistema automático em fluxo-batelada, empregando uma câmara de mistura com janelas de quartzo;
- Implementação de um programa de gerenciamento do sistema automático para controle e aquisição dos espectros de fluorescência;
- Determinação fluorimétrica de cobre(II) em óleos comestíveis empregando o método proposto;
- Avaliação da performance analítica do método proposto frente ao método de referência.

2

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Breve abordagem sobre os nanomateriais de carbono

Nos últimos anos, os nanomateriais de carbono (NMCs) têm despertado considerável interesse como alternativa promissora no desenvolvimento de sensores químicos e biológicos (Himaja et al., 2015). A diversidade estrutural destes materiais oferece uma variedade de propriedades ópticas, eletrônicas e magnéticas, e quando aliado a sua versatilidade química, facilidade de manipulação e biocompatibilidade, tornam os NMCs, candidatos atrativos para várias aplicações analíticas (Baptista et al., 2015).

Os NMCs podem ser encontrados em várias estruturas, tais como: fulerenos (C₆₀, C₇₀, C₈₄), nanotubos de carbono de parede simples ou múltipla, nanodiamantes, nanografeno e os pontos quânticos de carbono (PQCs), que foram recentemente descobertos (Silva & Gonçalves, 2011). Alguns exemplos dos nanomateriais de carbono estão representados na

Figura 2.1.

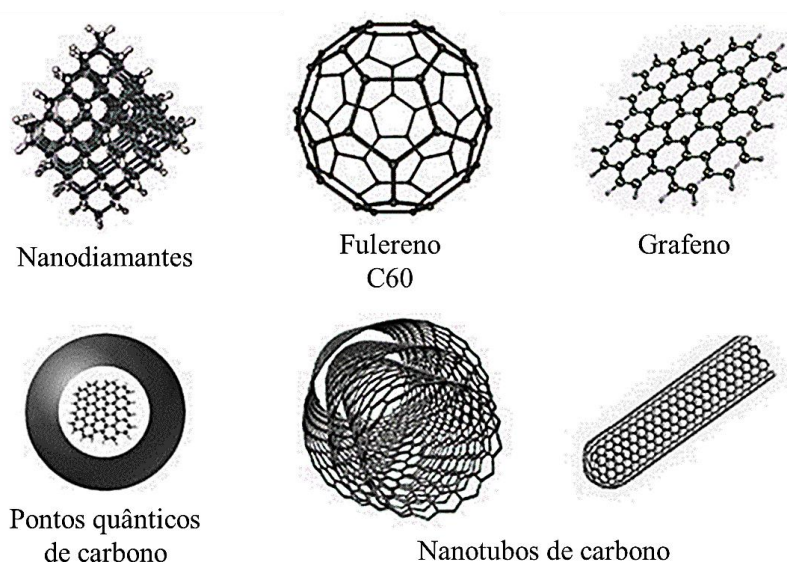


Figura 2.1. Representação de nanomateriais de carbono. Figura adaptada de Baptista et al. (2015).

Os pontos quânticos de carbono foram descobertos acidentalmente durante a separação e purificação de nanotubos de carbono de parede simples (NCPS) (Xu et al., 2004). Ao processar uma suspensão de NCPS por eletroforese em gel, Xu e colaboradores (2004),

obtiveram três frações de PQCs com diferentes tamanhos, e quando excitado em 365 nm, exibiram emissões fluorescentes verde-azul, amarelo e laranja. Desde então, os PQCs tem sido considerado a estrela em ascensão da família dos nanomateriais de carbono devido sua natureza benigna, abundante e barata (Baptista et al., 2015).

Os PQCs são nanopartículas tipicamente esféricas e apresentam tamanhos inferiores a 10 nm. Podem ser sintetizados por diferentes métodos físicos ou químicos, e dependendo das condições de produção podem ser cristalinos ou amorfos. Entretanto, detalhes sobre o mecanismo de formação, estrutura e origem da fluorescência ainda estão sendo esclarecidos (Wang & Hu, 2014).

Quanto a sua estrutura, os PQCs são compostos por nanopartículas gráficas de uma mistura de carbonos, sp^2 , que se encontram confinados em um núcleo funcionalizado apresentando uma variedade de grupos polares como hidroxila, carbonila e alquila (Machado et al., 2015). Tipicamente, os PQCs contêm em sua superfície diversos radicais de ácidos carboxílicos (**Figura 2.2**), o que lhes confere uma excelente solubilidade em água e uma capacidade para posterior funcionalização e passivação de sua superfície com diferentes espécies químicas de natureza: orgânica, inorgânica, biológica e polimérica (Lim et al., 2014).

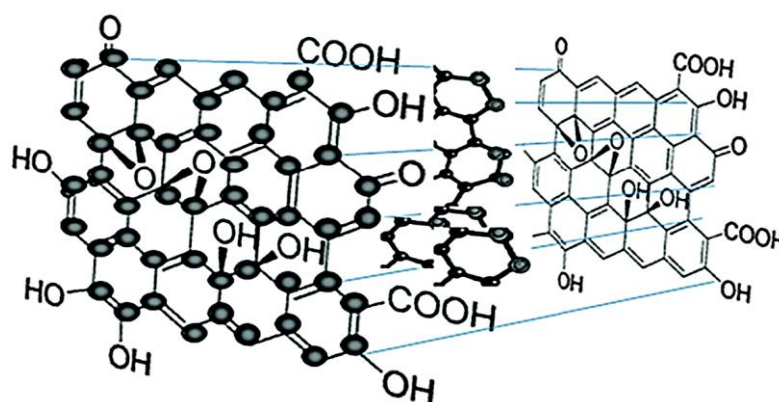


Figura 2.2. Representação de uma possível estrutura química dos PQC. Adaptado de Lim et al. (2014).

Essas nanopartículas vêm atraindo muito interesse acadêmico devido principalmente as suas propriedades ópticas intrínsecas e seu grande potencial para aplicações em sistemas analíticos e bioanalíticos (Himaja et al., 2015). Atualmente, várias pesquisas têm sido publicadas visando a obtenção de melhores rotas de sínteses para a preparação de PQC's com alto rendimento quântico de fluorescência e de baixo custo, utilizando bioprecusores naturais renováveis, como laranja, maçã, banana e batata (Barati et al., 2015).

Em comparação com os pontos quânticos semicondutores tradicionais e os corantes orgânicos, os PQC's são superiores em termos de solubilidade (sobretudo, em meio aquoso), estabilidade química, baixa citotoxicidade, biocompatibilidade, fácil funcionalização, e alta resistência à fotodegradação (Wang & Hu, 2014). A **Figura 2.3** exibe um estudo comparativo de fotodegradação entre diferentes nanopartículas comumente utilizadas (Wei et al., 2014). Os PQC's, obtidos a partir de diferentes aminoácidos, apresentaram uma fotoestabilidade superior quando comparados a outras nanopartículas fluorescentes.

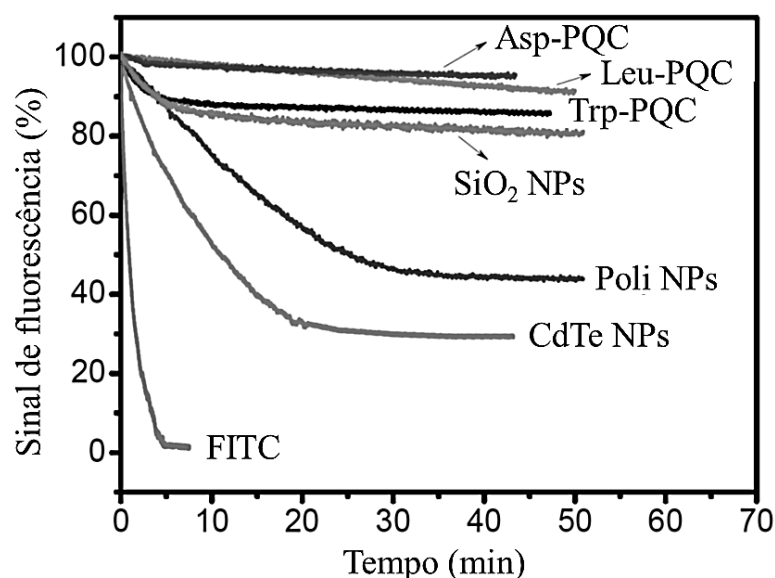


Figura 2.3. Estudo da fotodegradação dos PQC's obtidos de vários precursores (Trp: triptofano; Leu: leucina, Asp: ácido aspártico) em comparação com Isotiocianato de fluoresceína (FITC) e outras nanopartículas (NPs) fluorescentes (CdTe, SiO₂ e Poli NPs: nanopartículas de polímero dopado com corante). Figura adaptada de Wei et al. (2014).

Diante do exposto, os PQC's apresentam-se como uma alternativa potencialmente promissora aos corantes orgânicos e aos pontos quânticos semicondutores tradicionais. Essas nanopartículas tem sido amplamente aplicadas em vários campos, incluindo, sensores, bioimagens, fotocatalise, dispositivos optoeletrônicos, dentre outros (Li et al., 2012; Wang & Hu, 2014; Himaja et al., 2015). Entretanto, a determinação fluorescente de íons metálicos é uma das aplicações mais pesquisadas devido, sobretudo, a sua rápida e sensível interação com as nanopartículas, permitindo estudos com boa fotoestabilidade e adequada fluorescência proporcional à concentração desses íons (Guo et al., 2015).

2.2. Pontos quânticos de carbono e suas propriedades ópticas

Tendo em vista as potencialidades de aplicações das nanopartículas de PQC's, as suas principais propriedades ópticas serão consideradas e discutidas em maiores detalhes, a seguir.

2.2.1. Absorbância

Os PQC's exibem uma forte absorção molecular na região do ultravioleta (**Figura 2.4**), que se estende até a região do visível. Podem ocorrer bandas de absorção atribuídas às transições $\pi-\pi^*$ e $n-\pi^*$, provenientes das ligações C=C e C=O (Li et al., 2012). A maioria dos PQC's apresenta uma banda de absorção em torno de 260-320 nm. Contudo, a funcionalização da superfície dos PQC's pode deslocar a banda de absorção para comprimentos de onda maiores, como ocorre, por exemplo, na funcionalização da superfície com 4,7,10,13-trioxa-1,13-tridecanediamina (Peng & Travas-Sejdic., 2009) (350-550 nm) ou organosilano (340-410 nm) (Li et al., 2012).

Na **Figura 2.4** é apresentado o espectro de absorção molecular no ultravioleta-visível (UV-Vis) dos PQC's com 5 nm de diâmetro médio em solução aquosa, obtidos a partir da síntese hidrotermal usando bioprecusores naturais. Um pico máximo a 278 nm é exibido no espectro

de absorção UV-Vis, o que pode ser atribuído as transições $n-\pi^*$ e $\pi-\pi^*$ provenientes das ligações C=O e C=C.

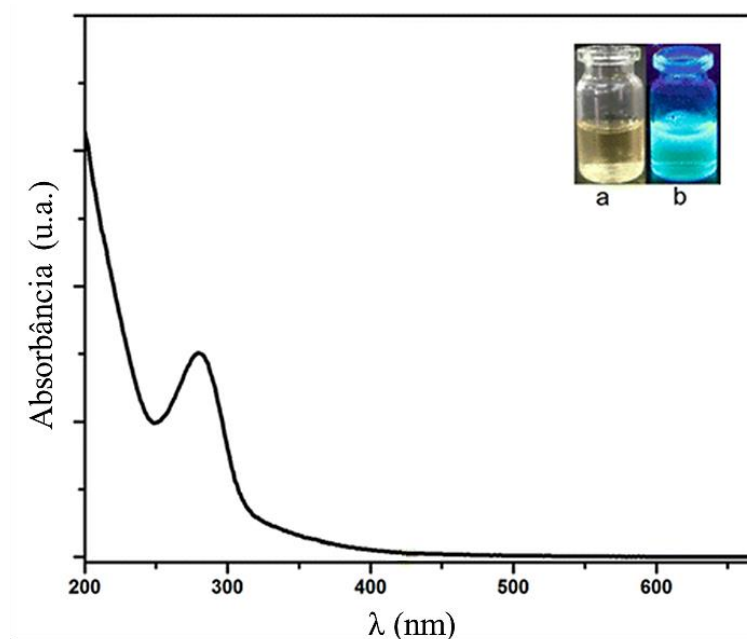


Figura 2.4. Espectro de absorção molecular de PQC obtidos a partir de bioprecusores. Imagens dos PQC sob radiação (a) visível e (b) ultravioleta. Figura adaptada de Xu et al. (2015).

2.2.2. Quimiluminescência

Lin e colaboradores (2012) relataram a propriedade quimiluminescente (QL) dos PQC na presença de oxidantes fortes, tais como: permanganato de potássio (KMnO_4) e cério(IV), com intensidade proporcional a sua concentração. A ressonância paramagnética eletrônica (RPE) revelou que os oxidantes fortes podem aumentar a quantidade de buracos na superfície dos PQC (aumentando os sítios ativos), acelerando assim a recombinação radiativa do par elétron-buraco (éxciton), resultando na liberação de energia radiativa na forma de emissão quimiluminescente.

Zhao e colaboradores (2013) relataram um comportamento quimiluminescente dos PQC, obtidos a partir de glicose e polietilenoglicol, na presença de uma solução alcalina forte, tais como: NaOH e KOH (**Figura 2.5**). A intensidade de QL apresentou-se proporcional ao aumento da concentração dos PQC em um determinado intervalo. Os PQC exibiram uma

excelente capacidade doadora de elétrons que podem reduzir o oxigênio dissolvido gerando radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em uma solução de base forte. Um possível mecanismo de recombinação radiativa do par elétron-buraco foi sugerido (Zhao et al., 2013) para explicar o comportamento quimiluminescente dos PQC's sob condições de forte alcalinidade.

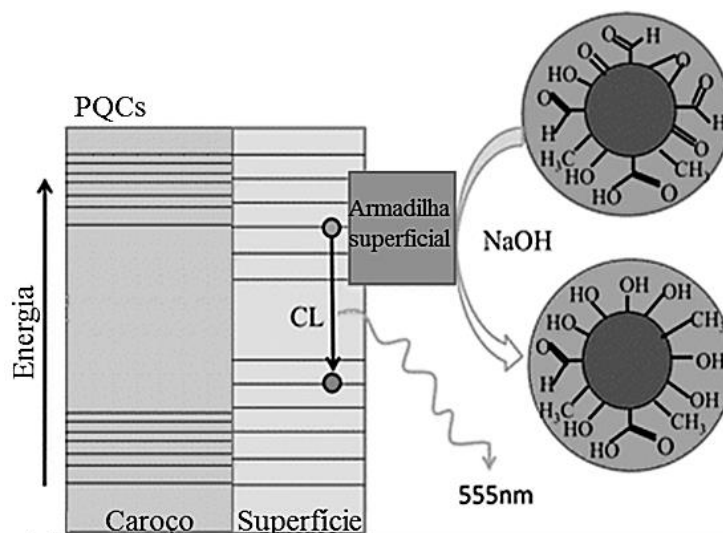


Figura 2.5. Ilustração esquemática do possível mecanismo de CL dos pontos de carbono na presença de NaOH. Ilustração adaptada de Zhao et al. (2013).

Recentemente, foram investigados o comportamento quimiluminescente dos PQC's na presença de permanganato de potássio ($KMnO_4$) (Teng et al., 2014), e ferricianeto de potássio ($K_3Fe(CN)_6$) (Amjadi et al., 2014). Teng e colaboradores (2014) verificaram em seus estudos que o $KMnO_4$ pode reagir com os PQC's produzindo radicais (r-PQC's), em meio fortemente ácido, gerando QL. Uma das vias de reação propostas para o sistema r-PQC's/ $KMnO_4$ consiste na oxidação direta das nanopartículas pelo $KMnO_4$, produzindo ao mesmo tempo os estados excitados PQC's* e $Mn(II)^*$, o que provoca o fenômeno da QL. As medidas de QL foram realizadas empregando um sistema automático por injeção em fluxo.

Amjadi e colaboradores (2014) demonstraram que os PQC's, obtidos a partir de ácido cítrico e polietilenoglicol, podem ser oxidados diretamente pelo $K_3Fe(CN)_6$, produzindo uma emissão de quimiluminescência (em 515 nm) relativamente intensa. De acordo com os resultados obtidos, os PQC's poderiam reagir com o $K_3Fe(CN)_6$ e com o íon radical superóxido

($O_2^{\cdot-}$) em solução básica, para formação dos radicais $PQCs^{\cdot+}$ e $PQCs^{\cdot-}$. A recombinação radiativa do par elétron-buraco produz o estado excitado $PQCs^*$, que atua como emissor final na mistura reacional. Verificou-se, também, que alguns íons metálicos, como, por exemplo, o $Cr(VI)$, apresenta o efeito inibidor sobre a intensidade quimiluminescente.

2.2.2.1. Eletroquimiluminescência

Eletroquimiluminescência (EQL) consiste em um meio de conversão de energia elétrica em energia radiativa, onde as espécies geradas através de uma tensão aplicada na superfície de um eletrodo sofrem reações de transferência de elétrons de alta energia, produzindo estados excitados que emitem radiações luminescentes mensuráveis (Xu et al., 2014b).

O comportamento da EQL dos PQCs é semelhante ao de outros pontos quânticos semicondutores, como CdSe e nanocristais de Si (Zhu et al., 2009; Li et al., 2012). Em geral, a maioria dos PQCs segue o mecanismo de EQL catódica utilizando o persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) como co-reagente (Xu et al., 2014b). A representação da EQL catódica do sistema PQCs/ $K_2S_2O_8$ é ilustrada na **Figura 2.6**.

Os grupos funcionais presentes nos PQCs que contêm oxigênio facilitam a formação do radical $PQCs^{\cdot-}$, por sua vez, o radical fortemente oxidante $SO_4^{\cdot-}$ é produzido pela redução eletroquímica do $S_2O_8^{2-}$. Em seguida, com transferência de elétrons entre os radicais, existe a formação do estado eletrônico excitado ($PQCs^*$), o qual retorna para o estado fundamental emitindo fótons (Feng et al., 2013).

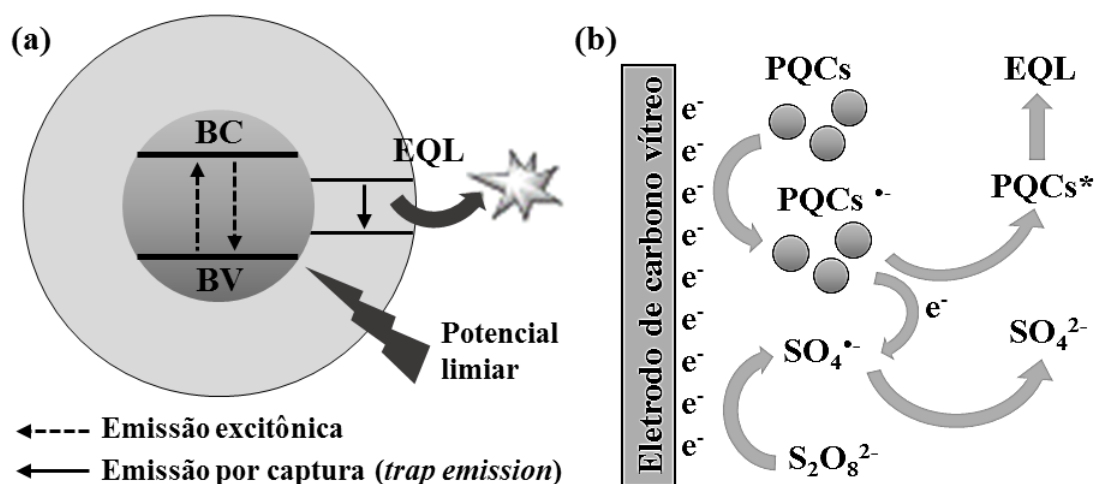


Figura 2.6. (a) Ilustração esquemática da EQL dos PQC's. Banda de valência (BV); Banda de condução (BC). (b) Mecanismo da EQL do sistema PQC's/K₂S₂O₈. Ilustração adaptada de Feng et al. (2013).

Em comparação com as propriedades fluorescentes, trabalhos envolvendo PQC's e EQL ainda são pouco explorados na literatura. Isso ocorre devido a síntese, bem como, a aplicação de EQL em PQC's ainda se encontra em um estágio inicial de investigação.

2.2.3. Fluorescência

Uma característica interessante dos PQC's é a sua emissão de fluorescência (FL) ajustável, mesmo sem qualquer funcionalização de sua superfície (Lim et al., 2014). Esse fenômeno pode ser atribuído a diferentes armadilhas emissivas presentes na superfície dos PQC's (sítios ativados), bem como, os diferentes tamanhos das nanopartículas. Esse último comportamento é semelhante ao dos nanocristais semicondutores tradicionais e uma assinatura clássica do efeito do confinamento quântico (Baker & Baker, 2010).

As medidas de fluorescência dos PQC's vêm sendo exploradas de diversas maneiras em aplicações analíticas (Wang & Hu, 2014; Guo et al., 2015). Algumas características básicas de emissão de FL dos PQC's exploradas são apresentadas na **Tabela 2.1**.

Tabela 2.1. Características básicas da fluorescência dos PQC's exploradas em aplicações analíticas (Demchenko & Dekaliuk, 2013; Guo et al., 2015; Lim et al., 2015).

Característica explorada	Aplicação
Supressão da fluorescência (fluorescência <i>turn-off</i>)	Determinação de íons metálicos (por exemplo: Be(II), Hg(II), Fe(III), Cu(II), Pb(II), Mn(II), Ag(I), Sn(II)), flúor, proteínas, ClO ⁻ , NO ₂ , tartrazina, ácido tânico.
Aumento da fluorescência (fluorescência <i>turn-on</i>)	Aplicações em bioimagens, e determinação de K(I), Pb(II), Zn(II), quercetina, 4-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol,
Recuperação da fluorescência de complexos Metal-PQC's (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 (inseticida).
Atuando como doador e receptor em processos de FRET (do Inglês: <i>fluorescence resonance energy transfer</i>)	Determinação de Al(III), Zn(II), amônia, imatinib (fármaco).

Um método fluorescente utilizando PQC's para determinação de Fe(III) em água, foi desenvolvido por Xu e colaboradores (2014a). Nesse trabalho, os PQC's foram obtidos por meio do tratamento hidrotérmico de batatas, sem a necessidade de funcionalização. Os autores relatam que a FL dos PQC's poderia ser extinta devido a formação de um complexo entre os PQC's e o Fe(III). Foi obtida uma faixa linear de concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ a $50,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, e limite de detecção de $0,025 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

Zhai e coautores (2011), demonstraram, pela primeira vez, que as emissões fluorescentes dos PQC's, obtidos a partir da fuligem de velas (parafina), são influenciadas pela presença de íons prata em solução. Nesse estudo, foi observado que a intensidade de FL dos PQC's aumenta linearmente com o aumento da concentração de Ag(I). O método apresentou um limite de detecção de 5 nmol L⁻¹.

Wang e colaboradores (2015), propuseram um método baseado em PQCs para determinação fluorescente de Pb(II) e pirofosfato em soluções aquosas. Os PQCs foram preparados a partir de fuligem de querosene por refluxo em ácido nítrico concentrado. O método baseia-se na extinção da fluorescência dos PQCs provocada pela presença de íons Pb(II), que pode ser recuperada pela adição do pirofosfato, devido a sua capacidade de remover o Pb(II) da superfície dos PQCs. Uma boa linearidade para a determinação de Pb(II) foi alcançada para o intervalo de concentração de $5,0 \times 10^{-7}$ a $1,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Para o pirofosfato foi obtida uma faixa linear de concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,7 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

Recentemente, os PQCs vêm sendo explorados para transferência de energia utilizando o processo de ressonância por fluorescência (do inglês: *fluorescence resonance energy transfer*, FRET). Nesse processo ocorre uma transferência não radiativa da energia de excitação de um doador para um receptor (Zou et al., 2014; Yang et al., 2015).

Como exemplo de processos FRET envolvendo PQCs, Zou e coautores (2014), relataram o uso de PQCs, obtidos por meio do tratamento hidrotérmico de ácido cítrico e dietilenotriamina, para determinação fluorescente de Al(III) com base nesse fenômeno. Para essa finalidade, utilizaram os PQCs como doadores de energia não radiativa e o complexo formado pela quercetina-Al(III) como receptor. De maneira semelhante, Yang e colaboradores (2015) pesquisaram e propuseram a determinação de íons Zn(II), com base no FRET, entre os PQCs e o complexo quercetina-Zn(II), atuando como doador e receptor de energia não radiativa, respectivamente.

Outras pesquisas também evidenciam uma dependência do pH com a emissão de FL dos PQCs (Shen et al., 2013; Kong et al., 2014; Pedro et al., 2014). Shen e coautores (2013) produziram PQCs que apresentaram uma diminuição significativa da intensidade de emissão de FL com o aumento do pH do meio. Além disso, a resposta da FL dos PQCs com a variação do pH apresentou um comportamento reversível. Desse modo, estas nanopartículas oferecem

um potencial promissor como sensores de prótons. Pedro e colaboradores (2014) estudaram a influência do pH sobre os PQC's no intervalo de pH 2 a 11. Os resultados mostraram que o máximo de emissão de fluorescência (420 nm) dos PQC's, excitados a 325 nm, diminuiu linearmente com o aumento do pH do meio (4,5-11,5).

2.2.3.1. Mecanismos de emissão de fluorescência

Embora a origem da fluorescência (FL) ainda não esteja completamente estabelecida, alguns estudos relatam que a emissão de FL dos PQC's pode ser atribuída ao efeito de confinamento quântico e as diferentes armadilhas emissivas na superfície das nanopartículas (Baker & Baker, 2010; Li et al., 2012). Algumas propostas de mecanismo de emissão de fluorescência dos PQC's serão sucintamente abordadas, a seguir.

Em seu estudo, Li e colaboradores (2010) relataram um procedimento simples para síntese eletroquímica de PQC's, a partir de fragmentos de grafite, com tamanhos variáveis entre 1,2 a 3,8 nm. Esses autores afirmaram que a origem da forte emissão de FL dos PQC's é proveniente do tamanho das partículas obtidas (**Figura 2.7 (a) e (b)**). Eles realizaram diversos cálculos quânticos para buscar interpretar a afinidade entre fluorescência e o tamanho das partículas. Foi constatado 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 **Figura 2.7 (c)**. Desse modo, os autores concluíram que a forte emissão FL dos PQC's pode ser atribuída ao tamanho quântico da estrutura de grafite em vez da superfície das nanopartículas.

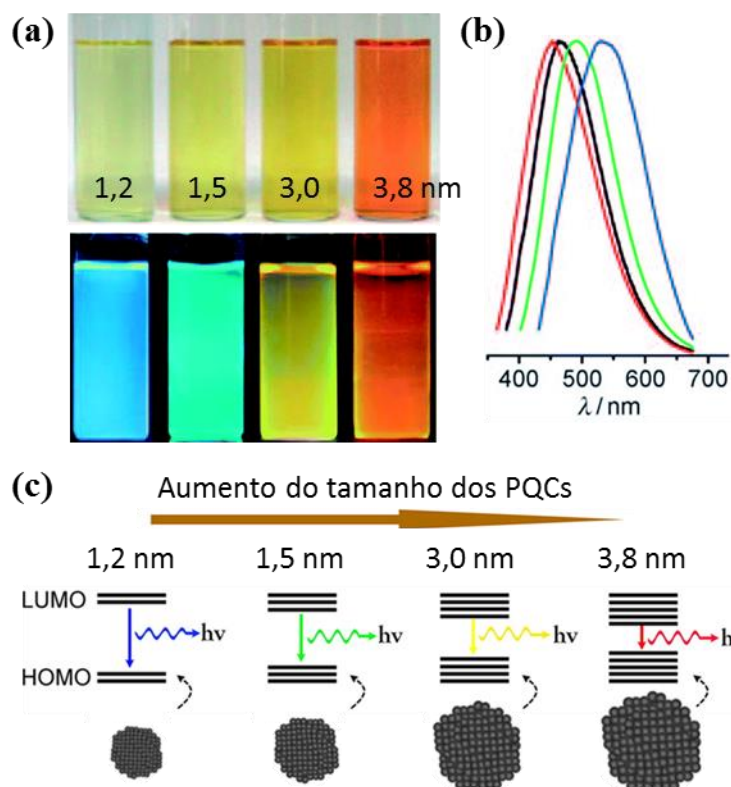


Figura 2.7. Fotografia das soluções de PQC sob radiação (a) visível e ultravioleta (365 nm). (b) Espectros de FL dos PQC de tamanhos 1,2; 1,5; 3,0 e 3,8 nm. (c) Representação da emissão de FL ajustável dos PQC. Figura modificada de Li et al. (2010).

Na **Figura 2.7 (a)** são mostradas as imagens de quatros PQC com diferentes tamanhos, excitados por radiação visível e ultravioleta (Li et al., 2010). Foram obtidas emissões de FL com elevada intensidade nas regiões azul, verde, amarela e vermelha, o que corresponde aos espectros da esquerda para a direita apresentados na **Figura 2.7 (b)**. As propriedades fotoluminescentes variam sensivelmente com o tamanho dos PQC (1,2; 1,5; 3,0 e 3,8 nm).

Mesmo que as propriedades ópticas dos PQC possam depender do tamanho dos nanocristais, um mecanismo semelhante ao descrito para as nanopartículas semicondutoras (ou seja, o *bandgap*) não pode ser entendido porque carbono grafítico não é um semicondutor (Costas-Mora et al., 2014; Lim et al., 2014).

Tem sido relatado que as diferentes armadilhas (sítios ativos) presentes na superfície dos PQC 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 e colaboradores (2016) produziram vários PQCs com emissão de FL ajustáveis, 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 de FL variando da região do azul para o vermelho, entre 440 e 625 nm (**Figura 2.8 (a)**). 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.

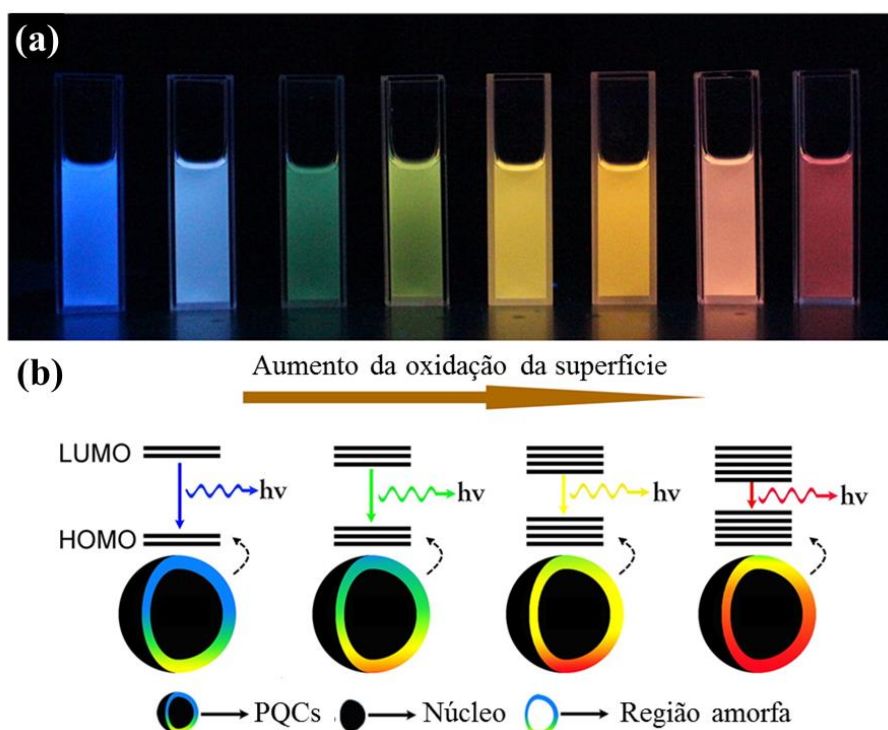


Figura 2.8. (a) Fotografia de oito amostras de PQC's excitadas sob a luz ultravioleta (365 nm) com máximos de emissão em 440, 458, 517, 553, 566, 580, 594 e 625 nm. **(b)** Modelo da emissão de FL ajustável dos PQC's. Ilustração adaptada de Ding et al. (2016).

Como esquematizado na **Figura 2.8 (b)** podemos observar o esquema do modelo de fluorescência dos PQC's proposto por Ding e colaboradores (2016). A lacuna de energia (*bandgap*), corresponde ao intervalo entre os orbitais HOMO e LUMO, e depende fortemente do grau de oxidação da superfície dos PQC's. Desse modo, o *bandgap* diminui com o acréscimo do número de átomos de oxigênio na estrutura dos PQC's, deslocando a emissão de FL para a região do vermelho.

Embora propostas de mecanismo ainda estejam sendo estudadas para diferentes rotas de síntese, a presença de armadilhas emissivas na superfície dos PQC's, introduzidas pela oxidação química e funcionalização, até o presente momento, parece ser o principal responsável pela emissão de FL dos PQC's, em diferentes comprimentos de onda (Yan, et al., 2016; Ganija & Cyriac, 2016).

2.3. Técnicas de síntese de pontos quânticos de carbono

As sínteses de PQC's podem ser realizadas por diferentes técnicas físicas ou químicas (Wang & Hu, 2014), podendo os PQC's serem modificados (funcionalizados, dopados e revestidos), durante ou após a sua preparação, conforme esquematizado na **Figura 2.9**.

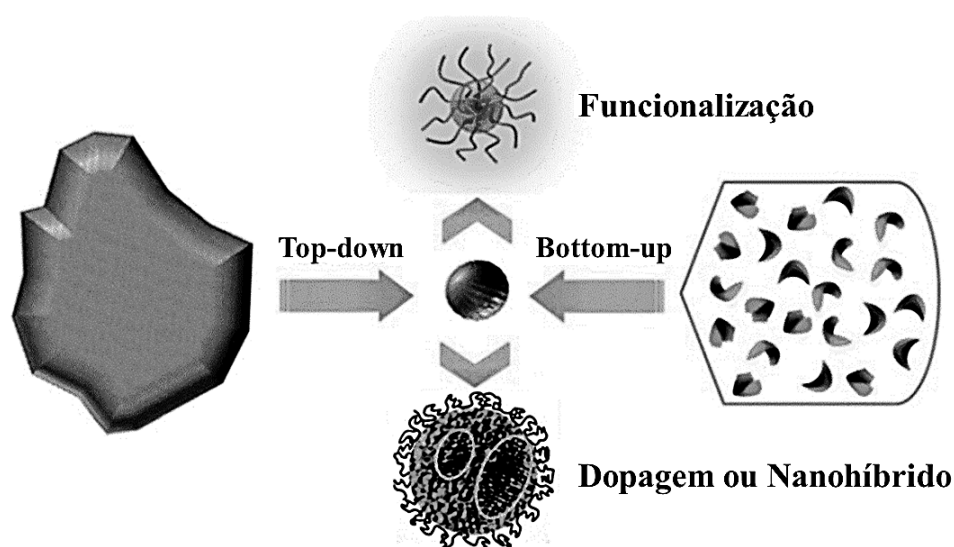


Figura 2.9. Diagrama esquemático da preparação dos PQC's via abordagens “top-down” e “bottom-up”, e etapas de modificações (funcionalização, dopagem ou nanohíbrido). Ilustração modificada de Wang & Hu (2014).

Os métodos físicos, designados de *top-down*, consistem em técnicas como irradiação com *laser*, oxidação eletroquímica ou tratamento ultrassônico, onde as nanopartículas são sintetizadas a partir da redução do tamanho de estruturas maiores, como grafeno ou grafite. Os métodos químicos, por sua vez, designados de *bottom-up*, envolvem técnicas tais como: o tratamento hidrotérmico, de vários precursores orgânicos, e a oxidação ácida, empregando, por exemplo, ácido sulfúrico concentrado (Silva & Gonçalves, 2011; Guo et al., 2016). No entanto, a maioria dos PQCs obtidos exibem uma faixa de emissão de fluorescência relativamente estreita, compreendendo a região do azul ao laranja, enquanto, apenas algumas pesquisas relatam a emissão dos PQCs na região do vermelho (Guo et al., 2016).

A estratégia de síntese e os precursores escolhidos 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).

Na **Tabela 2.2** estão resumidas as vantagens e desvantagens de alguns métodos de síntese utilizados na preparação das nanopartículas de carbono.

Nos últimos anos, um esforço considerável tem sido despendido no desenvolvimento de métodos de síntese para obtenção dos PQCs (Lim et al., 2015). Diferentes métodos físicos ou químicos, tais como: irradiação com *laser* e com microondas, oxidação eletroquímica, tratamento ultrassônico e tratamento hidrotérmico têm sido empregados na preparação de PQCs (Baptista et al., 2015). No entanto, alguns desses métodos de síntese apresentam limitações, tais como: necessidade de equipamentos dispendiosos, utilização de grande quantidade de ácidos fortes, PQCs com baixo rendimento quântico. Assim, vários estudos têm sido focados na utilização do tratamento hidrotérmico para preparação de PQC a partir de bioprecursores naturais, devido sua simplicidade, versatilidade e baixo custo (Barati et al., 2015).

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

MÉTODOS SINTÉTICOS	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Oxidação eletroquímica ^a	- Tamanho controlável; - Etapa única.	- Poucos precursores de baixa massa molecular.
Irradiação com <i>laser</i> ^a	- Rápido; - Superfície dos PQC's ajustável.	- Baixo rendimento quântico; - Difícil controle do tamanho.
Tratamento ultrassônico ^a	- Rápido; - Ambientalmente amigável; - Custo reduzido.	- Baixo controle sobre o tamanho.
Oxidação ácida ^b	- Instrumentação simples; - Vários precursores.	- Baixo controle sobre o tamanho; - Processos lentos.
Tratamento hidrotérmico ^b	- Baixo custo; - Ambientalmente amigável; - Não tóxico.	- Baixo controle sobre o tamanho.

^a Métodos físicos; ^b Métodos químicos.

2.3.1. Tratamento hidrotérmico para pontos quânticos de carbono

O tratamento hidrotérmico tem se destacado como uma técnica apropriada para a preparação de PQC's a partir de diferentes precursores de carbono, tais como: carboidratos, moléculas orgânicas e uma variedade de bioprecursores naturais (Wang & Hu, 2014). Uma variedade de nanomateriais de carbonos, com diferentes tamanhos, formas e grupos funcionais, já foram sintetizados por esse processo (Barati et al., 2015).

Essa técnica pode ser classificada em dois processos, de acordo com as condições experimentais e os mecanismos de reação. O tratamento hidrotérmico em altas temperaturas (de 300 a 800°C), permitindo a síntese de nanotubos de carbono, grafite, e carvão ativado, e o processo que ocorre em baixas temperaturas (< 300°C), onde os materiais carbonáceos podem ser produzidos de acordo com reações de desidratação e polimerização conhecidos (Hu et al., 2010). Esse último, muito empregado na preparação de PQC's.

A preparação de PQCs via tratamento hidrotérmico é realizada, normalmente, adicionando uma alíquota da solução precursora de carbono em um reator fechado (uma autoclave de teflon, por exemplo), que é posteriormente submetido a aquecimento em um forno mufla, a temperatura inferior a 200°C (Barati et al., 2015).

A **Figura 2.10** representa um procedimento simples e ambientalmente amigável, de preparação de PQCs a partir do suco de laranja em etanol anidro. O mecanismo de formação das nanopartículas envolve a carbonização hidrotérmica dos principais constituintes de suco de laranja, tais como sacarose, glicose, frutose, ácido cítrico e ácido ascórbico (Sahu et al., 2012). Foi obtido PQCs esféricos com distribuição de tamanhos de 1,5 a 4,5 nm, apresentando forte emissão fluorescente em 455 nm, quando excitados em 390 nm.

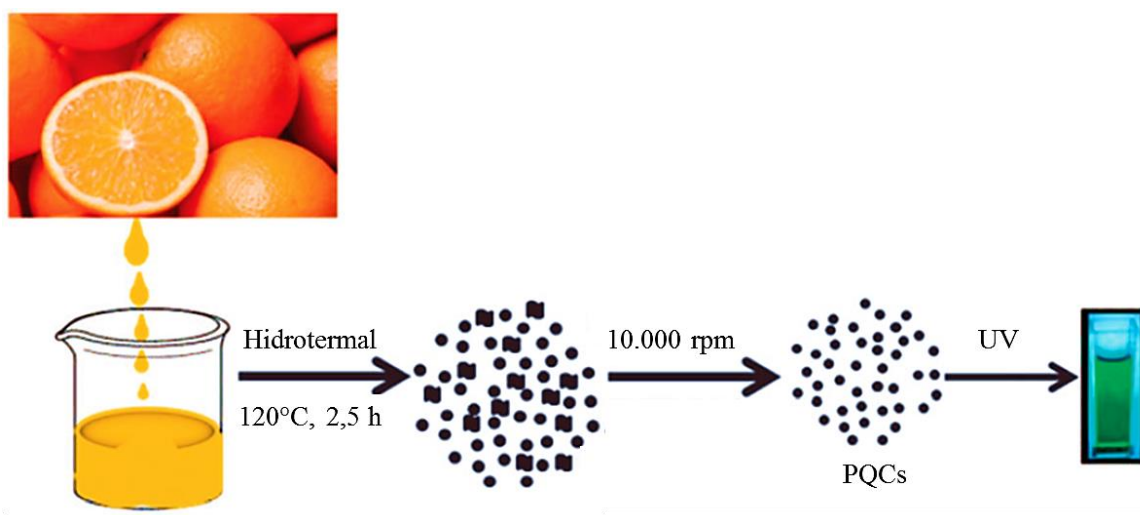


Figura 2.10. Esquema de síntese dos PQC por meio do tratamento hidrotérmico do suco de laranja. Ilustração adaptada de Sahu et al. (2012).

Várias sínteses hidrotérmicas de PQC fluorescentes, a partir de bioprecursores naturais, têm sido relatados na literatura, tais como grama (Liu et al., 2012), pó de café (Hsu et al., 2012), banana (De & Karak, 2013), suco de morango (Huang et al., 2013), caldo de cana de açúcar (Mehta et al., 2014), folhas de bambu (Liu et al., 2014), suco de uva (Huang et al., 2014), batata (Xu et al., 2014a), suco de manga (Jeong et al., 2014) e alho (Zhao et al., 2015). A maioria

dos métodos apresentaram uma estratégia fácil, verde, econômica e eficiente de preparação dos PQCs por tratamento hidrotérmico.

É interessante enfatizar que embora o baixo controle de tamanho seja tido como uma desvantagem na síntese hidrotérmica, trabalhos recentes demonstram que uma separação por coluna porosa é possível e viável para obtenção de nanocristais com dimensões mais uniformes, podendo obter-se assim espectros de emissão com bandas mais estreitas condizentes com a distribuição homogênea dos tamanhos (Ding, et al., 2016).

2.3.2. Funcionalização da superfície dos PQCs

Os PQCs podem ter a sua superfície funcionalizada de modo a alterar suas propriedades de fluorescência e modificar suas propriedades físicas, como a sua solubilidade em solventes aquosos ou não aquosos, de acordo com a aplicação analítica de interesse (Lim et al., 2014). Várias abordagens de funcionalização da superfície dos PQCs têm sido relatadas, através da química de superfície ou de interações, dentre elas destacam-se: funcionalização por ligação covalente (Liao et al., 2013), coordenada (Zhao et al., 2011), interações π - π (Li et al., 2011), e funcionalização por processo sol-gel (Mao et al., 2012).

Zhao e colaboradores (2011) propuseram um método fluorescente utilizando PQCs dopados com európio(III), para a determinação de íons fosfato em matrizes complexas. Os íons Eu^{3+} coordenam-se com os grupos carboxilatos presentes na superfície dos PQC, inibindo a fluorescência dos mesmos. Contudo, a fluorescência pode ser ativada com a adição de fosfato, devido a sua forte coordenação com os íons Eu^{3+} (**Figura 2.11**).

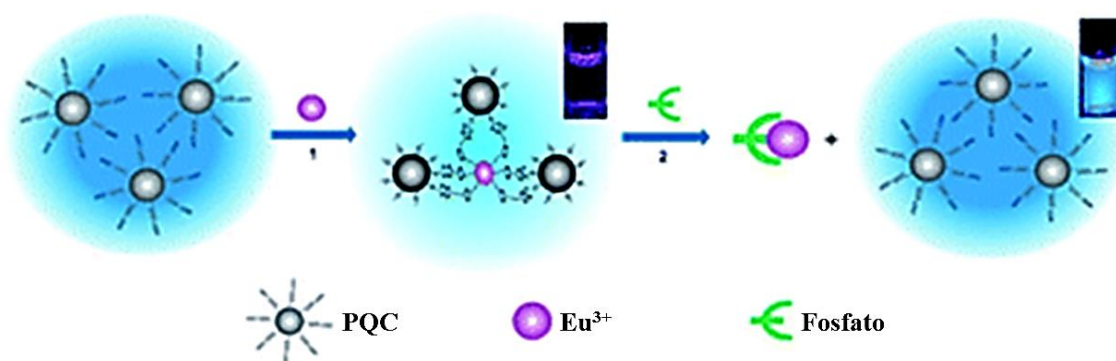


Figura 2.11. Representação da determinação de fosfato baseada na fluorescência da sonda de PQC dopado com Eu^{3+} . Figura modificada de Zhao et al. (2011).

Outros métodos também vêm sendo utilizados para alterar as propriedades fotoluminescentes dos PQC, tais como a dopagem com elementos químicos como o nitrogênio (Xu et al., 2013), enxofre (Sun et al., 2013) e fósforo (Prasad et al., 2013). Alguns nanohíbridos compostos por PQC com núcleos de nanopartículas inorgânicas, tais como: óxidos de ferro (Zhang et al., 2011), zinco (Sun et al., 2008), silício e titânio (Li et al., 2010), têm sido desenvolvidos. Os nanohíbridos resultantes conseguem integrar as propriedades fotoluminescentes dos PQC com as propriedades ópticas, magnéticas ou mecânicas dos núcleos de óxidos.

2.4. Consideração sobre as técnicas de caracterização dos PQC

A escolha adequada das técnicas de caracterização deve ser realizada levando 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, podemos declarar que o seu desenvolvimento estimulou significativamente os estudos da nanotecnologia.

As técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (do inglês: *transmission electron microscope*, TEM), espectroscopia infravermelho com transformada de fourier (do inglês:

fourier transform infrared, FTIR), espectrometria de absorção molecular no ultravioleta-visível (UV-vis) e espectrometria de fluorescência molecular, são as mais habitualmente empregadas nos estudos direcionados a caracterização de nanopartículas de carbono. Tais técnicas podem fornecer informações significativas sobre as propriedades ópticas, estruturais e morfológicas das nanopartículas (Lim et al., 2015).

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão tem-se mostrado a mais apropriada para a aquisição de imagens diretas das nanopartículas, permitindo a obtenção de informações sobre a uniformidade e distribuição dos tamanhos das nanopartículas. Na **Figura 2.12 (a)** é apresentada uma imagem obtida por TEM de PQC's preparados por tratamento hidrotérmico de suco de banana (De & Karak, 2013). Os diferentes grupos funcionais presentes nos PQC's podem ser evidenciados através da análise dos espectros de FTIR (**Figura 2.12 (b)**). As propriedades ópticas dos PQC's podem ser observadas a partir dos espectros de absorção molecular UV-Vis (**Figura 2.12 (c)**) e de fluorescência (**Figura 2.12 (d)**).

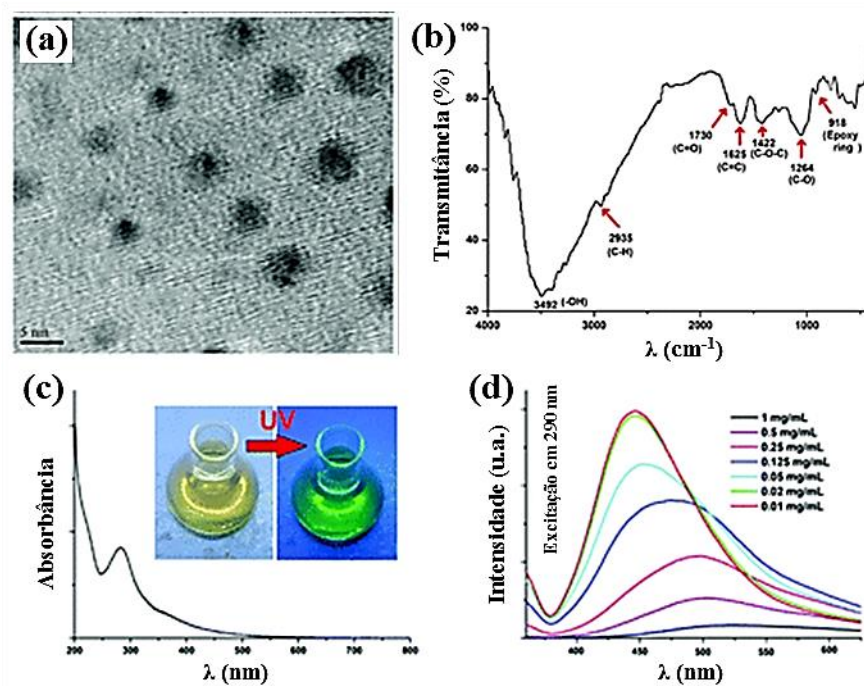


Figura 2.12. (a) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), (b) espectros de FTIR, (c) absorção molecular UV-Vis, e (d) fluorescência das nanopartículas de carbono. Figura adaptada de De & Karak (2013).

2.5. Aplicação de pontos quânticos de carbono na determinação fluorescente de íons metálicos

O uso dos PQC's em química analítica é recente e tem se demonstrado promissor (De & Wang & Hu, 2014; Li et al., 2014). Devido as suas propriedades ópticas ajustáveis, os PQC's vem sendo empregados para a determinação de fosfato (Zhao et al., 2011), nitrito (Lin et al., 2011), cloro (Xue et al., 2015), flúor (Shamsipur, et al., 2015), amônia (Ganiga & Cyriac, 2016), e principalmente na determinação fluorescente de íons metálicos, tais como: Ag(I), K(I), Hg(II), Cu(II), Fe(III), Pb(II), Sn(II), U(VI) e Cr(VI) (Guo et al., 2015; Liu et al., 2015).

As propriedades de fluorescência dos PQC's vêm sendo exploradas de diversas maneiras para a análise de íons metálicos, como discutido na **Seção 2.2.3**. A maioria dos trabalhos exploram a extinção de emissão da fluorescência (Fluorescência *turn-off*) dos PQC's provocada pela presença de íons metálicos (Guo et al., 2015).

Dong e coautores (2012), propuseram um método seletivo e sensível para a determinação de Cu(II) em água empregando PQC's, obtidos a partir de ácido cítrico e polietilenoimina. Foi observado uma forte extinção da fluorescência dos PQC's na presença do íons cobre(II) em pH 4,0. Como mostrado na **Figura 2.13**, a diminuição da fluorescência dos PQC's ocorre devido a formação do complexo entre o íon Cu(II) e os grupos aminas presentes na superfície dos PQC's. A mesma interação entre o íon cobre(II) e os grupos aminas presentes na superfície dos PQC's, também foi verificada por Liu e colaboradores (2014) e Gedda e coautores (2016).

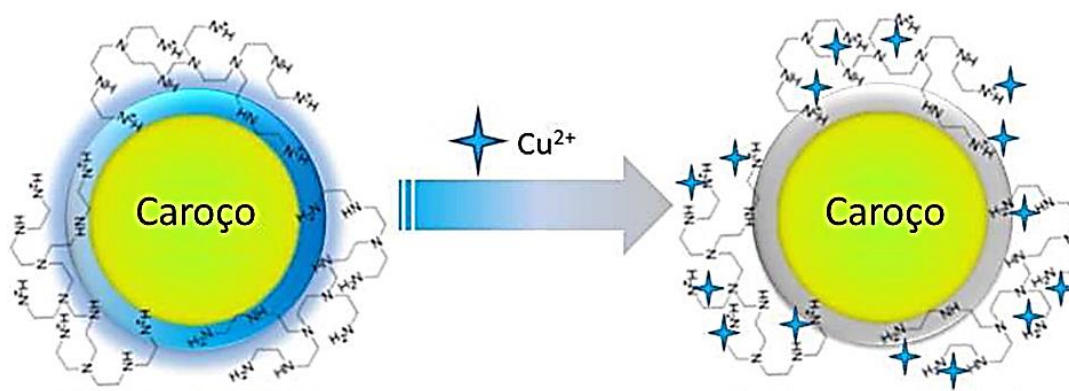


Figura 2.13. (a) Representação esquemática da extinção de fluorescência dos PQC na presença do íon Cu(II) .

Liu e coautores (2014), produziram PQC a partir da folha de bambu por meio de tratamento hidrotérmico à baixa temperatura. Os PQC foram funcionalizados com polietilenoimina, e apresentaram forte extinção da fluorescência na presença do íon cobre(II) em pH 4,0. O método apresentou uma faixa linear de concentração entre 0,333 a 66,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com um limite de detecção de 115 nmol L^{-1} .

Gedda e colaboradores (2016), desenvolveram um método fluorescente baseado em PQC para determinação de Cu(II) em água. As nanopartículas foram obtidas pela síntese hidrotérmica, a baixa temperatura, da casca de camarão, sem a necessidade de funcionalização. O método é baseado na forte extinção da fluorescência dos pontos de carbono devido ao complexo formado entre com o Cu(II) e os grupos amina presentes na superfície dos PQC, em tampão PBS (pH 4,0). Foi estabelecida uma faixa linear de concentração entre 10 a 1100 nmol L^{-1} , com um limite de detecção de 5 nmol L^{-1} .

Alguns métodos empregam o aumento da emissão de fluorescência dos PQC (fluorescência *turn-on*) na presença de alguns íons metálicos. Zhang e coautores (2014b), por exemplo, demonstraram que a fluorescência de PQC, produzidos com ácido cítrico e polietilenoimina, poderia ser aumentada linearmente com a concentração de zinco(II) na faixa de 2 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em meio básico (pH 8,5), apresentando um limite de detecção de

$2 \mu\text{mol L}^{-1}$. Este método foi aplicado com sucesso na determinação de zinco(II) em sistemas biológicos.

Recentemente, os pontos quânticos de carbono vêm sendo empregados no desenvolvimento de sensores químicos de dupla detecção (*dual sensor*) para íons metálicos com alta sensibilidade e seletividade.

Zhang e colaboradores (2014a), propuseram um método baseado em PQC's para determinação fluorescente seletiva dos íons Fe(III) e Cu(II) em águas. Os PQC's com alto rendimento quântico foram preparados a partir de ureia por aquecimento. Foi observado que a intensidade de fluorescência dos PQC's foi gradualmente reduzida na presença dos íons Fe(III) e Cu(II), e permanece inalterada na presença de outros íons. O hexametáfosfato de sódio foi empregado como agente mascarante de Fe(III), permitindo a determinação seletiva de Cu(II). Este método permitiu a análise de Fe(III) e Cu(II) em uma faixa linear de concentração de 5 a $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, com limites de detecção de 1,0 e $0,5 \text{ nmol L}^{-1}$ para os íons Fe(III) e Cu(II), respectivamente.

Yang e coautores (2014), desenvolveram um método fluorescente para a determinação de Cu(II) e Hg(II) empregando PQC's dopados com nitrogênio e enxofre. Os N-PQC's apresentam seletividade e sensibilidade na determinação de Cu(II), enquanto que os S-PQC's obtiveram sensibilidade e seletividade na análise de íons Hg(II). Uma faixa de concentração linear entre 10 a 200 nmol L^{-1} e um limite de detecção de 5 nmol L^{-1} , foram obtidos na determinação de Cu(II). Para a determinação de Hg(II) foi observado um intervalo de concentração linear de 2 a 200 nmol L^{-1} e um limite de detecção de 2 nmol L^{-1} .

Recentemente, Yu e colaboradores (2015) demonstraram o uso de PQC's, obtidos a por meio tratamento hidrotérmico de um bioprecursor de carbono, para a determinação fluorescente de Hg(II) e Fe(III). O método proposto baseia-se na extinção da fluorescência proporcional a concentração de Hg(II) e Fe(III), simplesmente utilizando uma solução tampão de HAC-NaAC

para o íon Hg(II) e Tris-HCl para o íon Fe(III). Foram obtidos uma faixa de concentração linear e limite detecção de 0,01 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 5,5 nmol L^{-1} para o Hg(II), e 0,025 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,075 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o Fe(III).

2.6. Considerações sobre sistemas automáticos de análise química

Métodos analíticos clássicos são normalmente elaborados e aplicados em laboratórios industriais e centros de pesquisa. Não obstante, procedimentos automáticos estão cada vez mais presentes e competitivos. Os sistemas automáticos permitem realizar análises químicas em menos tempo, com um menor consumo de reagentes e amostras, reduzindo a geração de resíduos. Quanto a performance analítica, possibilitam o desenvolvimento de procedimentos mais sensíveis e reprodutíveis, minimizando eventuais erros decorrentes do analista (Trojanowicz, 2008).

Nessa perspectiva, nas últimas décadas, uma grande parcela da química analítica vem-se dedicado ao estudo desses sistemas. Os analisadores automáticos podem ser classificados quanto a sua natureza e forma de automatização em três grupos: analisadores em batelada ou discretos, robotizados e em fluxo (Facchin, 1996).

Os analisadores em batelada, são versões mecanizadas dos procedimentos tradicionais realizados de forma manual. Caracterizam-se, comumente, por empregarem um recipiente individual para cada amostra e por transportar a mistura reacional para um detector através de um sistema mecânico. Normalmente, as medições são realizadas após o estabelecimento do equilíbrio físico e químico do sistema, objetivando alcançar o máximo sinal analítico.

Os analisadores robotizados são distinguidos por executar as operações analíticas com o auxílio de um braço mecânico controlado por computador, substituem os procedimentos executados manualmente. A complexidade mecânica e o custo elevado fazem com que esses sistemas automáticos possuam limitação relacionada a sua implementação e manutenção.

Contudo, eles desempenham um papel significativo em etapas preliminares de processos analíticos, sobretudo em tarefas que exigem a manipulação de produtos tóxicos ou explosivos.

Os analisadores em fluxo, por sua vez, apresentam as características de processamento da amostra e reagente em fluxo contínuo, seccionado ou não por bolhas de ar. De maneira geral, devido à quantidade crescente de analisadores em fluxo, a IUPAC (acrônimo, em inglês, de *International Union of Pure and Applied Chemistry*) (Zagatto et al., 2002), tem recomendado uma classificação de acordo com o processamento da amostra e/ou reagente(s) bem como da característica básica de seu fluxo.

Apesar da importância dos métodos em batelada e dos métodos robotizados, na implementação e automatização de procedimentos químicos, os métodos em fluxo registram um acentuado crescimento, tanto em termos de divulgação científica, quanto em áreas de aplicação industrial e acadêmica (Kolev & McKelvie, 2008).

Desde o desenvolvimento do primeiro analisador automático em fluxo, publicado em 1957 (Skeggs, 1957), inúmeros analisadores vem sendo propostos, os fundamentais representam a análise por injeção em fluxo (do inglês: *flow injection analysis* - FIA) (Ruzicka & Hansen, 1975), análise em fluxo monossegmentado (*monosegmented flow analysis* - MSFA) (Pasquini & Oliveira, 1985), análise por injeção sequencial (*sequential injection analysis* - SIA) (Ruzicka & Marshall, 1990), análise em fluxo multicomutado (*multicommutation in flow analysis* - MFA) (Reis et al., 1994) e análise em fluxo-batelada (*flow-batch analysis* - FBA) (Honorato et al., 1999), como pode ser representado pela **Figura 2.14**.

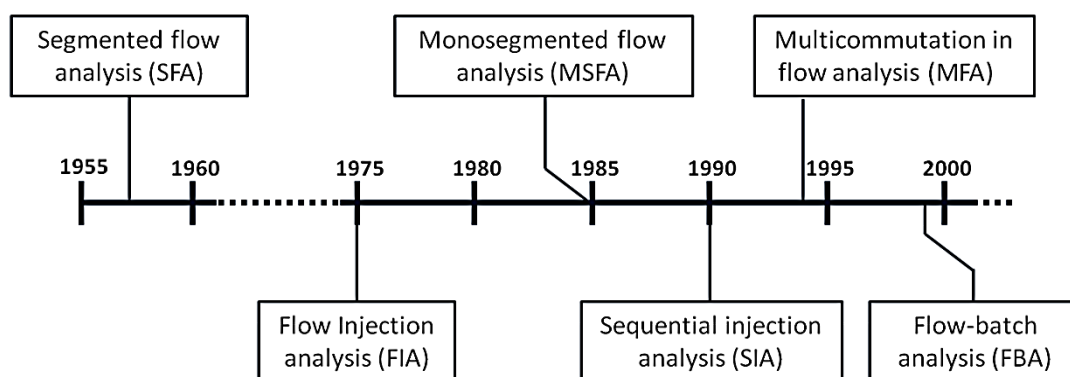


Figura 2.14. Diagrama representando a linha do tempo para os principais analisadores automáticos em fluxo.

Características como, tipo de confluência, aspiração/bombeamento de amostra e reagente e sua segmentação definem as peculiaridades de cada sistema. Embora cada um desses sistemas em fluxo apresente suas peculiaridades, todos eles exibem uma configuração geral comum, como ilustrado na **Figura 2.15**.

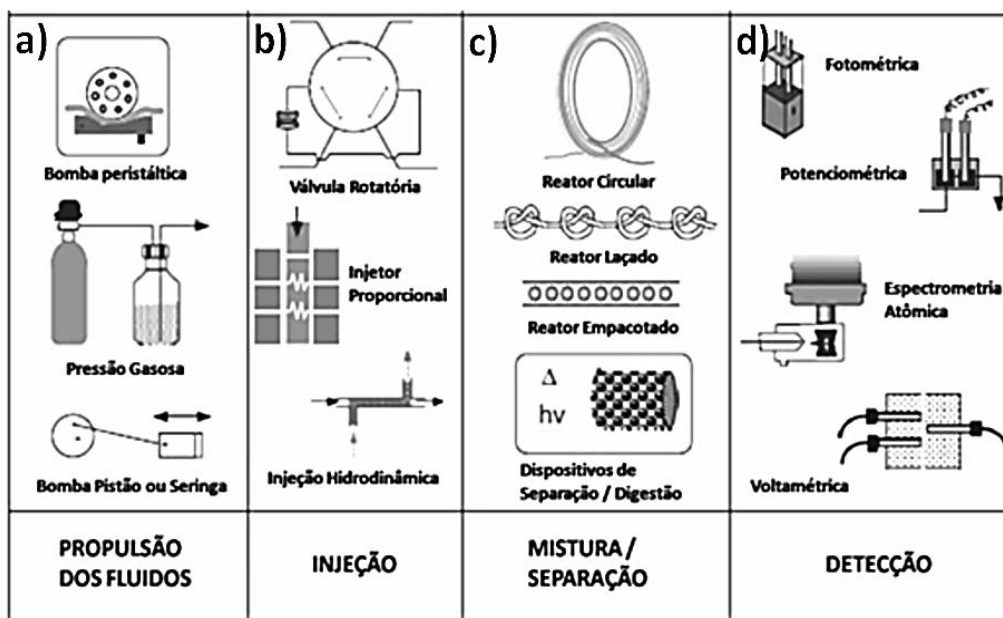


Figura 2.15. Exemplos (a) de sistemas para propulsão dos fluidos, (b) de sistemas de injeção, (c) de sistemas de homogeneização e (d) de detectores.

A propulsão dos fluídos pode ser realizada por meio de uma bomba peristáltica, muito embora vários outros componentes possam ser explorados para esta finalidade, como as bombas

pistão e solenoide (**Figura 2.15 (a)**). O controle adequado das alíquotas de reagente e amostra adicionadas ao sistema é, convenientemente, realizado por um injetor proporcional, válvulas solenoides ou válvulas rotatórias (**Figura 2.15 (b)**).

Comumente, análises em fluxo exigem acessórios para promover misturas, digestões ou extrações. Essas etapas são promovidas por uma bobina de reação que podem ser modificadas de acordo com o processo requerido (**Figura 2.15 (c)**). A detecção do(s) analito(s) em um analisador em fluxo pode ser realizada das mais diversas formas (**Figura 2.15 (d)**).

Dos analisadores elencados na **Figura 2.14**, para melhor compreensão do trabalho aqui descrito, será discutido, na próxima seção, apenas o sistema fluxo-batelada (FB).

2.7. Sistemas automáticos em fluxo-batelada

Conforme descrito na literatura (Diniz et al., 2012) e comparado a outros sistemas automáticos, os sistemas automáticos em fluxo-batelada (FB) apresentam qualidades analíticas significativas, como a possibilidade de realização de procedimentos com menor limite de detecção e geração de resíduo, e maior taxa de amostragem. Outras vantagens, quando comparado a sistemas de análise em fluxo, é a facilidade de preparar as soluções de calibração e etapas de extração *in-line*, homogeneização rápida, ausência do fluído carregador, implementação do sistema de detecção. Essas vantagens do sistema FB perante os outros sistemas deve-se a sua própria composição. Como pode ser visto no esquema apresentado na **Figura 2.16**, o sistema FB é constituído basicamente dos seguintes componentes:

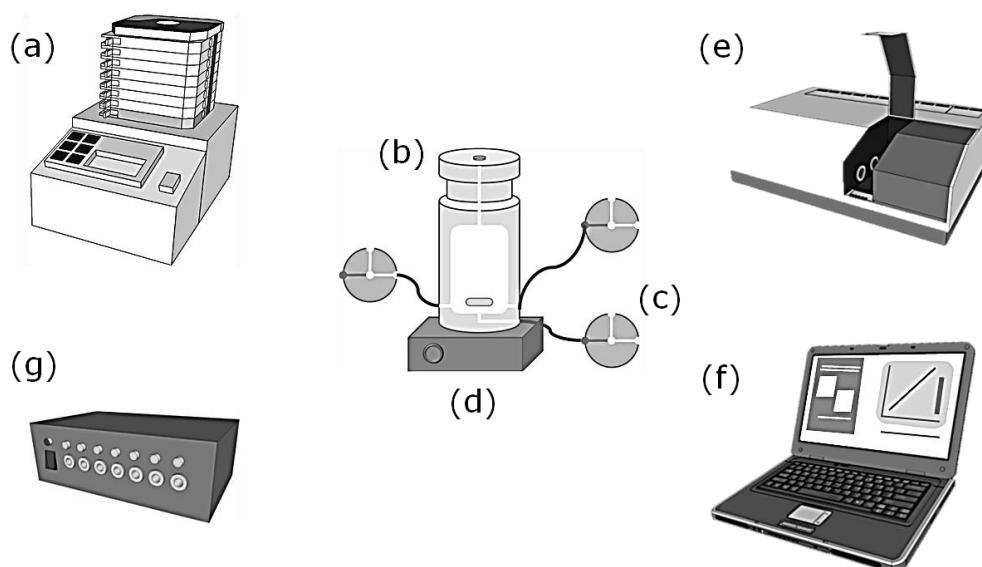


Figura 2.16. Esquema ilustrativo dos principais componentes do FBA. **(a)** bomba peristáltica, **(b)** câmara de mistura, **(c)** válvulas solenoides, **(d)** agitador magnético, **(e)** sistema de detecção, **(f)** computador e **(g)** acionador de válvulas.

- Sistema de propulsão: para efetuar a propulsão dos fluidos no FB, geralmente é utilizado uma bomba peristáltica (**Figura 2.16 (a)**), devido a sua capacidade de impulsionar os líquidos por vários canais simultaneamente, mantendo a vazão constante. No entanto, dispositivos como microbombas de diafragma ou pistão, bombas seringas, podem ser utilizados para a mesma finalidade;
- Sistema de adição dos fluidos: no FB, volumes predefinidos e precisos de reagentes e amostras, adicionados ou aspirados da câmara de mistura, são controlados pelas válvulas solenoides (**Figura 2.16 (c)**). Outros sistemas de comutação podem ser empregados, como válvulas pinça, válvulas SIA, microbombas (que executam a função da válvula e do sistema de propulsão), etc.;
- Câmara de mistura ou câmara reacional: é uma das principais características do sistema FB (**Figura 2.16 (b)**). É constituída por uma pequena peça cilíndrica, geralmente de Teflon® ou acrílico, com volume interno variável de 0,5 a 2,0 mL. Nessa câmara de mistura ocorre a maior parte dos procedimentos analíticos, como por exemplo, a adição,

homogeneização, pré-tratamento, reações, acondicionamento dos fluidos, preparo de soluções de calibração, detecção do analito, entre outros.

- A eficiente mistura dos fluidos pode ser alcançada pela utilização de uma pequena barra magnética no interior da câmara, sendo o movimento da barra magnética estimulado pelo campo gerado pelo acionamento de um agitador magnético (**Figura 2.16 (d)**);
- Sistema de detecção: o dispositivo empregado para detecção (**Figura 2.16 (e)**) irá depender do método empregado na análise, podendo ser, caso necessário, acoplado ao detector à câmara;
- Sistema de controle: todo o controle do sistema, geralmente, é realizado com o auxílio do computador (**Figura 2.16 (f)**), garantindo velocidade e precisão nas análises. Para o controle das válvulas é utilizado um acionador de válvulas (**Figura 2.16 (g)**).

A combinação desses acessórios garante as características intrínsecas dos analisadores em fluxo (alta velocidade analítica, baixo consumo de amostra e reagentes, baixo custo de montagem e facilidade de automatização) e dos analisadores em batelada (universalidade de aplicações, robustez e versatilidade) fornecendo ao analisador fluxo-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.

Apesar do sistema FB ter sido proposto originalmente, para viabilizar a execução de titulações, empregando o método de Fibonacci para detecção do ponto final (Honorato et al., 1999), vários outros trabalhos ao longo dos anos demonstram a viabilidade desse sistema automático para muitas outras aplicações analíticas. E nesse contexto, vários métodos vêm sendo desenvolvidos, explorando as características do FB (Diniz et al., 2012).

2.7.1. Aplicações analíticas em sistemas fluxo-batelada

Quanto a aplicação do sistema FB em matrizes viscosas, alguns trabalhos do nosso grupo de pesquisa, até o momento, reportam diferentes procedimentos analíticos, empregando simples pré-tratamento externo ou *on-line* conforme a análise química proposta.

Em 2012, Lima e coautores desenvolveram um método simples e rápido para determinação automática de glicerol livre em matriz viscosa, biodiesel, empregando um processo *on-line* de extração líquido-líquido. Este método envolve a reação oxidativa do glicerol na presença do íon periodato, o que resulta em um formaldeído o qual reage, na sequência, com a acetilacetona originando um produto final fluorescente (3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina) com máximo de emissão em 514 nm (Lima et al., 2012a).

Um método para determinação de fósforo em amostras de biodiesel, também foi proposto no sistema FB (Lima et al., 2012c). Os autores propuseram a adição da amostra mineralizada (calcinada) no sistema automático, aquecendo gradualmente as amostras até 550°C. O método compreende a reação do fósforo com o reagente azul de molibdênio, em meio ácido, gerando um sinal analítico com máximo de absorção em 850 nm, proporcional a concentração do analito.

Barreto e colaboradores (2013) propuseram um analisador FB para determinação de íons Fe(III) em óleo comestível e lubrificante sem a necessidade de pré-tratamento externo ao sistema automático. O método desenvolvido, em meio orgânico, consiste na reação do íon tiocianato com o íon ferro(III) formando um complexo vermelho com máximo de emissão em 520 nm.

Recentemente, alguns procedimentos automáticos empregando o sistema FB vem sendo desenvolvido, explorando as vantagens dos nanocristais semicondutores como reagentes fluorescentes de elevada sensibilidade e estabilidade química.

Lima e coautores (2014a) propuseram a aplicação de pontos quânticos (PQs) no sistema automático FB. Neste trabalho de pesquisa, foram determinados a concentração de ácido ascórbico em amostras de suco de frutas, utilizando nanocristais de telureto de cádmio (CdTe). O método foi baseado na extinção de fluorescência sofrida pelos PQs de CdTe na presença de ácido ascórbico. Tal processo está relacionado com as interações superficiais que diminuem a fluorescência das nanopartículas, proporcional a concentração do analito (Lima, et al., 2014a).

Lima e colaboradores (2014b) também descreveram uma combinação de um sistema FB para determinação de *N*-acetil-*L*-cisteína em formulações farmacêuticas empregando uma webcam como sistema de detecção integrado a câmara de mistura. O método consiste nas interações superficiais do analito com os PQs de CdTe, tal interação permite o aumento da intensidade de fluorescência relacionada possivelmente ao aumento do *gap* de energia do nanocristal semiconductor, proporcional a concentração da cisteína (Lima et al., 2014b).

Em 2015, Lima e colaboradores apresentaram um novo método automático para determinação fluorescente de ferro total em amostras viscosas (óleos comestíveis e biodiesel), utilizando pontos quânticos de telureto de cádmio (PQs de CdTe). Neste estudo foi considerado a extração em fase única *in-line* empregando uma mistura de etanol/clorofórmio (75:25 v/v) para dissolver a amostra oleosa e permitir a eficiente interação entre os íons ferro(III) e as nanopartículas de CdTe (Lima et al., 2015). Nesse método, a interação superficial dos pontos quânticos com os íons ferro ocasiona a diminuição da intensidade de fluorescência, proporcional a concentração dos íons em solução.

Nessa perspectiva, esse trabalho propõem o uso dos pontos quânticos de carbono, obtidos através da síntese hidrotérmica de suco de abacaxi, para o desenvolvimento de um novo método fluorescente para determinação direta de cobre(II) em óleos comestíveis empregando um sistema automático em fluxo-batelada.

2.8. Determinação de cobre em óleos comestíveis

Os óleos comestíveis compreendem um dos componentes essenciais na dieta humana, pois apresentam nutrientes indispensáveis para uma alimentação balanceada. Eles são amplamente utilizados nas residências, restaurantes, e nas indústrias alimentícias (Mendil et al., 2009). Esses óleos desempenham um papel importante nas reações metabólicas no organismo humano, contribuindo, por exemplo, para a redução do colesterol (Pinto et al., 2006). Além disso, a sua ingestão regular pode ser associada a prevenção de problemas cardiovasculares (Trindade et al., 2015).

A determinação do teor de metais em óleos comestíveis compreende um importante critério para a avaliação da qualidade desse alimento, devido a sua influência direta nas propriedades organolépticas e nutricionais dessas matrizes (Nunes et al., 2011). Devido à complexidade da matriz orgânica e as baixas concentrações dessas substâncias, essas determinações podem ser consideradas um desafio analítico e muitos esforços ainda estão sendo dedicados ao seu estudo (Lima et al., 2015).

A presença de alguns metais em óleos comestíveis, tais como cobre, mesmo em baixas concentrações, pode promover a degradação e a oxidação do produto, prejudicando a sua qualidade (Chaves et al., 2011). Parâmetros tais como sabor, odor, valor nutricional e prazo de validade podem ser comprometidos pela presença desse metal (Pinto et al., 2006). Além disso, dependendo da concentração, esse íon metálico pode ser considerado tóxico para o consumo humano.

Em geral, o cobre pode ser incorporado como contaminante em óleos comestíveis de forma natural, devido a sua presença na matéria-prima (semente do vegetal), ou durante os processos de extração e conservação do óleo, sobretudo através do contato com equipamentos utilizados em seu refino (Cabrera-Vique et al., 2012). Além disso, são produtos susceptíveis a uma possível adulteração, de interesse econômico, utilizando para isto compostos de menor

qualidade, por conseguinte, de maior carga inorgânica, sujeita a uma maior contaminação metálica (Pinto et al., 2006; Burguera & Burguera, 2011).

No caso do cobre, já existe uma legislação vigente para regulamentar o teor aceitável desse metal nesse alimento. A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, vinculada a Organização Mundial da Saúde, estabelece um limite máximo aceitável de $0,4 \text{ mg Kg}^{-1}$ e $0,1 \text{ mg Kg}^{-1}$ de cobre em óleos comestíveis virgens e refinados (Codex Alimentarius, 2009).

Nesta perspectiva, ocorre um crescente interesse na determinação de cobre em óleos comestíveis para contribuir no controle qualidade do produto. Assim, vários métodos têm sido desenvolvidos e aplicados para a determinação de cobre em óleos comestíveis, geralmente empregando medidas de espectrofotometria atômica (Trindade et al., 2015). Entretanto, a necessidade de pré-tratamento da amostra, antes da análise, ainda é um ponto crucial para maioria desses métodos (Pinto et al., 2006; Barreto et al., 2013).

Nesse sentido, os principais procedimentos de pré-tratamento da amostra que são utilizados para determinar o teor de metais em óleos incluem a calcinação, digestão ácida, preparação de emulsão, microemulsão, introdução direta da amostra, extração líquido-líquido e a diluição com solventes orgânicos (Trindade et al., 2015).

A calcinação das amostras geralmente apresenta bons resultados em termos de precisão. Contudo, esse processo laborioso provoca perdas mecânicas, favorece a perda do analito por volatilização, emprega o uso de altas temperaturas e necessita de filtração após a solubilização parcial das cinzas (Garrido et al., 1994).

Alguns procedimentos de pré-tratamento envolvem a digestão da amostra. No entanto, esse procedimento geralmente é realizado sob condições agressivas com ácidos ou oxidantes concentrados, em elevadas quantidades (Mendil et al., 2009).

A emulsão e microemulsão também têm sido empregados para a extração de metais em matrizes viscosas. No entanto, problemas com a estabilidade das emulsões e das microemulsões também são relatados (Nunes et al., 2011).

Outra maneira de preparar amostras de óleos comestíveis para a determinação de metais é através da diluição da amostra em solventes orgânicos (Burguera & Burguera, 2011). Esta estratégia tem como vantagem a simplicidade e velocidade de implementação, além da possibilidade de integração do pré-tratamento de maneira *on-line* em sistemas automáticos em fluxo (Pinto et al., 2006; Barreto et al., 2013; Lima et al. 2015).

Os solventes orgânicos mais comumente empregados para diluição dos óleos são o xileno, querosene, metanol, metil isobutil cetona, e o clorofórmio (Pinto et al., 2006; Chaves et al., 2011; Cabrera-Vique et al., 2012). Por exemplo, Cabrera-Vique e coautores (2012), propuseram um novo método analítico que permite a determinação direta de íons Cu(II), Cr(VI), Fe(II), Mn(II) e Ni(II) em azeites virgens e extravirgens por diluição do óleo em metil isobutil cetona e detecção por espectrofotometria de absorção atômica em forno de grafite (EAA-FG).

Recentemente, o nosso grupo de pesquisa desenvolveu um novo método automático para determinação direta de ferro total em matrizes viscosas (óleos comestíveis e biodiesel) (Lima, et al., 2015). Nesse trabalho foi empregado um procedimento de extração em fase única utilizando uma mistura de etanol/clorofórmio (75:25) para disponibilizar o ferro total nas amostras de óleos. O método empregado baseia-se na capacidade de interação do ferro disponível na amostra com as armadilhas superficiais (sítios ativos) dos pontos quânticos de telureto de cádmio (PQs de CdTe), promovendo a extinção da intensidade de fluorescência proporcional a concentração do ferro. Este sistema automático proposto permitiu a obtenção de satisfatórios parâmetros de desempenho analítico e uma elevada frequência de amostragem.

O uso da diluição direta de matrizes oleosas com etanol anidro e álcool isopropílico, também tem sido reportado por outras pesquisas na literatura (Chaves et al., 2011, Shishov et al., 2015).

A extração em fase única compreende uma estratégia de pré-tratamento onde se utiliza um agente extrator ou uma mistura deles, comumente solventes orgânicos como clorofórmio, metanol, etanol anidro, ciclohexano, benzeno, isobutano, acetona. Esse(s) solvente(s) permitem obter a substância de interesse disponível em uma mistura homogênea a qual podem ser adicionadas alíquotas de soluções aquosas, como reagentes cromóforos, sem a sua emulsificação (Lima et al., 2015). Devido à grande variedade de solventes orgânicos extratores descritos na literatura, optou-se por iniciar as investigações experimentais a partir do sistema de extração com solventes alcoólicos (Chaves et al., 2011).

Deste modo, vislumbrando o crescente incentivo analítico para o desenvolvimento de novos métodos automáticos mais sensíveis, versáteis e seletivos, é proposto neste trabalho de pesquisa, a determinação fluorimétrica de cobre (II) em óleos comestíveis usando pontos quânticos de carbono, obtidos a partir do suco de abacaxi, e um sistema fluxo-batelada com extração em fase única.

3

EXPERIMENTAL

3.1. Síntese dos pontos quânticos de carbono

3.1.1. Bioprecursor de carbono

Os pontos quânticos de carbono (PQCs) solúveis em água foram preparados simplesmente por tratamento hidrotérmico, a baixa temperatura, de um bioprecursor. Nesse trabalho, o suco de abacaxi foi escolhido como bioprecursor de carbono devido sua composição e sua fácil disponibilidade na região. Sabe-se que os principais componentes do suco de abacaxi são os carboidratos tais como glucose, sacarose, frutose, e ácido ascórbico (Cárnara et al., 1995).

3.1.2. Equipamento e material

Para o tratamento hidrotérmico do suco de abacaxi foi utilizado um forno tipo mufla (EDG, modelo 7000), disponível no LACOM/UFPB. Foi empregado uma autoclave com o corpo externo em aço inoxidável e uma cápsula interna com tampa em Teflon, com capacidade máxima de 100 mL, para adição do bioprecursor para posterior aquecimento. Para separar o material particulado foi utilizado uma centrífuga compacta da Hermle, modelo Z206A, com velocidade máxima de rotação de 6000 rpm. Um rotavapor (IKA), disponível no LCCQS/UFPB, foi empregado para secagem à vácuo do nanomaterial sintetizado.

Para registro dos espectros de absorção molecular foi empregado um espectrofotômetro UV-Vis da Hewlett-Packard (HP), modelo 8453, equipado com uma cubeta de quartzo com 10 mm de caminho óptico. Um Espectrofluorímetro Horiba, modelo Fluorolog-3 FL-22, foi empregado para obtenção dos espectros de emissão e de excitação das nanopartículas de carbono. Uma cubeta de quartzo para fluorescência com 10 mm de caminho óptico foi empregado nas medições.

A fim de investigar os possíveis grupos funcionais presentes nas nanopartículas de carbono foram registrados espectros de FTIR empregando um espectrofotômetro de FTIR

Shimadzu, modelo IRPrestige-21. Foi empregado um espectrofluorímetro portátil da Ocean Optics, modelo USB4000 para medidas dos espectros de fluorescência no sistema automático. Como fonte de emissão de radiação foi empregado um LED ultravioleta, com emissão máxima em 400 nm.

3.1.3. Procedimento de síntese e purificação

Os pontos quânticos foram sintetizados pelo tratamento hidrotérmico do suco de abacaxi em etanol anidro, semelhante aos procedimentos reportados na literatura por Sahu et al. (2012) e De & Karak (2013).

Inicialmente, 100g de abacaxi foi convertido em suco pela adição de 100 mL de água deionizada. O suco preparado foi filtrado com papel de filtro quantitativo para filtração lenta (tarja azul, JP42 Quanty) a fim de se obter o suco livre da polpa. Em seguida, 50 mL do filtrado foi adicionado a 30 mL de etanol anidro, e transferido para uma autoclave de teflon com volume de 100 mL. Posteriormente, a mistura foi aquecida em um forno tipo mufla a uma temperatura constante durante um período de 4 horas. A fim de encontrar a temperatura adequada para a preparação das nanopartículas, foram empregadas diferentes temperaturas (120°C, 130°C, 140°C e 150°C) na obtenção dos PQCs.

Após o arrefecimento a temperatura ambiente, foi adicionado 50 mL de etanol anidro para a solução obtida de cor castanha escura. Para a remoção de partículas maiores e indesejáveis foi realizado uma filtração seguida de uma centrifugação a 5000 rpm durante 20 minutos. O procedimento de síntese pode ser esquematizado conforme indicado na **Figura 3.1.**

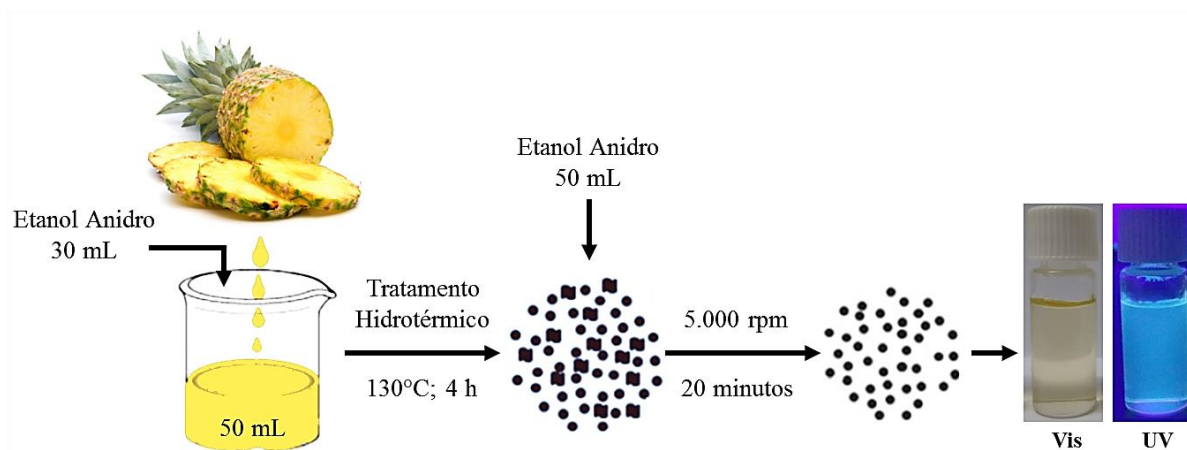


Figura 3.1. Esquema ilustrativo da síntese hidrotérmica de PQC a partir do suco de abacaxi.

Após ser arrefecido até a temperatura ambiente, o produto obtido (amarelo acastanhado) foi dialisado, utilizando um kit de diálise (PURG10015, SIGMA) com tamanho dos poros de 1000 Dalton, em água deionizada sob agitação constante, durante o período de 72 horas, para remoção do material não fluorescente. A água deionizada foi substituída regularmente. A solução resultante foi submetida a uma secagem a vácuo e o sólido obtido foi disperso em etanol anidro com a concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Em seguida, o líquido castanho amarelado purificado foi recolhido e armazenado em frasco âmbar a temperatura de 4°C para posterior utilização nas análises.

3.2. Determinação de cobre em óleos

3.2.1. Reagentes e soluções

Para realização de todo o processo analítico utilizou-se água previamente destilada e deionizada, apresentando condutividade $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ (sistema de deionização Milli-Q *Millipore Corporation*). Todos os reagentes usados foram de grau analítico.

Para o método de referência, uma solução estoque de $0,10 \text{ mg L}^{-1}$ de cobre(II) foi preparado pela diluição de 1,0 mL do padrão de absorção atômica (Fluka) em um balão

volumétrico de 200,0 mL com uma solução de $0,10 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ (ultrapuro, Merck). As soluções de padrão empregadas nos estudos (entre $1,0$ a $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$) foram preparadas a partir da diluição apropriada desta solução.

Para o método proposto, soluções padrão de cobre(II) foram preparadas a partir de diluições apropriadas do padrão organometálico certificado ($0,10 \text{ mg g}^{-1}$) (Quimlab, AS 1080^a NIST Bis (1-fenil-1,3-butanediona) cobre(II)) em óleo mineral (Sigma-Aldrich).

Solução estoque de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de PQCs sintetizados foi preparada dissolvendo-se a massa obtida da nanopartícula em solução de etanol anidro (Sigma-Aldrich).

Álcool isopropílico e clorofórmio (Synth) foram utilizados na preparação da mistura álcool isopropílico /clorofórmio (70:30, v/v) para dissolver as amostras de óleos comestíveis.

Uma solução tampão fosfato salino (PBS) (pH 4,0) com concentração de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, foi preparado com NaCl ($13,76 \text{ mol L}^{-1}$), KCl ($0,27 \text{ mol L}^{-1}$), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ($0,97 \text{ mol L}^{-1}$) e KH_2PO_4 ($0,15 \text{ mol L}^{-1}$).

Soluções estoque de cádmio, ferro, níquel, zinco, cálcio e magnésio, padrões organometálicos certificado ($0,10 \text{ mg g}^{-1}$) (Quimlab), foram preparadas em óleo mineral (Sigma-Aldrich) para o estudo de potenciais interferentes.

3.2.2. Amostras

Para a avaliação do método proposto, oito amostras de óleos comestíveis de diferentes marcas foram analisadas, sendo três do tipo girassol e soja, e dois do tipo canola. Todas as amostras foram adquiridas no mercado local da cidade de João Pessoa, Paraíba, Brasil, dentro do prazo de validade e com lotes distintos.

3.2.3. Instrumentação

Foi empregado um espectrofluorímetro portátil da Ocean Optics, modelo USB4000, para medidas dos espectros de fluorescência de acordo com o método proposto. Para as análises de referência foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite da Shimadzu (modelo AA 6800).

3.2.4. Procedimento de análise

3.2.4.1. Pré-tratamento das amostras oleosas

A extração do analito é uma das principais dificuldades para a determinação de metais em óleos comestíveis, devido principalmente a elevada carga orgânica da matriz (Burguera & Burguera, 2011). Na primeira etapa do procedimento analítico foi investigada as melhores condições para realização de uma eficiente extração em fase única para o cobre. Desta forma, foi utilizado uma mistura dos solventes álcool isopropílico/clorofórmio para extração do analito requerido.

Não obstante, a proporção de álcool isopropílico/clorofórmio foi variada numa faixa de 50:50 a 80:20 (v/v), a fim de selecionar a condição ótima. O critério de escolha da proporção da mistura dos solventes foi baseado na capacidade de homogeneização eficiente com o padrão organometálico de cobre, a fim de proporcionar o sinal adequado para a fluorescência do composto.

Para isso, foram empregadas soluções padrão de cobre organometálico (Quimlab), diluído com óleo mineral (Sigma-Aldrich). Os testes foram realizados adicionando 100 µL da solução padrão de cobre, 600 µL da mistura álcool isopropílico/clorofórmio (em diferentes proporções), 50 µL de PQC's (1,0 mg mL⁻¹) e 50 µL de solução tampão PBS (pH 4,0).

Com os espectros de fluorescência das soluções padrão organometálico foi possível investigar a eficiência da extração. A estratégia empírica consistiu na extração em fase única a

partir de uma mistura dos solventes álcool isopropílico/clorofórmio na proporção ótima verificada de 70:30 (v/v).

Em todos os experimentos, o pH foi mantido em 4,0 de acordo com estudos anteriores que empregam PQCs para a determinação de cobre (Dong et al., 2012; Liu et al., 2014; Gedda et al., 2016). Os espectros de fluorescência foram registrados com excitação em 400 nm.

3.2.4.2. Determinação de cobre por EAA-FG

O procedimento de referência foi realizado como descrito por Lima e colaboradores (2012c), empregando espectrometria de absorção atômica. Esse método consistiu na calcinação eficiente de 10,00 g da amostra com 0,5 g de óxido de magnésio (ultrapuro, Sigma) (material refratário) em uma rampa de aquecimento de 10 horas (1 hora 120°C, 2 horas 180°C, 2 horas 280°C, 2 horas 420°C e 3 horas 550°C) (Lima et al., 2012c). O material calcinado foi diluído com 10,0 mL de HNO₃ 50% (v/v) e completado para um balão de 50,0 mL com HNO₃ 1% (v/v).

As medidas foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (Shimadzu, AA 6800), equipado com um amostrador automático, modelo ASC 6100, uma lâmpada de deutério para correção da radiação de fundo e um tubo de grafite pirolítico de aquecimento longitudinal. Foi utilizada uma lâmpada de cátodo oco de cobre (Hamamatsu Photonics, $\lambda_{\text{máx}}$: 324,8 nm).

O Argônio (99.99%) foi empregado como atmosfera inerte nas etapas de pirolise e atomização, em todas as medidas, sendo estas realizadas em unidades de absorbância integradas. O volume de 20 μ L foi utilizado como volume final de amostragem no forno de grafite.

Para garantir a limpeza dos materiais utilizado durante as medidas (tubo de grafite, pinças, ponteiras, tubos, etc.), foram realizados os seguintes procedimentos: os materiais foram

imersos em solução de detergente por pelo menos 3 horas; Em seguida, foram enxaguados com água corrente, seguida de três lavagens com água deionizada. O material foi então imerso em solução de HNO_3 10% (v/v) por 24 horas. Após o enxágue com água deionizada, o material foi colocado para secar em posição invertida e protegido de partículas suspensas no ar.

3.3. Desenvolvimento do sistema fluxo-batelada

3.3.1. Equipamentos e montagem

Para a montagem do sistema automático proposto foram empregados os equipamentos e componentes relacionados abaixo:

- Uma câmara de mistura;
- Um agitador magnético *labmade*;
- Uma bomba peristáltica;
- Tubos de bombeamento dos fluidos;
- Cinco válvulas solenoides;
- Um acionador de válvulas;
- Uma interface USB 6009 da *National Instruments*[®];
- Um LED ultravioleta, com emissão máxima em 400 nm;
- Um espectrofluorímetro USB 4000 da Ocean Optics;
- Um notebook.

Na **Figura 3.2** é mostrada uma fotografia representativa do sistema automático em fluxo-batelada montado, com as indicações dos seus componentes, especificados e comentados nos tópicos seguintes.

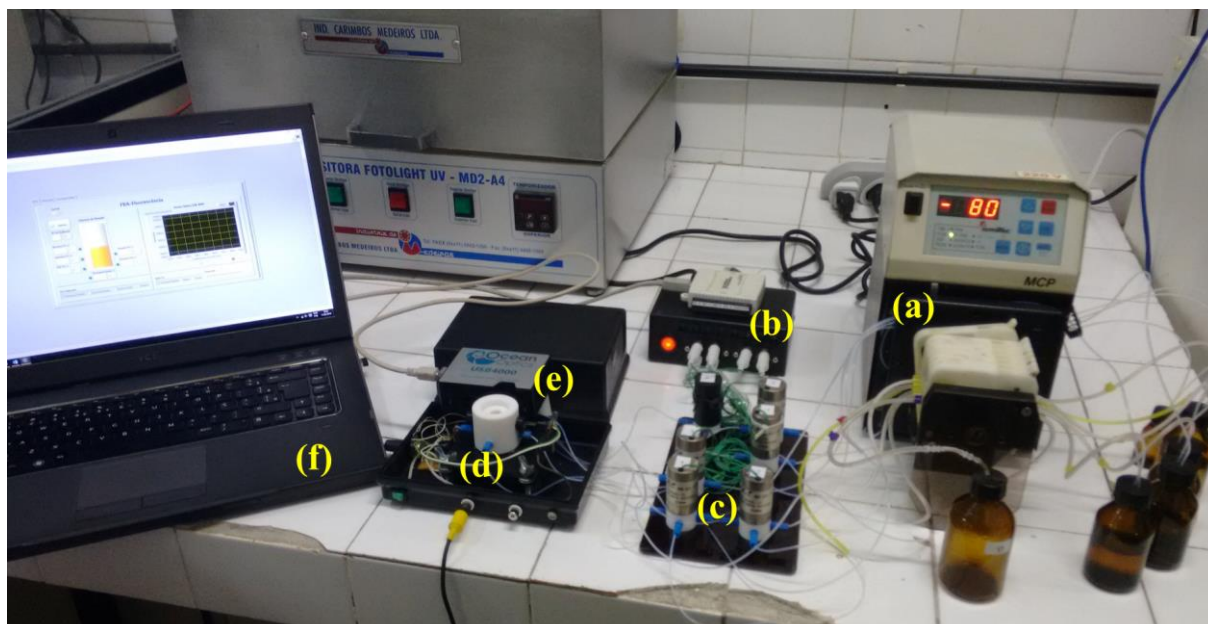


Figura 3.2. Fotografia do sistema automático em fluxo-batelada utilizado. (a) bomba peristáltica, (b) acionador e interface, (c) válvulas solenoides, (d) câmara de mistura, (e) espectrofluorímetro portátil, e (f) computador.

A câmara de mistura (CM) foi confeccionada em politetrafluoretileno, comercialmente conhecido como Teflon[®], contendo três janelas de quartzo, quatro canais de entrada, um canal de saída e um volume interno de aproximadamente 1 mL. As janelas de quartzo foram utilizadas para o posicionamento do espectrofluorímetro portátil e o LED ultravioleta, empregados, respectivamente, para a detecção e excitação da fluorescência durante a análise. No interior da câmara foi alocada uma barra magnética (5 mm) para promover a homogeneização dos fluidos e auxiliar na dispersão das nanopartículas, e sua rotação foi realizada por meio de um agitador magnético, utilizando uma velocidade de rotação alta, sem que influenciasse na repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados.

Uma bomba peristáltica Ismatec[®], (modelo MCP *Standard*) equipada com 8 canais, aliada a cinco válvulas solenoides *three-way* da Cole Parmer[®] (modelo EW-01540-13) e com tubos de bombeamento de Viton[®], Teflon[®] e Tygon[®] foram empregadas para propulsão e direcionamento dos fluidos na CM.

Para controlar o acionamento (abertura/fechamento) das válvulas solenoides e do agitador magnético, foi construído um acionador de válvulas. O acionador é baseado em um circuito integrado ULN2803, fabricado pela Toshiba, que é um arranjo de oito transistores do tipo *Darlington*, apropriados para suportar alta tensão e corrente. O uso desse dispositivo possibilita 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 e sua comunicação com as válvulas solenoides, o agitador magnético e a interface NI USB-6009, da National Instruments®.

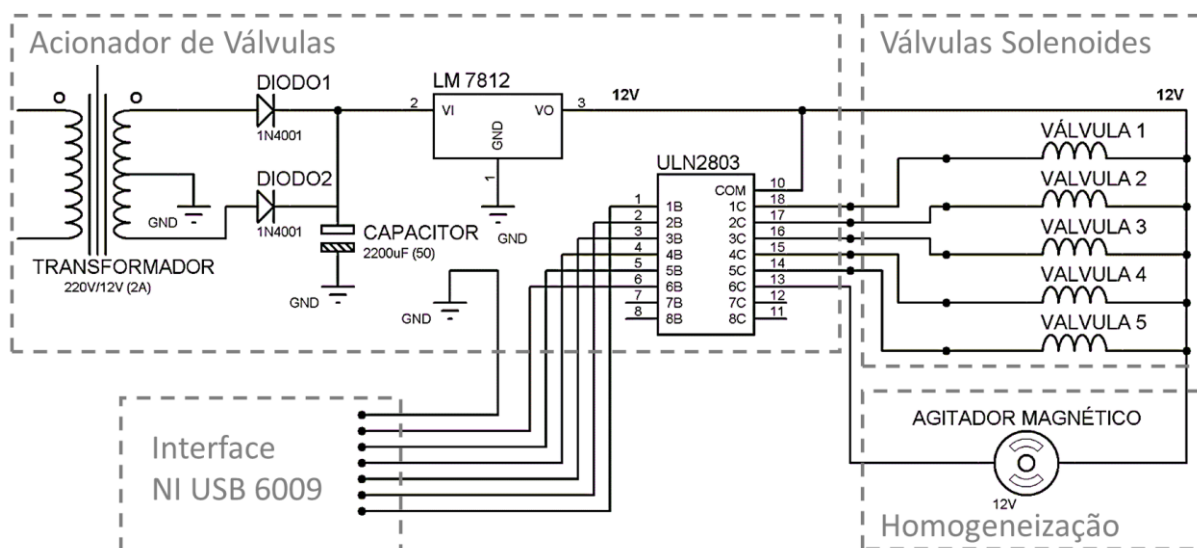


Figura 3.3. Diagrama esquemático da ligação do circuito eletrônico do acionador com as válvulas solenoides, agitador magnético e a interface NI USB-6009.

As válvulas solenoides e o agitador magnético são alimentados com uma tensão de 12V, e seu acionamento é realizado pelo ULN2803, quando recebe uma tensão superior a 3,8V em uma de suas 8 portas de entrada, gerando uma corrente de 150 mA em cada porta de saída, onde estão conectados válvulas e agitador. O comando de acionamento é realizado via notebook, por meio de uma interface de controle NI USB-6009, a qual está conectada às portas de entrada do ULN2803 presente no acionador de válvulas (**Figura 3.3**). Por sua vez, a interface NI USB-6009 está conectada ao notebook por meio de uma porta USB.

Para detecção dos espectros de emissão de fluorescência foi empregado um instrumento espectrofluorímetro portátil da Ocean Optics, modelo USB 4000. O instrumento foi posicionado em frente a uma das janelas da câmara de mistura, como mostra a **Figura 3.4**. Para evitar a interferência da luz do ambiente, a câmara de mistura, o espectrofluorímetro portátil e o LED ultravioleta, foram colocadas dentro de uma caixa (com dimensões $10 \times 12 \times 15$ cm).

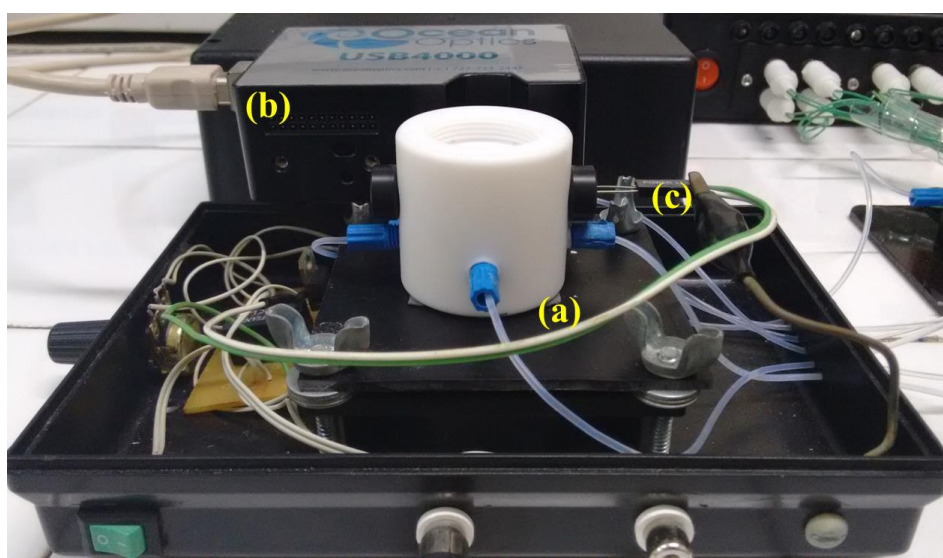


Figura 3.4. Detalhes do sistema fluxo-batelada. (a) câmara de mistura, (b) espectrofluorímetro e (c) LED ultravioleta.

Um LED ultravioleta (modelo YSL-R547P4C-E3) foi empregado como fonte de excitação durante as medidas de fluorescência. O LED foi posicionado em uma das janelas da CM, de modo a se obter um ângulo de 90° com o sistema de detecção da emissão de fluorescência. A **Figura 3.5** mostra o espectro de emissão do LED, registrado com o espectrofluorímetro portátil, com intensidade máxima de emissão em 400 nm.

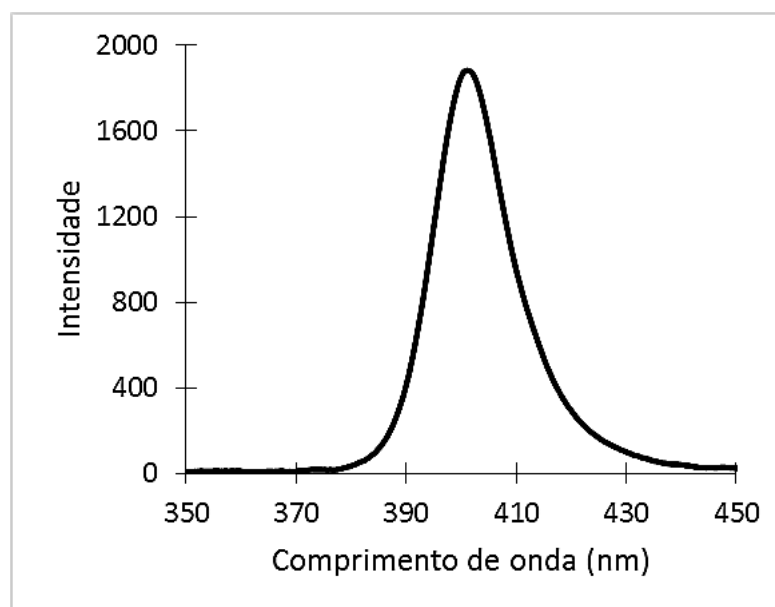


Figura 3.5. Espectro de emissão do LED ultravioleta.

3.3.2. Desenvolvimento do *software* de controle

Para controle e gerenciamento do sistema automático proposto foi desenvolvido um programa escrito em linguagem de programação gráfica, empregando o *software* LabVIEW 2013. A interface do programa de controle (**Figura 3.6**) é simples e encontra-se dividida conforme os procedimentos a ela atribuída.

O programa desenvolvido permite o usuário controlar as inúmeras etapas da análise, tais como: tempo de abertura das válvulas da amostra, solventes, tampão, nanopartículas, e descarte, bem como registrar, plotar e armazenar dos espectros de fluorescência para posterior análise. Os acionamentos são configurados em suas respectivas caixas de controle digital e são dependentes do tempo, que deve ser inserido em segundos pelo usuário. Dessa forma, o analista pode implementar procedimentos analíticos, como a curva analítica, bastando apenas configurar os parâmetros de tempo de abertura das válvulas de acordo com o procedimento desejado.

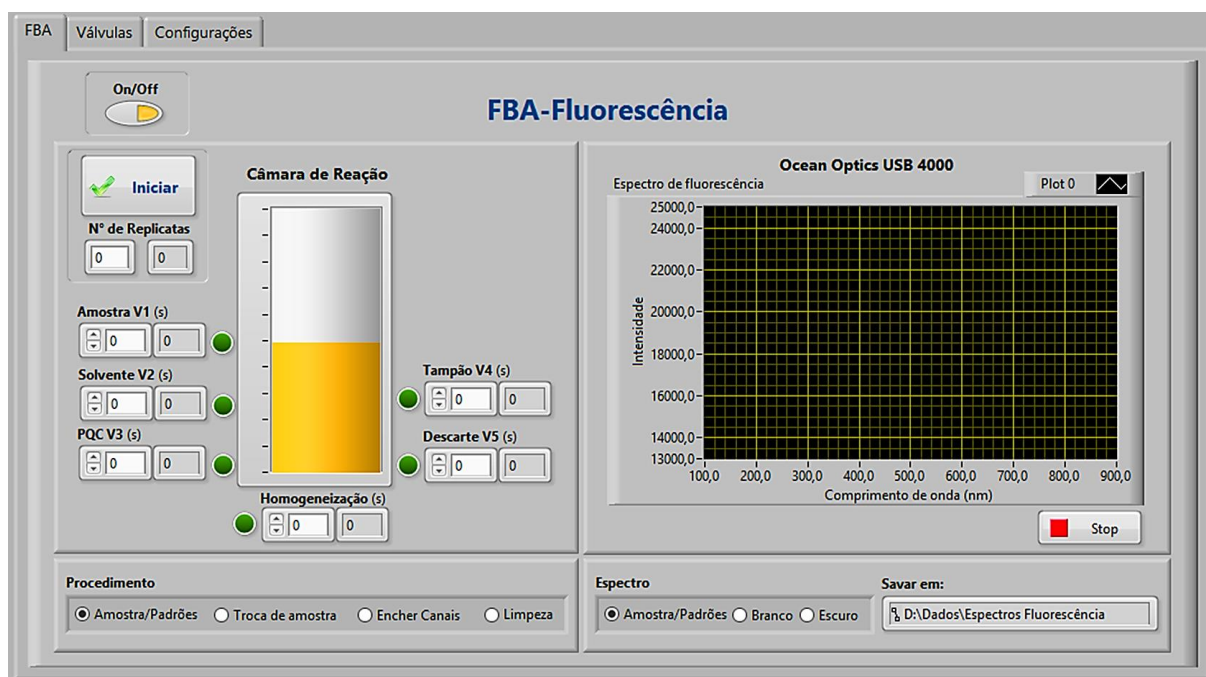


Figura 3.6. Interface do programa de controle do sistema automático fluxo-batelada proposto.

O programa desenvolvido foi dividido em três abas apresentadas no painel frontal. Na aba FBA, o usuário estabelece os parâmetros de análise do sistema FBA-Fluorescência. Antes da análise, o usuário deve selecionar o tipo de análise, clicando nas opções disponíveis nas caixas de controle “Procedimento” e “Espectro”.

Na caixa “Procedimento” o usuário poderá optar entre realizar a análise de “Amostra/Padrões”, “Troca de amostra”, “Encher canais” e “Limpeza”. Para a seleção das medidas, o usuário pode optar pelo registro dos espectros da “Amostra/Padrão”, “Branco” ou “Escuro”.

Para executar o procedimento de limpeza da câmara de mistura, o operador deve especificar o tempo de acionamento da válvula V2, empregada na adição da mistura dos solventes, e o número de ciclos de limpeza (“N° de Replicatas”) em suas respectivas caixas de controle, selecionando a opção “Limpeza” como procedimento desejado, e logo em seguida acionar o botão “Iniciar”.

Ainda na primeira aba, o programa também permite o controle do espectrofluorímetro portátil, exibindo e salvando os espectros de fluorescência obtidos durante as análises. Para isso é necessário o usuário apenas selecionar o tipo de medida e o local de armazenamento dos arquivos criados na extensão “.txt”.

Na aba “Configurações” da interface do programa, também é possível controlar os parâmetros de comunicação e controle dos dispositivos utilizados no sistema em fluxo-batelada, tais como da interface NI USB 6009, da bomba peristáltica e do espectrofluorímetro portátil (**Figura 3.7**). São inseridos dados como velocidade de rotação da bomba peristáltica, endereçamento das portas de comando das válvulas, e parâmetros operacionais do espectrofluorímetro portátil.

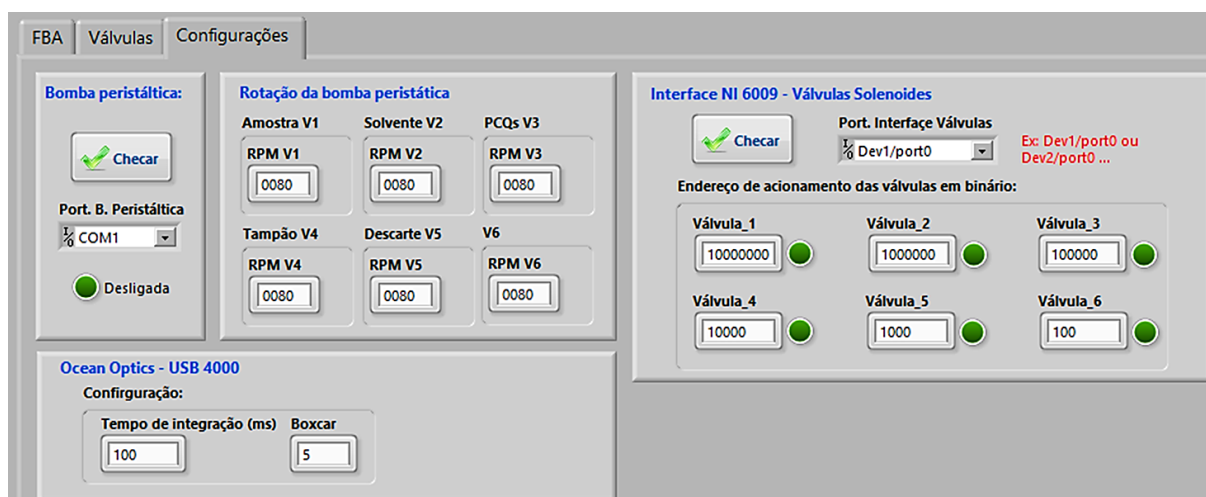


Figura 3.7. Interface do programa para gerenciar as configurações de comunicação com a interface, bomba peristáltica e espectrofluorímetro portátil.

3.3.3. Precisão das válvulas solenoides

Como todos os volumes adicionados ou aspirados da câmara de mistura são proporcionais ao tempo de acionamento das válvulas solenoides, assim, faz-se necessário encontrar a relação de tempo de acionamento com o volume adicionado ou aspirado envolvido no processo, logo, é necessário determinar a vazão em cada linha de fluxo, para depois definir os tempos de acionamento utilizado durante os procedimentos.

A vazão em cada linha de fluxo foi determinada coletando, em intervalos de tempos predefinidos, alíquotas de água ou de amostras, e medindo, concomitantemente, a massa numa balança analítica (*Scientech* modelo AS210). Depois, partindo-se do valor da densidade das soluções empregadas, foram estimados os volumes das alíquotas, e por sua vez, a vazão em cada linha de fluxo do sistema, a partir do quociente dos volumes pelos tempos predefinidos.

O programa de gerenciamento do sistema automático desenvolvido apresenta uma interface de comando na aba “Válvulas” (**Figura 3.8**) que possibilita que o procedimento de determinação da vazão, seja realizado com maior facilidade. Nessa interface é possível configurar o tempo de abertura e fechamento das passagens individuais de cada válvula.

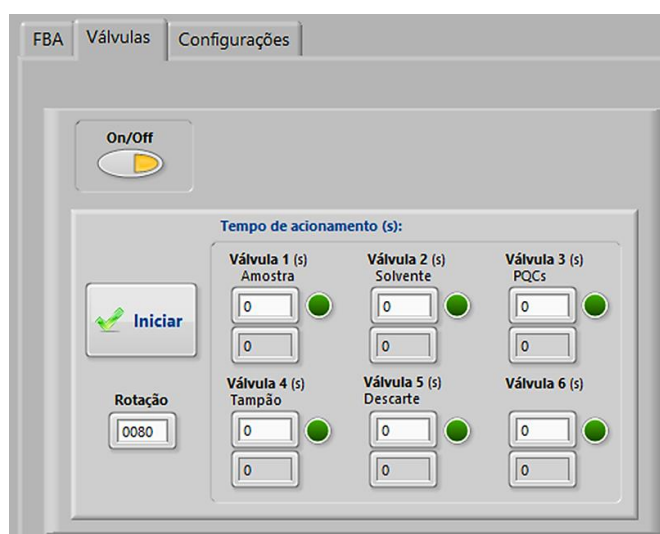


Figura 3.8. Interface do programa para gerenciar o estudo da vazões individuais em cada linha de fluxo.

3.4. Procedimento automático de análise

A **Figura 3.9** representa o diagrama esquemático do sistema proposto empregado para realizar as etapas analíticas anteriores à determinação. O arranjo físico do sistema fluxo-batelada permaneceu inalterada durante todos os procedimentos analíticos empregados na determinação de cobre(II).

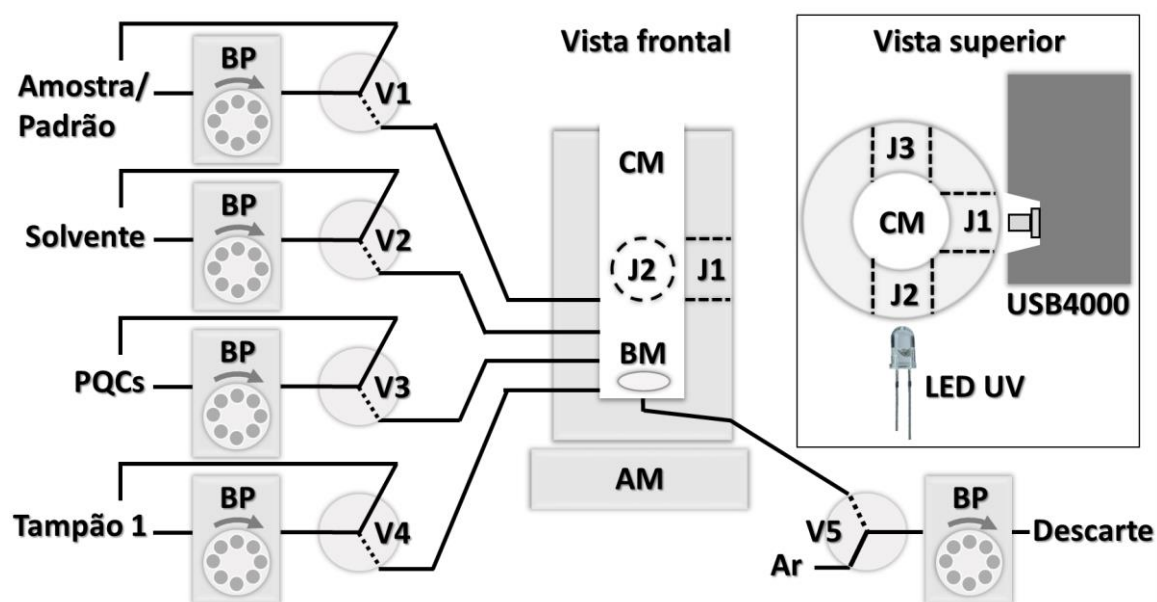


Figura 3.9. Diagrama esquemático do sistema automático em fluxo-batelada proposto. BP: bomba peristáltica, V: válvulas solenoides, CM: câmara de mistura, J: Janelas de quartzo; AM: agitador magnético, BM: barra magnética.

Na aba “FBA” do programa de controle, o usuário poderá dar início a análise clicando no botão “Iniciar”. No entanto, antes de iniciar qualquer procedimento analítico, faz-se necessário a etapa de preenchimento dos canais. Para isso, as válvulas da amostra ou soluções padrão de cobre(II) (V1), mistura dos solventes (V2), PQCs ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) (V3) e tampão PBS (pH 4,0) (V4) são simultaneamente acionadas durante um intervalo de 10 s e as respectivas soluções de trabalho são bombeadas em direção à câmara de mistura (CM), preenchendo todos os canais localizados entre as válvulas e a câmara de mistura. Em seguida, a válvula do descarte (V5) é acionada durante 15 s, e a CM é esvaziada por aspiração, empregando a bomba peristáltica. Esse procedimento de enchimento de canais é importante e deve ser realizado sempre que houver alteração do conteúdo do reservatório do reagente e amostra, como por exemplo, durante a etapa de troca de amostra e padrões.

As soluções padrão ou amostra, solvente orgânico, PQCs e o tampão, são adicionadas na CM por acionamento das válvulas V1 a V4, respectivamente. O procedimento de limpeza da CM é realizado pelo acionamento da válvula (V2), adicionando o solvente. Em seguida, a

válvula de descarte (V5) é acionada removendo o conteúdo da CM. Este procedimento de limpeza e descarte deve ser feito duas vezes para permitir uma limpeza adequada da câmara de mistura.

Na **Tabela 3.1** estão resumidas as etapas do procedimento automático para análise da amostra/padrões com os respectivos tempos de acionamento das válvulas solenoides.

Tabela 3.1. Procedimento automático para análise da amostra oleosa com pré-tratamento para extração de cobre *on-line*.

Etapa	Evento	Tempo (s)	Volume (μL)
1	Adição da amostra (V1)	3,1	100
2	Adição da mistura dos solventes (V2)	3,8	600
3	Homogeneização	5,0	-
4	Adição da solução dos PQC's (V3)	1,1	50
6	Adição da solução tampão (V4)	1,0	50
7	Homogeneização	5,0	-
9	Aquisição dos espectros de emissão de fluorescência	5,0	-
10	Descarte (V5)	5,0	800
11	Adição da mistura dos solventes (V2) para a limpeza / Homogeneização	9,0	800
12	Descarte (V5)	5,0	800
13	Adição da mistura dos solventes (V2) para a limpeza / Homogeneização	9,0	800
14	Descarte (V5)	5,0	800

Para a preparação da solução do branco na CM, as válvulas V2 a V4 são acionadas sequencialmente, adicionando os volumes de 700 μL da mistura dos solvente orgânicos, 50 μL de PQC's e 50 μL para a solução tampão, respectivamente. O espectro de emissão de fluorescência é então capturado utilizando o espectrofluorímetro portátil como detector.

3.5. Avaliação do desempenho analítico

O desenvolvimento de um método analítico, a sua adaptação ou aplicação envolve parâmetros de avaliação para atestar que o procedimento requerido apresenta desempenho analítico estatisticamente adequado. Os parâmetros de validação empregados neste trabalho são brevemente expostos a seguir e foram norteados pelas normas de validação para metodologias analíticas (Thompson et al., 2002).

3.5.1. Linearidade

A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados em um intervalo especificado, geralmente através do método dos mínimos quadrados (Holler et al., 2009). Esse parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico, que deve ser estatisticamente próximo de 1, observando-se que a inclinação da reta seja diferente de zero.

3.5.1.1. Análise de variância

É importante mencionar que a curva analítica, somente pode ser usada para estimar a concentração do analito, se for capaz de descrever o comportamento dos valores experimentais de maneira satisfatória. Portanto, o modelo obtido não pode apresentar evidências de falta de ajuste e deve refletir uma regressão estatística significativa. Dessa forma, a validação do modelo de calibração geralmente é realizada por meio de uma análise de variância (ANOVA) (Neto et al., 2010). A **Tabela 3.2** mostra as equações para ANOVA do modelo ajustado aos dados experimentais empregando-se o método dos mínimos quadrados (MMQ).

Tabela 3.2. Equações para ANOVA aplicada a um modelo obtido pelo método dos mínimos quadrados.

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

Onde: p é o número de parâmetros usados no modelo; n é o número total de observações; m é o número de níveis distintos da variável independente.

A validação de modelos lineares pela aplicação do método dos mínimos quadrados consiste de análise dos resíduos, teste de significância da regressão e teste de falta de ajuste. Na análise do gráfico dos resíduos verificamos o comportamento dos erros de previsão do modelo (resíduos) em relação aos dados experimentais. No gráfico de resíduos é possível identificar o tipo de erro experimental associado aos dados experimentais. Caso os resíduos apresentem algum perfil ou estrutura teremos um erro sistemático associado aos dados experimentais. Caso os resíduos se distribuam aleatoriamente em torno de zero teremos apenas erros aleatórios associados aos dados experimentais.

O teste de falta de ajuste compara, para os vários níveis da variável x, a média quadrática da falta de ajuste (MQ_{faj}) com a média quadrática devida ao erro puro (MQ_{ep}). Assim, se a razão $(MQ_{faj})/(MQ_{ep})$ for menor que o valor do ponto de distribuição F, referentes aos graus de liberdade de MQ_{faj} e MQ_{ep} e para um nível de 95% de confiança, temos um modelo sem falta de ajuste. Neste caso, as duas médias quadráticas refletirão apenas os erros aleatórios associados

aos desvios em relação à média. Caso contrário, o modelo apresenta falta de ajuste e necessita ser reestimado e revalidado.

No teste de significância da regressão, compara-se a razão entre a média quadrática devido à regressão (MQ_{reg}) e a média quadrática residual (MQ_r) com o valor do ponto da distribuição F referente aos graus de liberdade de MQ_{reg} e MQ_r a um certo nível de confiança estatística de interesse. Em geral, emprega-se um nível de 95% de confiança. Se 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 (linear, quadrática, polinomial, etc.) entre as variáveis que possa ser descrita pelo modelo.

3.5.2. Limite de detecção e quantificação

A menor concentração da espécie de interesse que pode ser detectada por um dado método analítico, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas, pode ser entendida como o limite de detecção (LOD) (Holler et al., 2009). Comumente define-se o LOD em termos do desvio-padrão de medidas do branco.

O limite de detecção pode ser determinado como segue:

$$LOD = \frac{3 \cdot s}{S} \quad (1)$$

onde s é o desvio-padrão da resposta; S é o coeficiente angular da curva analítica (sensibilidade do método).

O limite de quantificação (LOQ) é definido como a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas (Holler et al., 2009). O LOQ pode ser determinado fazendo-se uso da expressão a seguir:

$$LOQ = \frac{10 \cdot s}{S} \quad (2)$$

na qual: s é o desvio-padrão da resposta; S é o coeficiente angular do gráfico de calibração (sensibilidade do método).

3.5.3. Sensibilidade

Sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta analítica em função da concentração do analito e é determinada como mostrado na expressão a seguir:

$$S = \frac{dx}{dc} \quad (3)$$

onde dx e dc representa um infinitésimo da variação do sinal analítico e da concentração, respectivamente

Em outras palavras, a sensibilidade é a capacidade de um método distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas (Holler et al., 2009). Sob o ponto de vista prático, pode ser expressa pela inclinação da curva de regressão linear de calibração e é determinada simultaneamente aos testes de linearidade. A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada.

Em métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido. Esse critério expressa a capacidade do procedimento analítico gerar variação no valor da propriedade monitorada ou medida, causada por pequeno incremento na concentração ou quantidade do analito.

3.5.4. Seletividade

O termo seletividade, que muitas vezes é utilizado como sinônimo de especificidade, indica a capacidade do método em produzir resposta para vários analitos, apesar de distinguir

o sinal de um analito frente aos outros. Já a especificidade é utilizada para expressar a capacidade do método em determinar somente o analito de interesse, mesmo na presença de outros componentes da matriz (substâncias ativas, excipientes, impurezas ou contaminantes) (Holler et al., 2009).

Sendo assim, a seletividade e a especificidade dão um indicativo do quanto a resposta está livre de interferência de outras espécies contidas na matriz da amostra. Para análise quantitativa, a especificidade/seletividade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o teste não é afetado por estes materiais. Quando a impureza ou padrão do produto não estiverem disponíveis, pode-se comparar os resultados dos testes das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado, como o método de referência.

3.5.5. Exatidão

A exatidão é definida como a concordância entre um resultado analítico e o valor convencionalmente aceito como verdadeiro. Com o objetivo de avaliar a exatidão de um método analítico o teste de recuperação é o procedimento mais realizado e simples de ser empregado. No ensaio de recuperação, quantidades conhecidas do analito são adicionadas nas amostras para respectiva quantificação. Deve-se ressaltar que essas adições são realizadas em concentrações adequadas e semelhante às obtidas para execução do ensaio.

A taxa de recuperação é calculada empregando a expressão a seguir:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (4)$$

onde: C_1 = concentração da substância de referência mais a concentração da amostra.

C_2 = concentração da amostra. C_3 = concentração da substância de referência adicionada.

3.5.6. Precisão

Precisão é a concordância entre os vários valores experimentais obtidos para repetidas análises de uma mesma amostra. Quanto menor for a amplitude dessas medidas, ou seja, quanto mais próximos entre si estiverem, maior será a precisão.

A precisão de um método analítico é normalmente expressa como a estimativa do desvio padrão ou do desvio padrão relativo (DPR%) de uma série de medidas e deve incluir os estudos da média, do desvio padrão, desvio padrão relativo e intervalo de confiança. O DPR% é dado pela seguinte equação:

$$DPR \% = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (5)$$

onde: DPR% corresponde ao Desvio padrão relativo, DP ao desvio padrão, CMD concentração média determinada.

3.5.7. Teste *t* pareado

A implementação do teste *t* pareado, baseado no conceito de intervalo de confiança, requer o cálculo da média das diferenças entre os valores de concentração, obtidos por dois métodos distintos, para cada par de resultados. Admitindo-se que Δ é a diferença média verdadeira entre os resultados dos dois métodos, o intervalo de confiança para Δ é encontrado pela aplicação seguinte equação.

$$\Delta = \bar{d} \pm t_v \frac{s_d}{\sqrt{n}} \quad (6)$$

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).

Podemos interpretar o intervalo de confiança da seguinte maneira:

Se o valor “zero” estiver contido dentro do intervalo construído, não existe diferença sistemática estatisticamente significativa entre os resultados dos dois métodos. Neste caso, a hipótese nula não pode ser rejeitada e a média das diferenças (d) deve ser um ponto da distribuição t com $\Delta = 0$. Caso contrário, existe uma diferença sistemática significativa entre os resultados dos métodos ao nível adotado de confiança estatística.

4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese e caracterização dos pontos quânticos de carbono

4.1.1. Mecanismo de síntese

Os pontos quânticos de carbono foram sintetizados por meio do tratamento hidrotérmico, a baixa temperatura (120 a 150°C), do suco de abacaxi como precursor de carbono, que contém carboidratos, tais como: glucose, sacarose e ácido ascórbico (Cárnara et al., 1995).

Devido à presença desses constituintes, o mecanismo de síntese para a formação hidrotérmica dos PQCs a partir do abacaxi, é provavelmente semelhante dos carboidratos. Assim, o processo de formação dos PQCs pode envolver etapas de desidratação, polimerização e carbonização desses carboidratos (Sahu et al., 2012; De & Karak, 2013; Huang et al., 2014). Entretanto, não tem sido relatado um mecanismo claro de formação e estrutura desse nanomaterial. Isso pode ser atribuído à formação de um grande número de intermediários durante a reação hidrotérmica (Barati et al., 2015).

4.1.2. Influência da temperatura

Para investigar a influência da temperatura no processo do tratamento hidrotérmico do suco de abacaxi, foi mantido constante o tempo de síntese em 4 horas e utilizado diferentes temperaturas (120 a 150°C) de aquecimento do suco de abacaxi.

Após as etapas de síntese, como podemos observar na **Figura 4.1**, todas as soluções resultantes apresentaram coloração amarelo castanho, e quando expostas a radiação ultravioleta (comprimento de onda de 380 nm) apresentaram emissão de fluorescência, características típicas da formação das nanopartículas de carbono (Mehta et al., 2014).

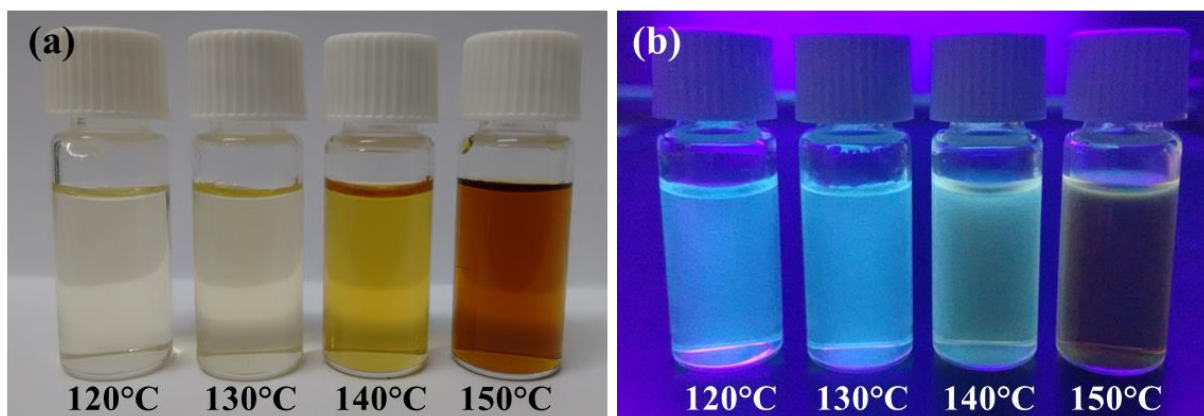


Figura 4.1. Imagens dos PQCs, sintetizados em diferentes temperaturas (120, 130, 140, 150°C), sob a (a) luz visível e sob a (b) ultravioleta (380 nm).

Nas imagens, podemos observar que os PQCs obtidos com as temperaturas de 120 130°C apresentaram uma forte emissão de FL na região do azul, enquanto o obtido empregando a temperatura de 140°C apresentou uma forte emissão de fluorescência na região do verde.

A **Figura 4.2** mostra os espectros de absorção molecular dos PQCs nas diferentes temperaturas (120, 130, 140 e 150°C), utilizando como solvente o etanol anidro. Pode ser observado que há um máximo de absorção na região UV, próximo de 290 nm, e um prolongamento de banda que se estende para a região visível. O pico de absorção próximo de 290 nm, pode ser atribuído as transições $n-\pi^*$ e $\pi-\pi^*$ provenientes das ligações C=O e C=C (Hsu et al., 2012, Liu et al., 2012; Xu et al., 2015). O aumento da intensidade de absorção nos espectros, pode ser atribuído a maior carbonização dos PQCs, como uma consequência da elevação da temperatura de síntese (Liu et al., 2012; Purbia & Paria, 2016).

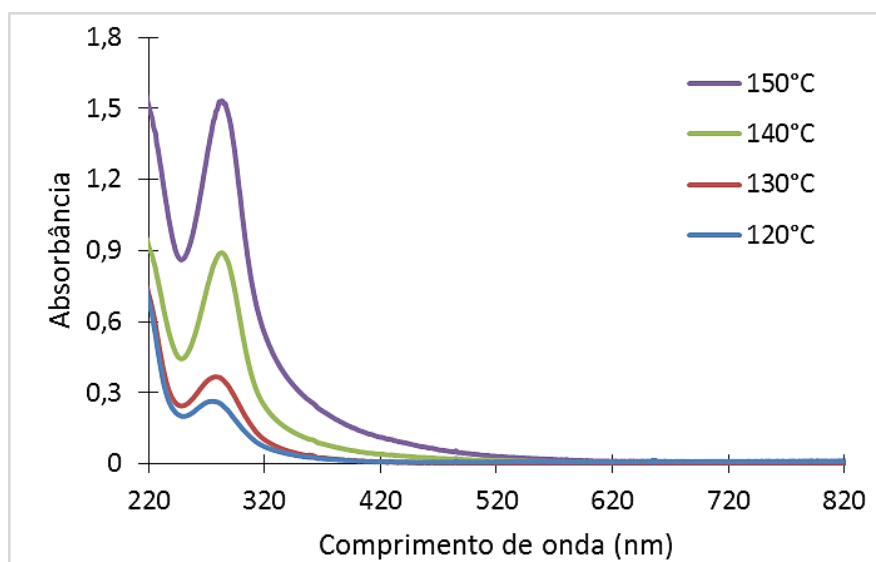


Figura 4.2. Espectros de absorção molecular Uv-Vis dos PQC's em diferentes temperaturas.

Os espectros de emissão de fluorescência dos PQC's, obtidos em diferentes temperaturas, foram investigados utilizando o comprimento de onda de excitação em 400 nm. Esse procedimento foi adotado devido ao LED utilizado, com emissão máxima em 400 nm, que foi empregado como fonte de excitação para o método proposto.

A **Figura 4.3** exibe os espectros de emissão de FL dos PQC's, obtidos com o comprimento de onda de excitação em 400 nm. Podemos observar que os PQC's obtidos utilizando a temperatura de 140°C de aquecimento, apresenta uma forte emissão de FL na região de 490 nm, quando comparado com os obtidos nas demais temperaturas. Assim, os PQC's obtidos a partir da síntese com a temperatura de 140°C de aquecimento, foram empregados na determinação de cobre(II) em óleos, por exibirem uma forte emissão de fluorescência quando excitados com o comprimento de onda máximo de 400 nm, o mesmo comprimento de onda de emissão do LED.

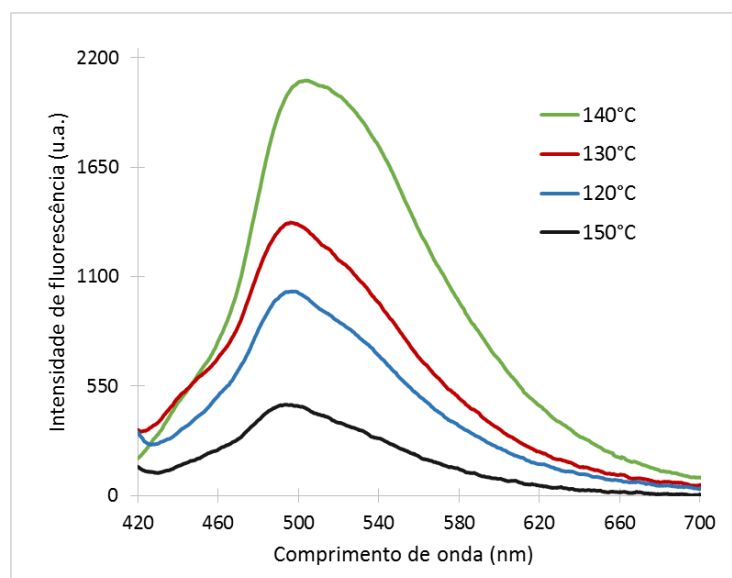


Figura 4.3. Espectros de emissão de fluorescência dos PQC's ($\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$) obtidos com diferentes temperaturas.

4.1.3. Influência do pH

A influência do pH na propriedade de fluorescência dos PQC's, obtidos com a temperatura de 140°C de aquecimento, foi estudada com comprimento de onda de excitação em 400 nm . O efeito do pH foi avaliado entre $4,0$ e $9,0$ e a influência sobre a intensidade de fluorescência dos PQC's é apresentada na **Figura 4.4 (a)**.

De acordo com a **Figura 4.4 (b)**, não foi verificada variação significativa da fluorescência dos PQC's com a mudança de pH, exceto para o pH $4,0$ que apresentou um aumento acentuado de fluorescência. Além disso, o pico de emissão máximo, em 490 nm , não apresentou deslocamento do máximo de banda com a variação do pH.

A determinação de cobre(II) em óleos empregando os PQC's, foi realizada em pH $4,0$, normalmente utilizado na determinação fluorescente de cobre empregando PQC's (Dong et al., 2012; Liu et al., 2014; Gedda et al., 2016).

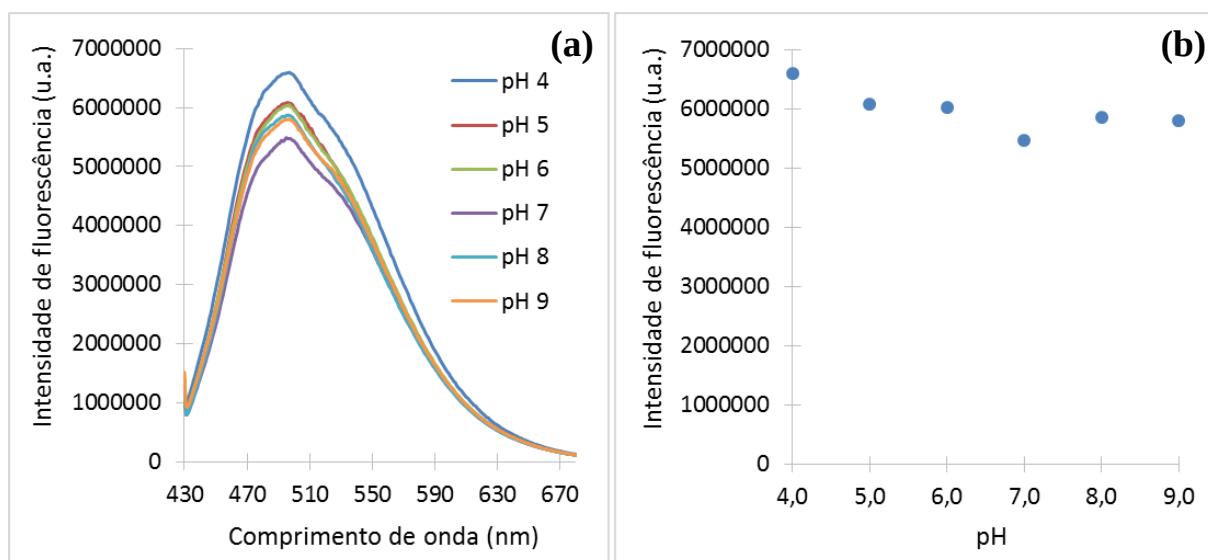


Figura 4.4. (a) Influência do pH nos espectros de emissão de fluorescência dos PQCs. (b) Variação da intensidade de fluorescência com a mudança do pH.

4.1.4. Caracterização espectroscópica dos PQCs

Para avaliar as propriedades ópticas dos PQCs, foi realizado um estudo da emissão de fluorescência dos PQCs utilizando diferentes comprimentos de onda de excitação. Conforme apresentado na **Figura 4.5** podemos visualizar os espectros de emissão de fluorescência dos PQCs com diferentes comprimentos de onda de excitação (340 a 470nm).

Os espectros de emissão dos PQCs, obtidos à temperatura de 140°C, apresentaram um deslocamento da banda de fluorescência para a região do vermelho, a partir de 490 nm a 560 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 PQCs foi obtida em 490 nm quando excitados em 400 nm, combinando com o comprimento de onda de emissão máximo do LED ultravioleta, eleito como a fonte de excitação dos PQCs.

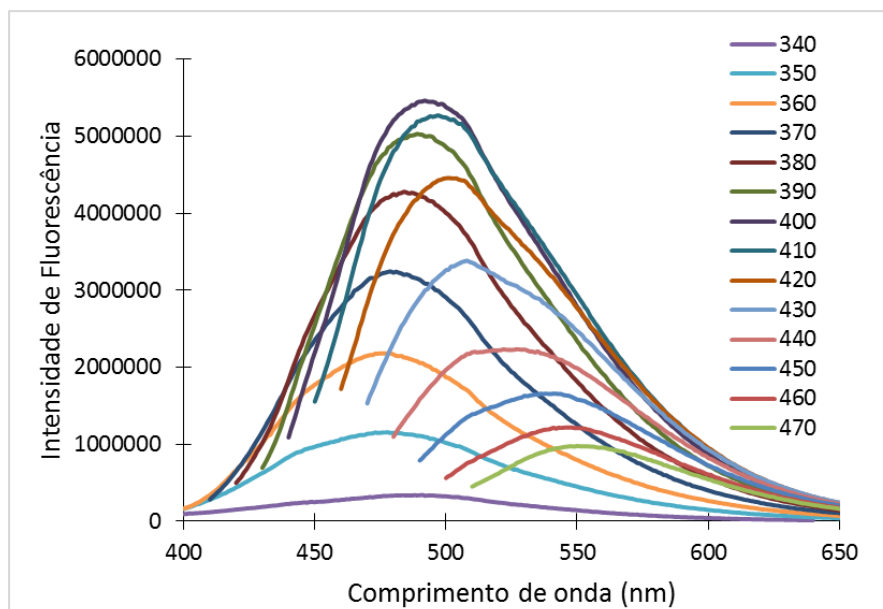


Figura 4.5. Espectros de emissão dos PQC's obtidos à temperatura de 140°C, excitados em diferentes comprimentos de onda (340 a 470 nm).

Na **Figura 4.6** são apresentados os espectros de excitação e de emissão de fluorescência dos PQC's obtidos a partir da temperatura de 140°C. Como pode ser observado, os PQC's apresentaram um pico de excitação bem definido em 400 nm, e um pico de emissão máxima em 490 nm.

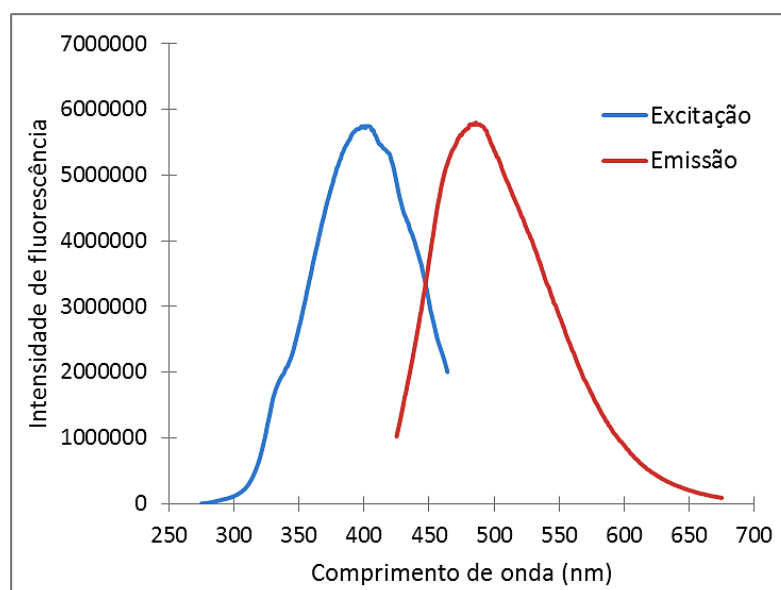


Figura 4.6. Espectros de excitação e de emissão dos PQC's obtidos à temperatura de 140°C.

4.1.5. Caracterização estrutural dos PQC's

A origem da fluorescência dos PQC's pode ser atribuída à presença de armadilhas emissivas presentes na superfície dessas nanopartículas (Ding et al., 2016), como discutido anteriormente (Seção 2.2.3.1). Desta maneira, a presença de grupos funcionais na superfície dos PQC's pode ser investigada empregando a espectroscopia infravermelho com transformada de fourier (do inglês: *fourier transform infrared*, FTIR).

Como mostrado na **Figura 4.7**, o espectro FTIR do PQC's obtido com a temperatura de síntese de 140°C, indicou a presença de vários grupos funcionais tais como O-H, N-H, C-H, C-N, C=C, C-O-C, na sua superfície. A presença desses grupos funcionais pode resultar em uma série de armadilhas emissivas, as quais podem ser as responsáveis pela origem da fluorescência dos PQC's (Sahu et al., 2012; Wei et al., 2014).

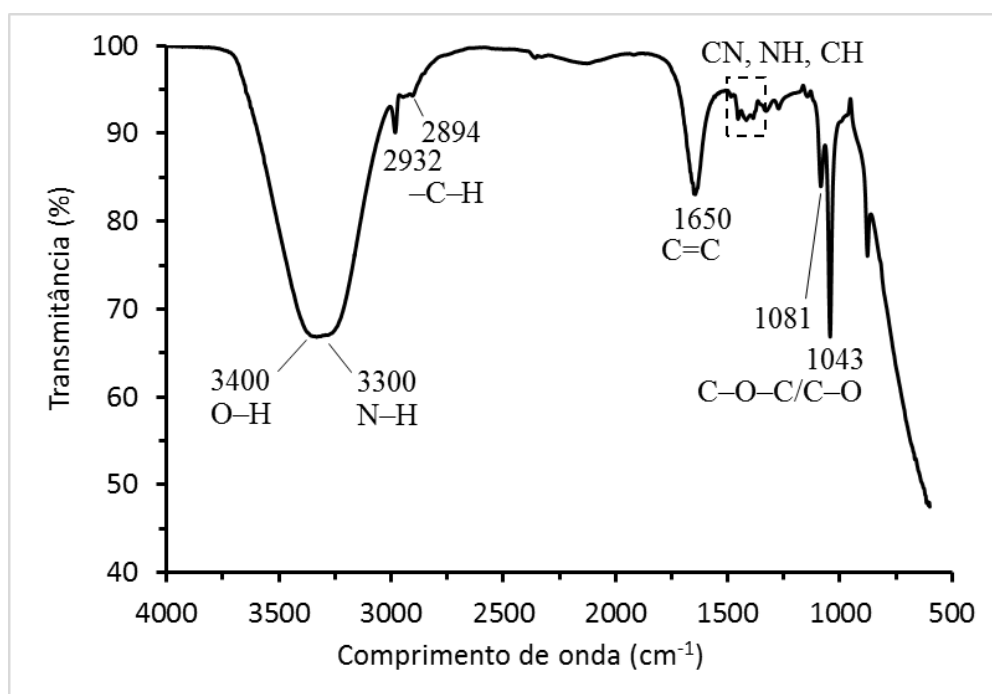


Figura 4.7. Espectro FTIR dos PQC's obtidos com temperatura de síntese de 140°C.

Esses grupos funcionais são comuns na maioria dos PQC's obtidos a partir de bioprecusores de carbono (Xu et al., 2015). A existência desses grupos funcionais confere aos

PQCs uma excelente solubilidade em água sem a necessidade de qualquer tipo de modificação química.

4.2. Determinação do rendimento quântico dos PQCs

O rendimento quântico dos PQCs foi calculado conforme bem documentado pela literatura (Qian et al., 2015; Xu et al., 2015). O padrão de rodamina 6G (Sigma-Aldrich), rendimento quântico de 95%, em meio alcoólico foi empregado como referência. O cálculo do rendimento quântico de fluorescência pode ser obtido através da seguinte equação:

$$\Phi_A = \Phi_P \times \frac{Grad_A \times \eta_A^2}{Grad_P \times \eta_P^2} \quad (7)$$

onde: Φ corresponde ao rendimento quântico, $Grad$ correspondem à área da curva de emissão de fluorescência obtida no mesmo comprimento de onda de excitação e η corresponde ao índice de refração do solvente utilizado. Os subscritos “A” e “P” referem-se a amostra e o padrão, respectivamente. O índice de refração só é de uso significativo quando as soluções estiverem em solventes diferentes.

Os PQCs obtidos por meio tratamento hidrotérmico do suco de abacaxi, apresentaram rendimentos quânticos variando entre 6,27%, 8,76%, 9,32% e 4,45%, quando comparados com o padrão de referência de rodamina 6G, medidos a um comprimento de onda de excitação de 360 nm. Os valores são comparáveis com os reportados anteriormente na literatura, utilizando bioprecusores de carbono (Liu et al., 2012; Mehta et al., 2014; Purbia & Paria, 2016).

4.3. Estudo de potenciais interferentes

Visto o exposto nas seções anteriores, quanto ao método analítico proposto, foi realizado um estudo para potenciais interferentes que pudessem favorecer ou suprimir a

emissão de fluorescência do sistema PQC/Cu(II) proposto para análise das amostras (Lima et al., 2015). Os estudos foram realizados em tampão PBS (pH 4,0), para os íons Cd(II), Fe(III), Ni(II), Zn(II), Ca(II) e Mg(II), metais comumente presentes em concentrações similares as do analito (faixa de concentração entre 5,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) nas amostras. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 4.8**.

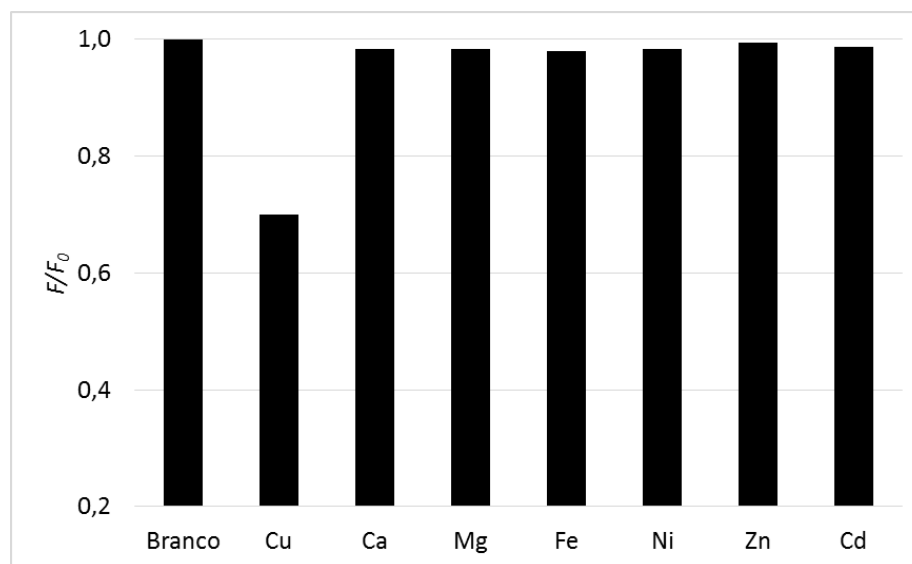


Figura 4.8. Emissão de fluorescência dos PQC ($\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$) na presença de diferentes íons metálicos divalentes. Dados referentes a concentração de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cada íon metálico. Onde F e F_0 são as intensidades de fluorescência na ausência e presença do íon metálico, respectivamente.

Como claramente pode ser observado, apenas a presença do íon Cu(II) resulta na extinção significativa da fluorescência dos PQC em pH 4,0. Os valores das análises dos potenciais íons interferentes não demonstraram alteração significativa superiores a 5% em relação a medida analítica obtida em sua ausência (apenas solução de Cu(II) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$). Esse fato pode ser considerado um indicativo da seletividade dos PQC pelos íons Cu(II) nessas condições experimentais.

4.4. Estudo de pré-tratamento das amostras

As amostras foram pré-tratadas conforme a necessidade de uma extração rápida, simples e eficiente para a disponibilização dos íons cobre(II) em meio homogêneo alcoólico (fase única) a partir das matrizes oleosas. As investigações foram direcionadas no sentido de se obter uma extração on-line eficiente para o íon em estudo, como vem sendo trabalhado pelo nosso grupo de pesquisa (Barreto et al., 2013; Lima et al., 2012a; Lima et al., 2015) e também abordado em outros trabalhos que envolvem métodos automáticos para a extração de analitos semelhantes (Pinto et al., 2006; Shishov et. al., 2015).

A proporção da mistura dos solventes orgânicos álcool isopropílico/clorofórmio foi variada numa faixa de 50:50 a 80:20 (v/v), a fim de selecionar a condição ótima de extração do metal. Para isso, foram empregadas soluções padrão de cobre(II) organometálico (Quimlab), diluídos em óleo mineral (Sigma-Aldrich). O critério para a escolha da proporção da mistura foi a sua capacidade de homogeneização eficiente do padrão organometálico de cobre, a fim de permitir o sinal de fluorescência adequado para o composto.

Os estudos foram guiados pela avaliação dos espectros de emissão de fluorescência dos PQC's, devido sua forte extinção de fluorescência, proporcional a concentração de íons cobre(II) em meio tampão PBS (pH 4,0). Para isso, foram registrados os espectros de emissão de fluorescência após a extração em fase única das soluções padrão com diferentes proporções da mistura do solvente álcool isopropílico/clorofórmio.

Na **Figura 4.9** são mostrados os sinais de fluorescência obtidos para a extração do padrão de cobre com uma concentração igual a $50 \mu\text{g L}^{-1}$.

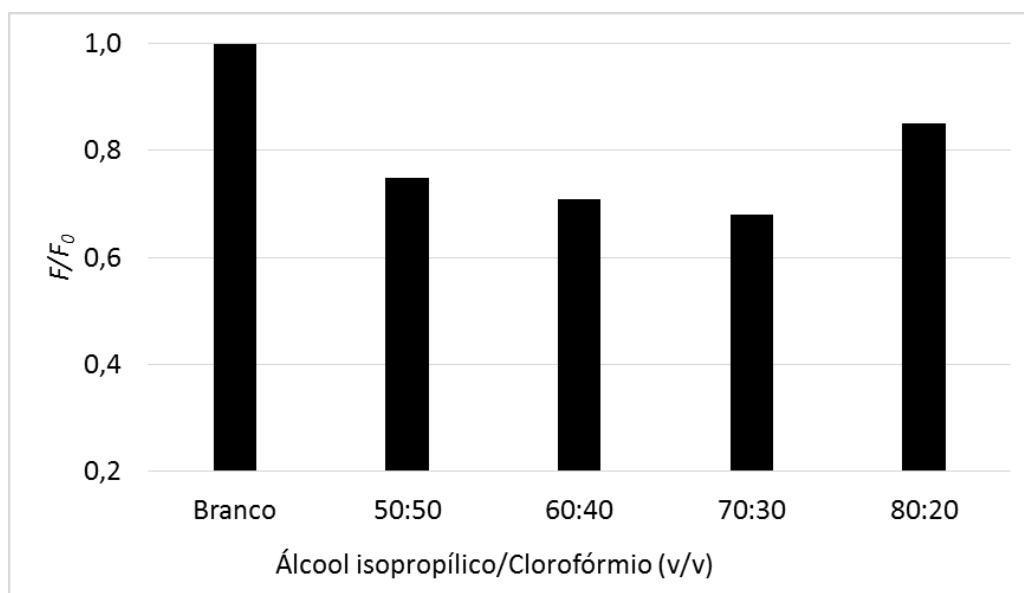


Figura 4.9. Influência da extração em fase única na emissão de fluorescência do sistema PQCs/Cu(II). F e F_0 são as intensidades de fluorescência na ausência e presença do íon metálico, respectivamente.

Com base nos resultados apresentados, podemos observar o sinal da relação de extinção da emissão de fluorescência em relação a proporção das misturas dos solventes, após a extração em fase única. Esse estudo permitiu direcionar a melhor estratégia de pré-tratamento como sendo a mistura de álcool isopropílico/clorofórmio na proporção 70:30 (v/v).

4.5. Parâmetros do sistema automático em fluxo-batelada

4.5.1. Precisão das válvulas solenoides

A vazão em cada linha de fluxo foi verificada pela medição da massa das soluções empregadas na análise, em uma balança analítica (Scientech modelo SA210), utilizando tempos de abertura das válvulas previamente estabelecidos. Com relação a válvula solenoide utilizada na adição das amostras, foi empregado a densidade média das amostras como parâmetro para ajustar a vazão, isso foi pertinente devido a viscosidade inerente das matrizes trabalhadas. Os valores médios da densidade individual das amostras foram comparados e exibidos na **Tabela 4.1.**

Tabela 4.1. Densidades dos óleos comestíveis empregados na avaliação do método proposto (n=3).

Amostra	Densidade (g mL ⁻¹)
Soja	0,8502
	0,8532
	0,8465
Girassol	0,8542
	0,8573
	0,8553
Canola	0,8520
	0,8479

As vazões médias encontradas para os canais individuais das soluções empregadas durante a determinação de cobre(II) em óleos comestíveis são apresentadas na **Tabela 4.2**.

Tabela 4.2. Vazões médias dos canais individuais das soluções.

Válvula*	Solução	Vazão (mL s ⁻¹)
V1	Amostra	0,0319 ± 0,0021
V2	Álcool isopropílico/clorofórmio 70:30 (v/v)	0,1563 ± 0,0032
V3	PQCs (1,0 mg mL ⁻¹)	0,0439 ± 0,0018
V4	Tampão PBS (pH 4,0)	0,0492 ± 0,0025

*Indicação das válvulas representadas na **Figura 3.9**.

4.5.2. Obtenção da curva analítica

A **Figura 4.10** mostra que os espectros de emissão de fluorescência dos PQCs apresentam uma inibição de fluorescência provocada pela presença dos íons Cu(II), em meio tampão PBS (pH 4,0). A intensidade de emissão da fluorescência, em 490 nm, diminui gradualmente com o aumento da concentração de cobre(II).

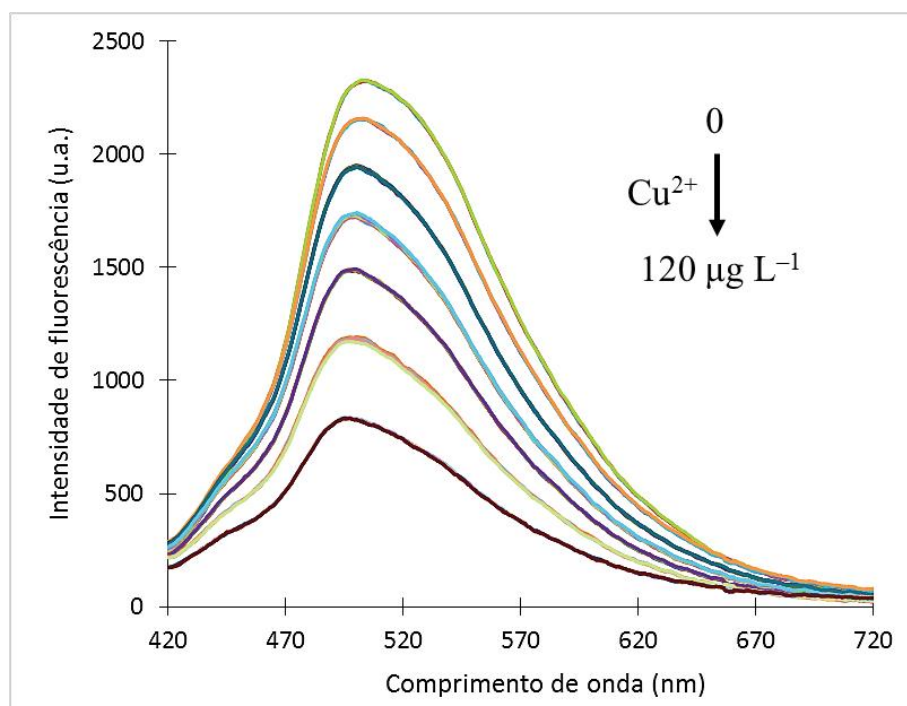


Figura 4.10. Espectros de fluorescência dos PQC's com diferentes concentrações de cobre(II) (0 a 150 $\mu\text{g L}^{-1}$), excitados em 400 nm.

O efeito de extinção da fluorescência dos PQC's na presença do íon Cu(II) pode ser atribuído, principalmente, à transferência de carga entre os grupos funcionais presentes na superfície dos PQC's (O–H, N–H, C–H, C–N, C=C, C–O–C) e o íon cobre(II), como reportado anteriormente (Dong et al., 2012; Liu et al. 2012; Liu et al., 2014; Gedda et al. 2016; Hou et al., 2016).

Como mostrado na **Figura 2.13 (Seção 2.5)**, a diminuição da fluorescência dos PQC's pode ser atribuída a formação do complexo entre o íon Cu(II) e os grupos aminas presentes na superfície dos PQC's, conforme relatado na literatura (Dong et al., 2012; Liu et al., 2014; Gedda et al. 2016).

4.5.3. Validação da curva analítica

Uma curva analítica foi construída para a faixa de concentrações de 20 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre(II), a partir dos espectros de fluorescência obtidos pelo método automático proposto baseado em PQC's. Para a construção da curva analítica foi utilizada a seguinte relação de fluorescência, reportada como já estabelecida pela literatura (Liu et al. 2012; Lin et al., 2014; Yu et al., 2015):

$$RF = \frac{(F_0 - F)}{F_0} \quad (8)$$

onde: F_0 corresponde o sinal de emissão de fluorescência do PQC's na ausência do cobre (branco), e F corresponde a emissão de fluorescência do PQC's na presença do cobre (padrão).

A **Figura 4.11** mostra a curva analítica obtida a partir da utilização do método automático proposto.

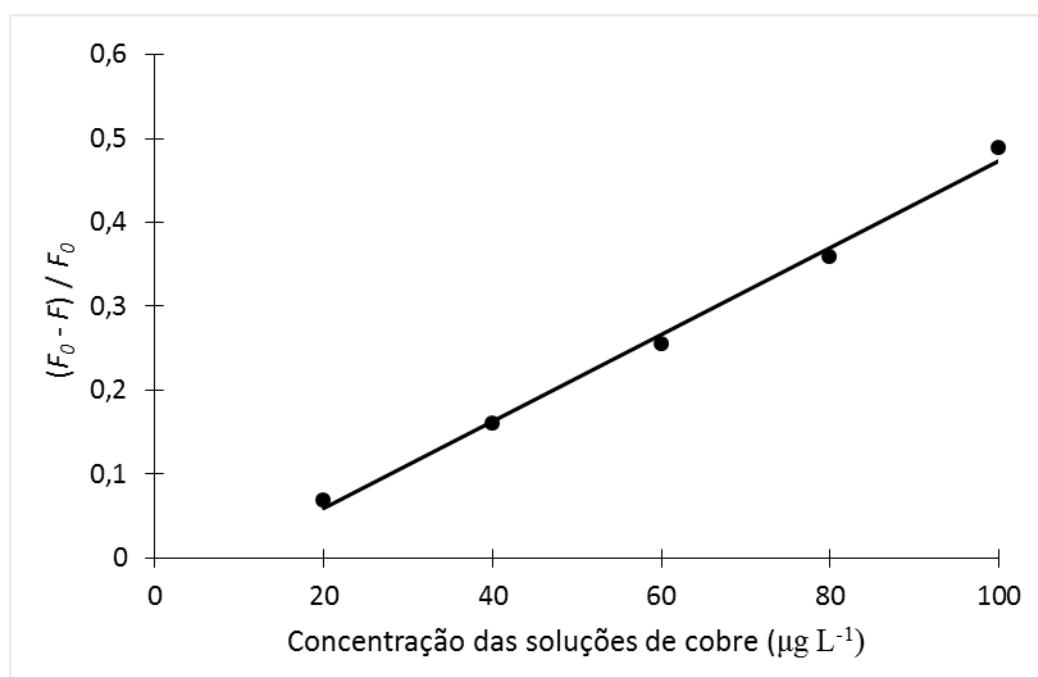


Figura 4.11. Curva analítica para a determinação de cobre(II) em óleos comestíveis.

A curva analítica obtida, foi construída a partir dos níveis de concentração 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre. A **Figura 4.11** mostra que a curva analítica apresenta um comportamento linear entre o valor da relação de fluorescência e a concentração de cobre das soluções padrão. Essa inferência baseada, inicialmente, em uma inspeção visual, pode ser, confirmada pela análise do gráfico dos resíduos deixado pelo modelo, apresentado na **Figura 4.12**, e corroborada pelos resultados da ANOVA apresentados em seguida.

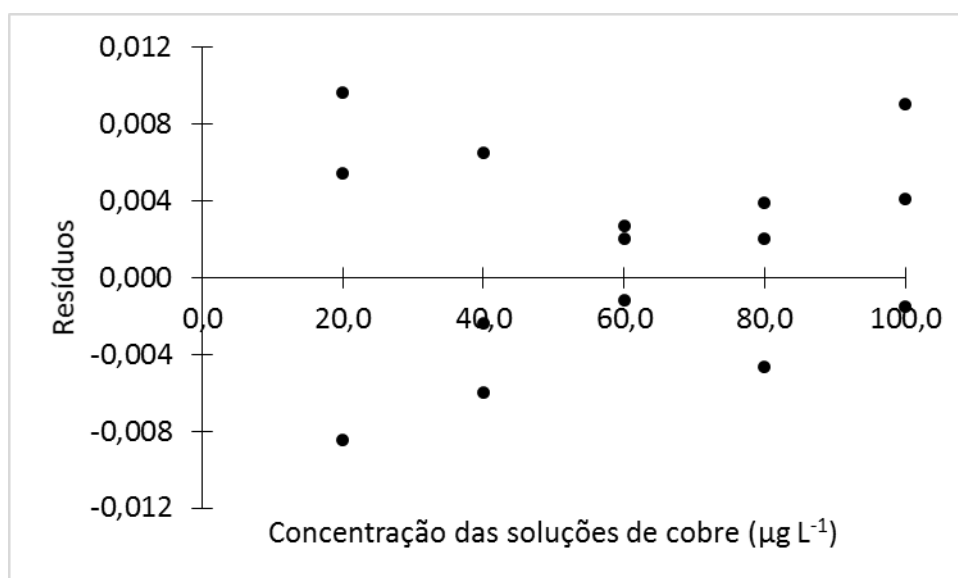


Figura 4.12. Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo do método proposto.

Pode-se observar na **Figura 4.12** a distribuição aleatória dos resíduos ao longo da faixa de concentração estudada. De fato, não se observa nenhum perfil, estrutura ou tendência sistemática evidenciando uma possível falta de ajuste do modelo construído para o método proposto.

Os resultados da aplicação da ANOVA, empregados para corroborar na validação do modelo de calibração, utilizando o método fluorescente automático, são apresentados na **Tabela 4.3**.

Tabela 4.3. Análise de variância (ANOVA) para o modelo linear obtido pelo método proposto.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Test F	
Regressão (R)	0,324	1	0,324	Significância de R	
Resíduos (r)	$1,52 \times 10^{-3}$	13	$1,17 \times 10^{-4}$	MQ_R/MQ_r	$2,78 \times 10^{-3}$
Falta de ajuste (faj)	$1,48 \times 10^{-3}$	3	$4,93 \times 10^{-4}$	Falta de ajuste	
Erro puro (ep)	$3,72 \times 10^{-3}$	10	$3,72 \times 10^{-4}$	MQ_{faj}/MQ_{ep}	1,32

Para verificar se o modelo postulado não apresenta falta de ajuste, compara-se o valor da relação MQ_{faj}/MQ_{ep} com o valor de $F_{3,10}$ (ponto de distribuição F para 3 e 10 graus de liberdade ao nível de confiança de 95%) que é igual a 3,71. Como o valor obtido pela razão MQ_{faj}/MQ_{ep} para o modelo proposto é menor que o valor de $F_{3,10}$ tabelado, então não existe evidência de falta de ajuste do modelo proposto. Para avaliar a significância estatística da regressão, compara-se o valor da razão MQ_R/MQ_r , cujo valor obtido é $2,78 \times 10^{-3}$, **Tabela 4.3)** com o valor de distribuição $F_{1,13}$ (igual a 4,67). Então podemos concluir que a regressão é expressivamente significativa.

Os parâmetros do modelo de calibração para o método proposto, obtidos por regressão linear pelo modelo dos mínimos quadrados, são apresentados na **Tabela 4.4**. Considerando 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 cobre na faixa de calibração, foram estimados os erros padrão dos coeficientes de regressão, b_0 e b_1 . Para isso, foi utilizado o valor da média quadrática residual (MQ_r) 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 (β_0 e β_1) do modelo linear obtido para o método proposto.

$y = b_0 + b_1 x$	
$b_0 \pm t_{13} \times \text{erro padrão } (b_0)$	$b_1 \pm t_{13} \times \text{erro padrão } (b_1)$
$-0,0435 \pm 0,0070$	$0,0052 \pm 0,0012$

A partir das estimativas e erros padrão de b_0 e b_1 , obteve-se o intervalo de 95% de confiança para os parâmetros populacionais (β_0 e β_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.

Após a validação da curva analítica, foram estimados para o método proposto os valores do limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) 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 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2,95
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	9,84
Sensibilidade	0,0052

Os valores de LOD, LOQ e sensibilidade estimados para o método fluorescente proposto revelaram ser satisfatórios, o que torna esse método apropriado para a determinação de cobre em óleos comestíveis.

4.5.4. Análise das amostras

Com base no exposto nas seções anteriores, o método se encontra adequado para a determinação do teor de cobre(II) nas amostras reais. Os resultados obtidos estão apresentados

em mg Kg^{-1} e encontra-se na **Tabela 4.6** sendo comparado ao método de referência por absorção atômica em forno de grafite.

Tabela 4.6. Resultados obtidos para determinação de cobre(II) em óleo comestível (mg Kg^{-1}) usando o sistema automático com detecção fluorescente e o método de referência ($n=3$).

Amostras	Sistema proposto		Referência	
	Cu(II)	DPR%	Cu(II)	DPR%
Soja				
1	$0,254 \pm 0,004$	1,43	$0,248 \pm 0,003$	1,10
2	$0,213 \pm 0,004$	1,65	$0,220 \pm 0,003$	1,15
3	$0,338 \pm 0,005$	1,55	$0,335 \pm 0,004$	1,06
Girassol				
1	$0,192 \pm 0,003$	1,62	$0,185 \pm 0,003$	1,50
2	$0,310 \pm 0,006$	1,86	$0,305 \pm 0,004$	1,16
3	$0,267 \pm 0,004$	1,49	$0,274 \pm 0,003$	1,14
Canola				
1	$0,185 \pm 0,003$	1,45	$0,188 \pm 0,002$	1,20
2	$0,244 \pm 0,006$	2,43	$0,247 \pm 0,003$	1,36

Onde: DPR% é o desvio padrão relativo.

A partir dos resultados obtidos, podemos averiguar uma boa concordância entre os valores do método proposto e o de referência por absorção atômica em forno de grafite. Quando aplicado o teste *t* pareado, os resultados não apresentaram diferenças significativas a um nível de 95% de confiança estatística.

4.5.5. Teste de recuperação

Para avaliar a exatidão do método proposto, duas amostras de óleo de cada tipo foram escolhidas aleatoriamente e empregadas para o teste de recuperação. Um volume de 50 μL da amostra foi adicionado a 50 μL de cada padrão de cobre(II) utilizado. Em seguida, foram adicionados 600 μL da mistura álcool isopropílico/clorofórmio (70:30 v/v), 50 μL de PQCs ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) e 50 μL da solução tampão PBS (pH 4). Os padrões de cobre(II) empregados

foram utilizados de modo a se obter concentrações finais de 40,0 e 60,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. A **Tabela 4.7** apresenta os resultados obtidos.

Tabela 4.7. Teste de recuperação para o cobre(II) nas amostras de óleo comestível (n = 3).

Amostras	Recuperação (%)	
	40,0 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	60,0 ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Soja	97,5 $\pm$ 1,4	105,6 $\pm$ 1,5
	106,3 $\pm$ 1,5	103,2 $\pm$ 1,6
Girassol	103,9 $\pm$ 1,4	104,9 $\pm$ 1,7
	96,8 $\pm$ 1,5	101,6 $\pm$ 1,8
Canola	105,2 $\pm$ 1,5	99,5 $\pm$ 1,6
	101,5 $\pm$ 1,8	104,2 $\pm$ 1,5

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 4.7**, podemos observar que os valores das recuperações para as amostras, após a adição dos padrões de cobre(II), variaram entre 96 e 106% (n = 3). Esse intervalo de recuperação pode ser considerado satisfatório para a determinação do analito de interesse.

5

CONCLUSÃO

Neste trabalho de pesquisa foi desenvolvido um novo método fluorimétrico empregando pontos quânticos de carbono para determinação de cobre(II) em óleos comestíveis utilizando um sistema em fluxo-batelada com extração *on-line* em fase única. Para essa abordagem, foi empregado um espectrofluorímetro portátil e um LED UV como detector e fonte de excitação, respectivamente. Esses componentes juntamente com o *software* de controle e aquisição de dados permitiram uma maior autonomia do sistema fluxo-batelada, contribuindo para a sua portabilidade.

Foi explorado uma estratégia simples, econômica e ambientalmente amigável para a preparação de PQC's fluorescentes a partir do simples tratamento hidrotérmico do suco de abacaxi, empregado como um bioprecursor barato e facilmente disponível na região. Os PQC's obtidos apresentaram uma considerável emissão de fluorescência e uma alta estabilidade em diferentes valores de pH, não sendo necessário nenhuma etapa de passivação das nanopartículas. Esses nanomateriais foram prontamente caracterizados por técnicas de espectrofotometria no UV-Vis, FT-IR, e fluorescência.

A determinação de cobre(II) com nanopartículas de carbono nas amostras de óleo comestível foi viabilizado devido ao eficiente e simplificado estudo de pré-tratamento da amostra. Esse pré-tratamento envolveu uma etapa de extração em fase única (empregando álcool isopropílico/clorofórmio), proporcionando a disponibilidade dos íons de interesse em meio aquoso. Foi constatado que a fluorescência dos PQC's pode ser significativamente extinta na presença dos íons Cu(II), simplesmente utilizando solução tampão PBS pH 4,0. O mecanismo de extinção da fluorescência pode ser atribuído as interações entre os grupos presentes na superfície dos PQC's com os íons Cu(II), principalmente entre os grupos aminas, conforme relatado na literatura.

Deste modo, vale ressaltar, que a união sinérgica dos pontos quânticos de carbono, extração em fase única e automação analítica, pode vislumbrar o desenvolvimento efetivo de

novas metodologias sensíveis e seletivas. Além disso, a implementação de métodos fluorescentes automáticos utilizando pontos quânticos de carbono, podem se tornar uma tendência valiosa, pois permitem realizar análises com uma apreciável praticidade, ao mesmo tempo simples, robustas e dedicadas, com potencial para aplicações nas mais diversas áreas do conhecimento científico e tecnológico como as engenharias, as ciências naturais e as ciências da saúde.

5.1. Perspectivas

Uma das expectativas de continuidade do presente trabalho é investigar a partir do método desenvolvido outros componentes traço em matrizes de complexidade e viscosidade consideráveis. Esses estudos podem fornecer informações relevantes para o desenvolvimento de novos métodos analíticos baseados em pontos quânticos de carbono e consequentemente a expansão dos seus campos de aplicação frente a matrizes de maior complexidade, como biodiesel, gasolina e óleos lubrificantes.

Pretende-se ainda investigar as características dos PQCs em aplicações que envolvam outras formas de pré-tratamento e pré-concentração, por exemplo, o uso de nanopartículas magnéticas, como também outras técnicas de detecção, tais como: imagens digitais, fotodiodos, entre outros.

No que se refere aos pontos quânticos de carbono, pretende-se estudar novas rotas de síntese hidrotérmica, bem como sua implementação em sistemas de análise em fluxo. Etapas de funcionalização e revestimento também serão estudadas, a exemplo de heteroátomos como o nitrogênio e o enxofre, e moléculas orgânicas como aminoácidos e enzimas, a fim de prover, um aumento no rendimento quântico de fluorescência, bem como elevar a seletividade para outras substâncias de interesse.

6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amjadi M., Manzoori J.L., Hallaj T., Sorouraddin M.H., Direct chemiluminescence of carbon dots induced by potassium ferricyanide and its analytical application. *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 122, 715-720, **2014**.

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

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

Baptista F.R., Belhout S.A., Giordani S., Quinn S. J., Recent developments in carbon nanomaterial sensors. *Chem. Soc. Rev.*, 44, 4433-4453, **2015**.

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* 47, 325-332, **2015**.

Barreto I.S., Lima M.B., Andrade S.I.E., Araújo M.C.U., Almeida L.F., Using a flow-batch analyzer for photometric determination of Fe(III) in edible and lubricating oils without external pretreatment. *Anal. Methods* 5, 1040-1045, **2013**.

Burguera J.L., Burguera M., Pretreatment of oily samples for analysis by flow injection spectrometric methods. *Talanta* 83, 691-699, **2011**.

Cabrera-Vique C., Bouzas P.R., Oliveras-López M.J., Determination of trace elements in extra virgin olive oils: A pilot study on the geographical characterisation. *Food Chem.* 134, 434-439, **2012**.

Cárnara M., Díez C., Torija E., Chemical characterization of pineapple juices and nectars. Principal components analysis. *Food Chem.* 54, 93-100, **1995**.

Chaves E.S., Loos-Vollebregt M.T.C., Curtius A.J., Vanhaecke F., Determination of trace elements in biodiesel and vegetable oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry following alcohol dilution. *Spectrochim. Acta Part B* 66, 733-739, **2011**.

Codex Alimentarius, Codex standard for named vegetable oils. *Codex Stan.*, **2009**.

Costas-Mora I., Romero V., Lavilla I., Bendicho C., An overview of recent advances in the application of quantum dots as luminescent probes to inorganic-trace analysis. *Trends Anal. Chem.* 57, 64-72, **2014**.

De B., Karak N., A green and facile approach for the synthesis of water soluble fluorescent carbon dots from banana juice. *RSC Adv.* 3, 8286-8290, **2013**.

Demchenko A.P., Dekaliuk M.D., Novel fluorescent carbonic nanomaterials for sensing and imaging. *Methods Appl. Fluoresc.* 1, 1-17, **2013**.

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*, 10, 484-491, **2016**.

Diniz P.H.G.D., Almeida L.F., Harding D.P., Araújo M.C.U., Flow-batch analysis. *Trends in Anal. Chem.* 35, 39-49, **2012**.

Domínguez M.A., Grünhut M., Pistonesi M.F., Di Nezio M.S., Centurión M.E., Automatic flow-batch system for cold vapor atomic absorption spectroscopy determination of mercury in honey from Argentina using online sample treatment. *J. Agric. Food Chem.* 60, 4812-4817, **2012**.

Dong Y., Wang R., Li G., Chen C., Chi Y., Chen G., polyamine-functionalized carbon quantum dots as fluorescent probes for selective and sensitive detection of copper ions. *Anal. Chem.* 84, 6220-6224, **2012**.

Facchin I., Extração líquido-líquido em sistema de fluxo monossegmentado. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Estadual de Campinas, **1996**.

Feng X.Z., Xu Y., Wu M., Yin X.B., He X.W., Zhang Y.K., Reduced carbon dots versus oxidized carbon dots: photo- and electrochemiluminescence investigations for selected applications. *Chem. Eur. J.* 19, 6282-, **2013**.

Ganiga M., Cyriac J., FRET based ammonia sensor using carbon dots, *Sens. Actuat. B: Chem.* 225, 522-528, **2016**.

Garrido M.D., Frías L., Díaz C., Hardisson A., Concentrations of metals in vegetable edible oils. *Food Chem.* 50, 237-243, **1994**.

Gedda G., Lee C.Y., Lin Y.C., Wu H., Green synthesis of carbon dots from prawn shells for highly selective and sensitive detection of copper ions. *Sens. Actuat. B: Chem.* 224, 396-403, **2016.**

Guo L., Ge J., Liu W., Niu G., Jia Q., Wang H., Wang P., Tunable multicolor carbon dots prepared from well-defined polythiophene derivatives and their emission mechanism. *Nanoscale* 8, 729-734, **2016.**

Guo Y., Zhang L., Zhang S., Yang Y., Chen X., Zhang M., Fluorescent carbon nanoparticles for the fluorescent detection of metal ions. *Biosens. Bioelectron.* 63, 61-71, **2015.**

Himaja A.L., Karthik P.S., Singh S.P., Carbon dots: the newest member of the carbon nanomaterials family. *Chem. Rec.* 15, 595-615, **2015.**

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* 5, 590-603, **2014.**

Holler F.J., Skoog D.A., Crouch S.R., *Princípios de análise instrumental.* 6 ed., Porto Alegre, Bookman, **2009.**

Honorato R.S., Araújo M.C.U., Lima R.A.C, Zagatto E.A.G, Lapa R.A.S., Lima J.L.F.C., A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimisation algorithm for end point search. *Anal. Chim. Acta* 396, 91-97, **1999.**

Hou J., Dong G., Tian Z., Lu J., Wang Q., Ai S., Wang M., A sensitive fluorescent sensor for selective determination of dichlorvos based on the recovered fluorescence of carbon dots-Cu(II) system. *Food Chem.* 202, 81-87, **2016.**

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

Hu B., Wang K., Wu L., Yu S.H., Antonietti M., Titirici M.M., Engineering carbon materials from the hydrothermal carbonization process of biomass. *Adv. Mater.* 22, 813-828, **2010.**

Huang H., Lv J.J., Zhou D.L., Bao N., Xu Y., Wang A.J., Feng J.J., One-pot green synthesis of nitrogen-doped carbon nanoparticles as fluorescent probes for mercury ions. *RSC Adv.* 2013, 3, 21691-21696, **2013.**

Huang H., Xu Y., Tang C.J., Chen J.R., Wang A.J., Feng J.J., Facile and green synthesis of photoluminescent carbon nanoparticles for cellular imaging. *New J. Chem.* 38, 784-789, **2014**.

Jeong C.J., Roy A.K., Kim S.H., Lee J.E., Jeong J.H., In I., Park S.Y., Fluorescent carbon nanoparticles derived from natural materials of mango fruit for bio-imaging probes. *Nanoscale* 6, 15196-15202, **2014**.

Kolev S.D., McKelvie I.D., (Editores), *Comprehensive analytical chemistry. Advances in flow injection analysis and related techniques.* Elsevier, Amsterdam, **2008**.

Kong W., Wu H., Ye Z., Li R., Xu T., Zhang B., Optical properties of pH-sensitive carbon-dots with different modifications. *J. Lumin.* 148, 238-242, **2014**.

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. Ed.* 49, 4430-4434, **2010**.

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

Li H., Zhang Y., Wang L., Tian J., Sun X., Nucleic acid detection using carbon nanoparticles as a fluorescent sensing platform. *Chem. Commun.* 47, 961-963, **2011**.

Liao B., Long P., He B., Yi S., Ou B., Shen S., Chen J., Reversible fluorescence modulation of spiropyranfunctionalized carbon nanoparticles. *J. Mater. Chem. C* 1, 3716-3721, **2013**.

Lim S.Y., Shen W., Gao Z., Carbon quantum dots and their applications. *Chem. Soc. Rev.* 44, 362-381, **2014**.

Lima M.B., Andrade S.I.E., Barreto I.S., Araújo M.C.U., Automatic flow-batch approach using CdTe quantum dots for fluorescent determination of ascorbic acid in fruit juices. *Food Anal. Methods* 18, 1-6, **2014a**.

Lima M.B., Andrade S.I.E., Barreto I.S., Araújo M.C.U., In-line single-phase extraction for direct determination of total iron in oils using CdTe quantum dots and a flow-batch system. *Anal. Methods* 7, 7707-7714, **2015**.

Lima M.B., Andrade S.I.E., Harding 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, 717-723, **2012b**.

Lima M.B., Andrade S.I.E., Neta M.S.S., Barreto I.S., Almeida L.F., Araújo M.C.U., A Micro-flow-batch analyzer using webcam for spectrophotometric determination of ortho-phosphate and aluminium(III) in tap water. *J. Braz. Chem. Soc.* 25, 898-906, **2014b**.

Lima M.B., Barreto I.S., Andrade S.I.E., Neta M.S.S., Almeida L.F., Araújo M.C.U., Photometric determination of phosphorus in mineralized biodiesel using a micro-flow-batch analyzer with solenoid micro-pumps. *Talanta* 98, 118-122, **2012c**.

Lima M.B., Insausti M., Domini C.E., Pistonesi M.F., Araújo M.C.U., Band B.S.F., Automatized flow-batch method for fluorescent determination of free glycerol in biodiesel samples using on-line extraction. *Talanta* 89, 21-26, **2012a**.

Lin X., Gao G., Zheng L., Chi Y., Chen G., Encapsulation of strongly fluorescent carbon quantum dots in metal-organic frameworks for enhancing chemical sensing. *Anal. Chem.* 86, 1223-1228, **2014**.

Lin Z., Xue W., Chen H., Lin J.M., Classical oxidant induced chemiluminescence of fluorescent carbon dots. *Chem. Commun.* 48, 1051-1053, **2012**.

Liu S., Tian J., Wang L., Zhang Y., Qin X., Luo Y., Asiri A.M., Al-Youbi A.O., Sun X., Hydrothermal treatment of grass: a low-cost, green route to nitrogen-doped, carbon-rich, photoluminescent polymer nanodots as an effective fluorescent sensing platform for label-free detection of Cu(II) ions. *Adv. Mater.* 24, 2037-2041, **2012**.

Liu Y., Zhao Y., Zhang Y.a, b., One-step green synthesized fluorescent carbon nanodots from bamboo leaves for copper(II) ion detection. *Sens. Actuat. B: Chem* 196, 647-652, **2014**.

Luo P.G., Sahu S., Yang S.T., Sonkar S.K., Wang J., Wang H., LeCroy G.E., Cao L., Sun Y.P., Carbon “quantum” dots for optical bioimaging. *J. Mater. Chem. B.* 1, 2116-2127, **2013**.

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**.

Mao Y., Bao Y., Han D., Li F., Niu L., Efficient one-pot synthesis of molecularly imprinted silica nanospheres embedded carbon dots for fluorescent dopamine optosensing. *J. Biosen. Bioelec.* 38, 55-60, **2012**.

Mehta V.N., Jha S., Kailasa S.K., One-pot green synthesis of carbon dots by using *Saccharum officinarum* juice for fluorescent imaging of bacteria (*Escherichia coli*) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells. *Mater. Sci. Eng. C.* 38, 20-27, **2014**.

Mendil D., Uluözlü O.D., Tüzen M., Soylak M., Investigation of the levels of some element in edible oil samples produced in Turkey by atomic absorption spectrometry. *J. Hazard. Mater.* 165, 274-728, **2009**.

Nunes L.S., Barbosa J.T.P., Fernandes A.P., Lemos V.A., Santos W.N.L., Korn M.G.A., Teixeira L.S.G., Multi-element determination of Cu, Fe, Ni and Zn content in vegetable oils samples by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry and microemulsion sample preparation. *Food Chem.* 127, 780-783, **2011**.

Neto B.B., Scarminio I.S., Bruns R.E., Como Fazer Experimentos: Aplicações na Ciência e na Indústria. 4 ed., Porto Alegre, Bookman, **2010**.

Oliveira S.C.B., Coelho E.C.S., Selva T.M.G., Santos F.P., Araújo M.C.U., Abreu F.C., Nascimento V.B., A coulometric flow cell for in-line generation of reagent, titrant or standard solutions. *Microchemical J.* 82, 220-225, **2006**.

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

Passos M.L.C., Pinto P.C.A.G., Santos J.L.M., Saraiva M.L.M.F.S., Araujo A.R.T.S., Nanoparticle-based assays in automated flow systems: A review. *Anal. Chim. Acta.* 889, 22-34, **2015**.

Pedro S.G., Salinas-Castillo A., Ariza-Avidad M., Lapresta-Fernández A., Sánchez-González C., Martínez-Cisneros C.S., Puyol M., Capitan-Vallvey L.F., Alonso-Chamarro, J.. Microsystem-assisted synthesis of carbon dots with fluorescent and colorimetric properties for pH detection. *Nanoscale* 6, 6018-6024, **2014**.

Peng H., Travas-Sejdic J., Simple aqueous solution route to luminescent carbogenic dots from carbohydrates. *Chem. Mater.* 21, 5563-5565, **2009**.

Pinto P.C.A.G., Saraiva M.L.M.F.S., Lima J.L.F.C., A flow sampling strategy for the analysis of oil samples without pre-treatment in a sequential injection analysis system, *Anal. Chim. Acta* 555, 377-383, **2006**.

Prasad K.S., Pallela R., Kim D.M., Shim Y.B., Microwave-assisted one-pot synthesis of metal-free nitrogen and phosphorus dual-doped nanocarbon for electrocatalysis and cell imaging. *Part. Syst. Charact.* 30, 557-564, **2013**.

Purbia R., Paria S., A simple turn on fluorescent sensor for the selective detection of thiamine using coconut water derived luminescent carbon dots. *Biosens. Bioelectron.* 79, 467-475, **2016**.

Qian Z.S., Chai L.J., Huang Y.Y., Tang C., Shen J.J., Chen J.R., Feng H., A real-time fluorescent assay for the detection of alkaline phosphatase activity based on carbon quantum dots. *Biosens. Bioelectron.* 68, 675-680, **2015**.

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, *Anal. Chim. Acta* 293, 129-138, **1994**.

Reis B.F., Knochen M., Pignalosa G., Cabrera N., Giglio J., A multicommutated flow system for the determination of copper, chromium, iron and lead in lubricating oils with detection by flame AAS. *Talanta* 5, 1220-1225, **2004**.

Ruzicka J., Hansen E.H., Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis, *Anal. Chim. Acta*, 78, 145-157, **1975**.

Ruzicka J., Marshall G.D., Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Anal. Chim. Acta* 237, 329-343, **1990**.

Sahu S., Behera B., Maiti T.K., Mohapatra S., Simple one-step synthesis of highly luminescent carbon dots from orange juice: application as excellent bio-imaging agents. *Chem. Commun.* 48, 8835-8837, **2012**.

Shamsipur M., Safavi A., Mohammadpour Z., Zolghadr A.R., Fluorescent carbon nanodots for optical detection of fluoride ion in aqueous media. *Sens. Actuat. B: Chem* 221, 1554-1560, **2015**.

Shen L., Zhang L., Chen M., Chen X., Wang J., The production of pH-sensitive photoluminescent carbon nanoparticles by the carbonization of polyethylenimine and their use for bioimaging. *Carbon* 55, 343-349, **2013**.

Shishov A.Y., Nikolaeva L.S., Moskvina L.N., Bulatov A.V., Fully automated spectrophotometric procedure for simultaneous determination of calcium and magnesium in biodiesel. *Talanta* 135, 133-137, **2015**.

Silva J.C.F.E., Gonçalves H.M.R., Analytical and bioanalytical applications of carbon dots. *Trends Anal. Chem.* 30, 1327-1336, **2011**.

Silva J.E., Silva F.A., Pimentel M.F., Honorato R.S., Silva V.L., Montenegro M.C.B.S.M., Araújo A.N., A flow-batch internal standard procedure for iron determination in hydrated ethanol fuel by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta* 70, 522-526, **2006**.

Skeggs L.T.Jr., An automatic method for colorimetric analysis. *American Society for Clinical Pathology* 28, 311-22, **1957**.

Sun D., Ban R., Zhang P.H., Wu G.H., Zhang J.R., Zhu J.J., Hair fiber as a precursor for synthesizing of sulfur- and nitrogen-co-doped carbon dots with tunable luminescence properties. *Carbon* 64, 424-434, **2013**.

Sun Y.P., Wang X., Lu F., Cao L., Mezziani M.J., Luo P.G., Gu L., Veca L.M., Doped carbon nanoparticles as a new platform for highly photoluminescent dots. *J. Phys. Chem. C. V.* 112, 18295-18298, **2008**.

Teng P., Xie J., Long Y., Huang X., Zhu R., Wang X., Liang L., Huang Y., Zheng H., Chemiluminescence behavior of the carbon dots and the reduced state carbon dots. *J. Lumin.* 146, 464-469, **2014**.

Thompson M., Ellison S.L.R., Wood R., Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *International Union of Pure and Applied Chemistry* 74, 835-855, **2002**.

Trindade A.S.N., Dantas A.F., Lima D.C., Ferreira S.L.C., Teixeira L.S.G., Multivariate optimization of ultrasound-assisted extraction for determination of Cu, Fe, Ni and Zn in vegetable oils by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. *Food Chem.* 185, 145-150, **2015**.

Trojanowicz M., (editor). *Advances in Flow Analysis*. Weinheim: Wiley-VCH. **2008**.

Wang Q., Zhang S., Ge H., Tian G., Cao N., Li Y., A fluorescent turn-off/on method based on carbon dots as fluorescent probes for the sensitive determination of Pb^{2+} and pyrophosphate in an aqueous solution. *Sens. Actuat. B: Chem.* 207, 25-33, **2015**.

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

Wei W., Xu C., Wu L., Wang J., Ren J., Qu X., Non-Enzymatic-Browning-Reaction: A versatile route for production of nitrogen-doped carbon dots with tunable multicolor luminescent display. *Sci. Rep.* 4, 3564-3571, **2014**.

Xu H., Yang X., Li G., Zhao C., Liao X., Green synthesis of fluorescent carbon dots for selective detection of tartrazine in food samples. *J. Agric. Food Chem.* 63, 6707-6714, **2015**.

Xu, J.; Zhou, Y.; Liu, S.; Dong, M.; Huang, C., Low-cost synthesis of carbon nanodots from natural products used as a fluorescent probe for the detection of ferrum(III) ions in lake water. *Anal. Methods* 6, 2086-2090, **2014a**.

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**.

Xu Y., Liu J., Gao C., Wang E., Applications of carbon quantum dots in electrochemiluminescence: A mini review. *Electrochem. Commun.* 48, 151-154, **2014b**.

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.* 19, 2276-2283, **2013**.

Xue M., Zhang L., Zou M., Lan C., Zhan Z., Zhao S., Nitrogen and sulfur co-doped carbon dots: A facile and green fluorescence probe for free chlorine. *Sens. Actuat. B: Chem* 219, 50-56, **2015**.

Yan Z., Zhang Z., Chen J., Biomass-based carbon dots: Synthesis and application in imatinib determination, *Sens. Actuat. B: Chem* 225, 469-473, **2016**.

Yang M., Kong W., Li H., Liu J., Huang H., Liu Y., Kang Z., Fluorescent carbon dots for sensitive determination and intracellular imaging of zinc(II) ion. *Microchim Acta* 182, 2443-2450, **2015**.

Yang S., Sun J., Li X., Zhou W., Wang Z., He P., Ding G., Xie X., Kang Z., Jiang M., Large-scale fabrication of heavy doped carbon quantum dots with tunable-photoluminescence and sensitive fluorescence detection. *J. Mater. Chem. A* 2, 8660-8667, **2014**.

Yu J., Song N., Zhang Y., Zhong S., Wang A., Chen J., Green preparation of carbon dots by Jinhua bergamot for sensitive and selective fluorescent detection of Hg^{2+} and Fe^{3+} . *Sens. Actuat. B: Chem* 214, 29-35, **2015**.

Zagatto E.A.G., Van Staden J.F., Maniasso N., Stefan R.I., Marshall G.D., Information essential for characterizing a flow-based analytical system. *Pure and Applied Chemistry* 74, 585-592, **2002**.

Zhai J., Li H., Sun X., Sensitive and selective detection of silver(I) ion in aqueous solution using carbon nanoparticles as a cheap, effective fluorescent sensing platform. *Langmuir* 27, 4305-4308, **2011**.

Zhang H., Ming H., Lian S., Huang H., Li H., Zhang L., Liu Y., Kang Z., Lee S.T., Fe_2O_3 /carbon quantum dots complex photocatalysts and their enhanced photocatalytic activity under visible light. *Dalton Trans.* 40,10822-10825, **2011**.

Zhang S., Li J., Zeng M., Xu J., Wang X., Hu W., Polymer nanodots of graphitic carbon nitride as effective fluorescent probes for the detection of Fe^{3+} and Cu^{2+} ions. *Nanoscale* 6, 4157-4162, **2014a**.

Zhang Z., Shi Y., Pan Y., Cheng X., Zhang L., Chen J., Li M.J., Yi C., Quinoline derivative-functionalized carbon dots as a fluorescent nanosensor for sensing and intracellular imaging of Zn^{2+} . *J. Mater. Chem. B* 2, 5020-5027, **2014b**.

Zhao H.X., Liu L.Q., Liu Z.D., Wang Y., Zhao X.J., Zhi C.H., Highly selective detection of phosphate in very complicated matrixes with an off–on fluorescent probe of europium-adjusted carbon dots. *Chem. Commun.* 47, 2604-2606, **2011.**

Zhao L., Di F., Wang D., Guo L.H., Yang Y., Wan B., Zhang H., Chemiluminescence of carbon dots under strong alkaline solutions: a novel insight into carbon dot optical properties. *Nanoscale* 5, 2655-2658, **2013.**

Zhao S., Lan M., Zhu X., Xue H., Ng T.W., Meng X., Lee C.S., Wang P., Zhang W., Green synthesis of bifunctional fluorescent carbon dots from garlic for cellular imaging and free radical scavenging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 17054-17060, **2015.**

Zhu J., Booker C., Li R., Zhou X., Sham T.K., Sun X., Ding Z., Microwave synthesis of fluorescent carbon nanoparticles with electrochemiluminescence properties. *Chem. Commun.* 34, 5118-5120, **2009.**

Zou Y., Yan F., Dai L., Luo Y., Fu Y., Yang N., Wun J., Chen L., High photoluminescent carbon nanodots and quercetin- Al^{3+} construct a ratiometric fluorescent sensing system. *Chem. Carbon* 77, 1148-1156, **2014.**

ANEXO: Produção científica

Artigos publicados

Ao longo do curso de doutorado em Química (2012-2016), área de concentração: Química Analítica, foram publicados artigos científicos relacionados com o trabalho e que permitiram o desenvolvimento efetivo da presente tese. Os principais estão elencados a seguir.

Outras produções científicas realizadas neste período podem ser visualizadas na Plataforma Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4590305555570487>.

Analytical
Methods



PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue



Cite this: *Anal. Methods*, 2015, 7, 7707

In-line single-phase extraction for direct determination of total iron in oils using CdTe quantum dots and a flow-batch system

Marcelo B. Lima,^{*a} Stéfani Iury E. Andrade,^a Inakã S. Barreto^{ab}
and Mário César U. Araújo^a

In this work, a novel method for direct determination of total iron in viscous samples (edible oils and biodiesel) is presented. Considering sensitivity and selectivity, the proposed method used in-line single-phase extraction and CdTe quantum dots (QDs). The method was automated employing a flow-batch system. The in-line single-phase extraction of iron consisted of the addition of a mixture of ethanol/chloroform (75 : 25, v/v) to dissolve the oil samples, followed by addition of an acid solution, HNO₃/HCl (3 : 1, v/v) to make the iron available. The analytical method was based on iron capacity to establish surface interactions with CdTe QDs that result in quenching of their fluorescence intensity proportional to the iron concentration. Various factors that may influence the fluorescence quenching of iron, such as pH, sample volume, amount of the organic mixture, and acid solution concentration, were studied. The maximum reproducibility of this fluorescence quenching occurred at pH 7.5. Phosphate buffered saline (PBS) 1.0 mol L⁻¹ was added before the reaction. Method validation and application to real samples showed that the analytical features of the developed method were quite satisfactory in terms of linearity ($r^2 = 0.997$), limit of detection (0.1 µg g⁻¹), precision (RSD < 1.6%), and accuracy (recovery = 95.5–104.3% range), when compared to other studies in the literature. The proposed automatic method presented suitable robustness, a high sampling rate (79 h⁻¹), and lower waste generation per determination (0.900 mL), contributing to the basic principles of green chemistry.

Received 6th May 2015
Accepted 28th July 2015

DOI: 10.1039/c5ay01179e

www.rsc.org/methods

Food Anal. Methods (2014) 7:1598–1603
DOI 10.1007/s12161-014-9794-x

Automatic Flow-Batch Approach Using CdTe Quantum Dots for Fluorescent Determination of Ascorbic Acid in Fruit Juices

Marcelo B. Lima • Stéfani Iury E. Andrade •
Inakã S. Barreto • Mário César U. Araújo

Received: 7 November 2013 / Accepted: 7 January 2014 / Published online: 18 January 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract This paper introduces, for the first time, the combination of the advantageous features of the automatic flow-batch system for implementing quantitative chemical analysis involving the use of quantum dots (QDs). For illustration, the combined QD-flow-batch system was applied for the fluorescent determination of ascorbic acid in fruit juices. Cadmium telluride (CdTe) QDs were selected in this work because they are the most commonly synthesized and used ones for the analytical applications. Water-soluble CdTe QDs were successfully produced using mercaptopropionic acid. The analytical method is based on the quenching effect produced by ascorbic acid on the fluorescence of CdTe. All calibration

Introduction

Quantum dots (QDs) are colloidal semiconductor nanocrystals often formed by elements from the periodic groups 12–16 (ZnS, CdSe, cadmium telluride (CdTe), HgTe), 13–15 (InP, InAs), or 14–16 (SnTe, PbSe) (Kuang et al. 2011). These nanoparticles have important intrinsic properties, such as high photostability; high quantum yield; size-tunable, narrow, and symmetric band emission; and high absorption coefficient across a wide spectral range (Heuff et al. 2007). Such photoluminescent properties have made them to be attractive materials in diverse fields of application as, for example, in the



<http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140152>

J. Braz. Chem. Soc., Vol. 25, No. 9, 1638-1646, 2014.
Printed in Brazil - ©2014 Sociedade Brasileira de Química
0103 - 5053 \$6.00+0.00

Article

Using Webcam, CdTe Quantum Dots and Flow-Batch System for Automatic Spectrofluorimetric Determination of *N*-Acetyl-L-cysteine in Pharmaceutical Formulations

Marcelo B. Lima, Inakã S. Barreto, Stéfani Iury E. Andrade, Luciano F. Almeida and
Mário César U. Araújo*

Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), Universidade
Federal da Paraíba, Caixa Postal 5093, 58051-970 João Pessoa-PB, Brazil

Neste trabalho é proposta a combinação de um sistema *flow-batch*, pontos quânticos (QDs) e de uma webcam como detector para determinação espectrofluorimétrica automática de *N*-acetil-L-cisteína (NAC) em formulações farmacêuticas. O NAC gera interações superficiais com os QDs, que resultam no aumento proporcional da intensidade de fluorescência com a concentração do analito. Seletores de comprimento de onda não são necessários para o processo de excitação e emissão de fluorescência devido ao espectro de excitação alargado, a reação seletiva e específica entre QDs de CdTe e NAC, e o modelo matemático de tratamento das imagens digitais. O limite de detecção e o desvio padrão relativo foram estimados em $0,14 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $< 1,4\%$ ($n = 5$), respectivamente. A exatidão foi avaliada através do teste de recuperação (98,5-102,8%). A robustez do método foi avaliada por comparação intra- e inter-dias, utilizando o método volumétrico de referência ao nível de 95% de confiança. O sistema apresenta robustez satisfatória, alta frequência analítica (153 h^{-1}) e reduzido consumo de produtos químicos.

The combination of a flow-batch system, quantum dots (QDs) and webcam as detector for the automatic spectrofluorimetric determination of *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) in pharmaceutical formulations is proposed. NAC generates surface interactions that result in enhanced QD fluorescence intensity, which is proportional to analyte concentration. Wavelength selectors are not necessary for excitation and emission process due to the broad excitation spectrum of QDs, the selective and specific reaction between CdTe QDs and NAC, and the mathematical model employed for the treatment of digital images. The limit of detection and relative standard deviation were estimated at $0.14 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $< 1.4\%$ ($n = 5$), respectively. The accuracy was assessed through recovery test (98.5 to 102.8%). The ruggedness of the method was assessed by comparison of the intra- and inter-day using the iodometric titration method at a 95% confidence level. The system presented satisfactory robustness, high sampling rate (153 h^{-1}), and reduced chemical consumption.

Using a flow-batch analyzer for photometric determination of Fe(III) in edible and lubricating oils without external pretreatment

Cite this: *Anal. Methods*, 2013, 5, 1040

Inakã S. Barreto, Marcelo B. Lima, Stéfani Iury E. Andrade, Mário César U. Araújo and Luciano F. Almeida*

In this study a flow-batch analyzer (FBA) was utilized and its feasibility was demonstrated for the determination of Fe(III) in edible and lubricating oils without external pretreatment. The FBA method uses the reaction of this ion with thiocyanate in organic medium. The formed red complex was monitored by employing a light emitting diode (LED, $\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$) and a phototransistor linked to the mixing chamber by optical fibers. All standard solutions were prepared in-line and all analytical processes were carried out by simply changing the operational parameters in FBA control software. Comparing with the reference method, no statistically significant differences were observed when applying the paired *t*-test at a 95% confidence level. The relative standard deviation, analytical frequency and limit of detection were estimated for both viscous matrices (edible and lubricating oils) at $<2.1\%$ ($n = 3$), about 95 h^{-1} , and 0.004 mg kg^{-1} , respectively. The recovery study shows results between 97.8% and 103.6% for both matrices. The FBA method showed better analytical features when compared with previous automatic flow methods. Thus, the FBA is potentially useful as an alternative for the determination of other ions in similar samples or in other viscous matrices without external pretreatment.

Received 6th August 2012
Accepted 19th November 2012

DOI: 10.1039/c2ay25866h

www.rsc.org/methods



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Photometric determination of phosphorus in mineralized biodiesel using a micro-flow-batch analyzer with solenoid micro-pumps

Marcelo B. Lima, Inakã S. Barreto, Stéfani Iury E. Andrade, Maria S.S. Neta, Luciano F. Almeida, Mário C.U. Araújo*

Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Química, João Pessoa, PB, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 May 2012

Received in revised form

21 June 2012

Accepted 21 June 2012

Available online 29 June 2012

Keywords:

Micro-flow-batch analyzer

Urethane-acrylate resin

Biodiesel

Molybdenum blue method

Phosphorus determination

ABSTRACT

A method for the determination of phosphorus in mineralized biodiesel using a micro-flow-batch analyzer (μ FBA) with solenoid micro-pumps was proposed. The samples were mineralized using an ashing procedure at 550 °C followed by dissolution of the residue. The determination of phosphorus was performed by employing the well-known molybdenum blue method. The measures of the absorbance were performed at 850 nm using an InfraRed LED integrated into the μ FBA. Comparing with the reference method, no statistically significant differences were observed when applying the paired t-test at a 95% confidence level. Recovery study shows results between 97.9% and 105.8%. The proposed microsystem using solenoid micro-pumps presented satisfactory robustness and high sampling rate (190 h⁻¹), with satisfactory reproducibility (relative standard deviation < 4.5%, $n=3$), low reagents consumption (32 μ L per analysis) and cost to build the device. Moreover, μ FBA presents limit of detection (0.014 mg Kg⁻¹), precision and accuracy compatible with the biodiesel regulations that establish a maximum concentration of 10 mg Kg⁻¹ (Brazil, USA, EU), suggesting that it is a good alternative for the determination of phosphorus in biodiesel.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.