



DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO LEVULÍNICO

DALTON MARINHO SILLOS

outubro de 2023

ESTUDO PRELIMINAR PARA DETEÇÃO RÁPIDA DO ÁCIDO LEVULÍNICO



Autor

Dalton Marinho Sillos - Dissertação Submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biorrecursos.

Orientador: Professor Abel Duarte – ISEP

Coorientadora Doutora Felismina Moreira – LabRise

Mestrado em Biorrecursos

Dissertação - Setembro de 2023

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação de Mestrado contou com a colaboração de algumas pessoas às quais quero prestar o meu agradecimento.

Agradeço ao Professor Abel Duarte, por ter acompanhado bem de perto todo o meu percurso académico, por ser o primeiro a acreditar em mim, por toda a orientação, pelo enorme conhecimento que me transmitiu, pela confiança que em mim depositou para a realização de determinadas tarefas, pelo incentivo e, sobretudo, pela disponibilidade. Foi sem dúvida um grande apoio na realização deste trabalho e todas as palavras serão insuficientes para demonstrar a minha gratidão e admiração.

Reconheço igualmente a dedicação da minha coorientadora, Doutora Felismina Moreira, pelo acompanhamento ao longo deste período, por se mostrar sempre disponível para ajudar a solucionar dúvidas que foram surgindo, por todas as sugestões de melhoria e por todas as palavras amigas de força e encorajamento.

Aos meus pais, irmão e irmã, por toda a amizade e carinho, por ouvirem os meus desabafos e por me apoiarem incondicionalmente, o meu sincero obrigado.

SUMÁRIO

O ácido levulínico (AL) tem sido alvo de muitos estudos por ser uma molécula de fácil produção via sintética e, mais recentemente, via processos envolvendo biomassas. O departamento de energia dos EUA, identificou o AL como uma plataforma de 12 potenciais químicos no conceito de biorrefinaria. A ampla gama do AL em possíveis produtos secundários, muitas aplicações nas industriais ou como um intermediário em química orgânica. Para além das largas dezenas de milhares de euros de custo de aquisição dos cromatógrafos, o reagente para uma determinação de AL tem um valor estimado de 1000 €. Desta forma, o objetivo deste trabalho é encontrar um método rápido, fácil e barato para a deteção e quantificação do AL, recorrendo para isso aos pontos de carbono (CDoT).

Os CDoT são aglomerados de átomos de carbono com dimensões de partícula inferiores a 100 nm e, apresentam propriedades notáveis de fluorescência, além disso, destacam-se pela sua baixa toxicidade, notável solubilidade em água e excelente biocompatibilidade. Recentemente, têm despertado considerável interesse como sensores para diversas substâncias analíticas de interesse. Neste contexto, a utilização de recursos naturais de baixo custo e renováveis não apenas satisfaz a necessidade de síntese em larga escala de CDoT, mas também incentiva desenvolvimento de aplicações sustentáveis.

A preparação de CDoT utilizando recursos naturais como plantas, oferece diversas vantagens, tornando-se uma escolha econômica, ecologicamente sustentável e amplamente acessível. Os resíduos estão prontamente disponíveis e são recursos naturais como matéria-prima para a produção de CDoT com diversas características e formas atrativas. Vários artigos de revisão estão agora disponíveis cobrindo a síntese, propriedades e aplicações de CDoT. No entanto, há literatura de revisão específica e focada discutindo CDoT derivados de resíduos para aplicações de sensor. Para preencher essa lacuna, apresentamos uma revisão do progresso na produção de CDoT a partir de resíduos de *Curcubita maxima* (conhecida popularmente como abóbora bolina) e *quantum dots* à base de cádmio-telúrio revestido por ácido mercapto propiónico (MPA). Destacamos os métodos de síntese e, em seguida, fornecemos uma visão geral de suas propriedades óticas, ressaltando seu potencial como sensores para a deteção do ácido levulínico. É importante notar que as tentativas de desenvolver um método colorimétrico rápido, econômico e confiável para a deteção do ácido levulínico têm sido desafiadoras. A estrutura pequena, simples, sem grupos funcionais que o pudesse diferenciar contribuíram para a dificuldade de encontrar um método analítico sequer qualitativo.

O objetivo de desenvolver um sensor econômico, ecologicamente amigável e de utilização simples usando CDoT mostrou-se inatingível. Além disso, foram realizados ensaios experimentais com quantum dots à base de cádmio e telúrio, mas também não foi possível obter um sensor eficaz para o AL.

Em resumo, nenhuma das metodologias testadas conseguiu produzir o sensor químico desejado para a deteção do ácido levulínico.

Palavras-chaves: Pontos de carbonos; sensor; biomoléculas; ácido levulínico

Abstract

The levulinic acid (AL) has been the subject of many studies because it is a molecule that is easy to produce synthetically and, more recently, via processes involving biomass. The US Department of Energy has identified AL as a platform for 12 potential chemicals in the biorefinery concept. AL's wide range of possible secondary products, many industrial applications or as an intermediate in organic chemistry. In addition to the tens of thousands of euros it costs to purchase chromatographs, the reagent for an AL determination has an estimated value of € 1,000. The aim of this work is therefore to find a quick, easy and inexpensive method for detecting and quantifying AL, using carbon dots (CDoT).

The CDoT are agglomerates of carbon atoms with particle sizes of less than 100 nm and have remarkable fluorescence properties. They also stand out for their low toxicity, remarkable water solubility and excellent biocompatibility.

The preparation of CDoT using natural resources such as plants offers several advantages, making it an economical, ecologically sustainable and widely accessible choice. Wastes are readily available and natural resources as raw materials to produce CDoT with various characteristics and attractive shapes. Several review articles are now available covering the synthesis, properties, and applications of CDoT. However, there is specific and focused review literature discussing waste derived CDoT for biosensor applications. To fill this gap, we present a review of progress in the production of CDoT from *Curcubita maxima* (popularly known as bolina squash) waste and cadmium-tellurium-based quantum dots coated with mercapto propionic acid (MPA). We highlight the synthesis methods and then provide an overview of their optical properties, highlighting their potential as biosensors for the detection of levulinic acid. It is important to note that attempts to develop a rapid, economical and reliable colorimetric method for the detection of levulinic acid have been challenging. The small, simple structure, with no functional groups that could differentiate it, contributed to the difficulty of finding even a qualitative analytical method.

The goal of developing an economical, ecologically friendly and simple-to-use sensor using CDoT proved to be unattainable. In addition, experimental tests were carried out with cadmium- and tellurium-based quantum dots, but it was not possible to obtain an effective sensor for LA either.

In summary, none of the methodologies tested succeeded in producing the desired chemical sensor for the detection of levulinic acid.

Key words: Carbon dots; sensors; biomolecules; Levulinic acid

Índice

1. Introdução	1
1.1 Enquadramento	1
1.2 Objetivo	3
1.3 Organização do relatório	3
2. Fundamentos teóricos	4
2.1 Matéria lignocelulósica	4
2.2 Ácido levulínico	7
2.2.1 Síntese do ácido Levulínico	9
2.2.2. Aplicação do ácido levulínico	10
2.2.3 Detecção do ácido levulínico	11
2.3 Pontos de carbonos	12
2.3.1 Métodos de síntese	14
2.3.2 A escolha do método de síntese	20
2.4 Mecanismo de fluorescência	24
3. Metodologia	29
3.1 Equipamentos	29
3.2 Reagentes	29
3.3. Parte experimental	30
3.3.1 Síntese do CDoT	30
3.3.2 Espectroscopia UV-Vis	31
3.3.3 Espectroscopia de fluorescência	31
3.3.4 Influência do pH	31
3.3.5 Detecção ao AL	31
4. Resultados	32
4.1 Síntese de CDoT	32
4.1.1 Otimização do tempo de síntese	33
4.1.2 Purificação dos CDoT	34
4.1.3 Análise dos fatores de diluição	37
4.2 Análise da reação do CDoT com AL	38
Conclusão	50
Sugestões para trabalhos futuros	51

Índice de figuras

Figura 2.1. Representação das ligações de ramificações da celulose. Adaptado de (Santos, 2012).	5
Figura 2.2. Estrutura da celulose formada por unidade de glicose. Adaptado de (Bevilaqua, 2010).	5
Figura 2.3. Hidrolise da celulose para formar unidades de glicose. Adaptado de (Bevilaqua, 2010)	6
Figura 2.4. Disposição dos compostos hemicelulose, celulose e lignina na parede celular. Adaptado de (Braga, 2018).....	6
Figura 2.5. Disposição dos compostos hemicelulose na parede celular. Adaptado de (Naidjonoka, 2020).....	7
Figura 2.6. Estrutura do ácido levulínico. Adaptado de (Bevilaqua, 2010)	7
Figura 2.7. Mecanismo proposto para conversão de glicose em ácido levulínico. Adaptado de (Bevilaqua, 2010).....	10
Figura 2.8. Formação dos derivados do AL para usar em aditivos alimentares. Adaptado de (Moronei, 2015).....	10
Figura 2.9. AL como uma plataforma química para outros produtos químicos e combustíveis. Adaptado de (Rackemann, 2011).	11
Figura 2.10. Métodos de síntese e as suas diferenças.....	13
Figura 2.11. Principais fontes de resíduos de biomassa. Adaptado de (Kang, 2020).....	14
Figura 2.12. Esquema de um sistema ultrassónico. Adaptado de (Lin, 2021).	15
Figura 2.13. Esquema de preparação e síntese de CDoT pelo método hidrotérmico. Adaptado de (Lin, 2021).....	16
Figura 2.14. Esquema de síntese de CDoT por ablação a laser. A – Irradiação de laser em pó de carbono; B – Multi parede de nanotubos de grafite para produzir CDoT; C – Síntese de CDoT a partir de biomassa; D - Preparação ultra-rápida e altamente eficiente de por ablação por laser pulsado de feixe duplo. Adaptado de (Cui, 2021).	17
Figura 2.15. Esquema experimental síntese de CDoT por solução de plasma. Adaptado de (Kim, 2020).....	17
Figura 2.16. Ilustração da síntese por oxidação eletroquímica. Adaptado de (Chen, 2018).	18
Figura 2.17. Síntese de CDoT assistida por micro-ondas com a metodologia bottom-up Adaptado de (Lin, 2021).....	19
Figura 2.18. Síntese de CDoT por micro-ondas assistida.	20
Figura 2.19. Caminho de reação para a formação do CDoT com o aumento do tempo. Adaptado de (Medeiros, 2019).	21
Figura 2.20. Ilustração da funcionalização do CDoT. Adaptado de (Chen, 2019).....	23
Figura 2.21. Diagrama geral de transições moleculares em compostos orgânicos e as principais transições eletrônica. Adaptado de (Lampman, et al. 2010).	25
Figura 2.22. Diagrama de energia dos possíveis mecanismos em um sistema fotoluminescente. Adaptado de (Skoog, et al. 2002)	26

Figura 2.23. Representação do tamanho do CDoT com seu comprimento de onda de emissão. Adaptado de (Sendão, 2019).....	27
Figura 2.24. Representação da emissão por CDoT aliada à emissão de impurezas, fluoróforos moleculares.....	27
Figura 25. Ilustração do plano de investigação.	29
Figura 26. Representação das etapas da síntese de CDoT.....	30
Figura 4.1.3. Zona ideal de trabalho com fator de diluição para CDoT derivado de abóbora bolina emitido a 511,43 nm.....	37
Figura 4.2.1. Espectro de emissão de pontos de carbonos derivado cucurbita maxima quando é excitado a 405 nm.	39
Figura 4.2.2. A-Espectro de emissão de CDoT em diferentes soluções tampão, excitado em 405 nm; B-Intensidade de fluorescência em diferentes soluções tampão, emitido a 511,43 nm.	40
Figura 4.2.3. Espectro de emissão de pontos de carbonos dopado com cromato quando é excitado a 405 nm.....	41
Figura 4.2.4. Espectro de emissão de pontos de carbonos dopado com dicromato quando é excitado a 405 nm.....	41
Figura 4.2.5. Espectro de emissão de pontos de carbonos dopado com cobre quando é excitado a 405 nm.....	42
Figura 4.2.6. Espectro de emissão de pontos de carbono dopado com L-cistina quando é excitado a 405 nm.....	43
Figura 4.2.7. Espectro de emissão de pontos de carbono dopado com dimetilglioximal quando é excitado a 405 nm.	43
Figura 4.2.8. Espectro de emissão de pontos de carbonos dopado com hexametilenotetramina quando é excitado a 405 nm.	44
Figura 4.2.9.1 Espectro de emissão de pontos de carbonos dopado com curcumina quando é excitado a 405 nm.....	45
Figura 4.2.9.2. Precipitação do ácido levulínico com pontos de carbonos funcionalizados com curcumina.	45
Figura 4.2.10. Espectro de emissão de CDoT dopado com dimetilglioxima, excitado a 405 nm. Legenda: CDoT-dmH2 –ponto de carbono derivado de curcumina dopado com dimetilglioxima.....	46
Figura 4.2.11. A- Espectro de emissão de CDoT dopado com dimetilglioxima com adição de diferentes ácidos em equimolar, excitado a 405 nm; B- Intensidade de fluorescência do dmH2-CDoT com adição de ácidos, emitido a 511,43 nm. Legenda: CDoT- dmH2 – Ponto de carbono dopado com curcumina e dimetilglioxima.	47
Figura 4.2.12.1. Espectro de emissão de QdoT de Cádmio-telúrio revestido com TGA quando é excitado a 405 nm.	48
Figura 4.2.12.2. Precipitação do ácido levulínico com QdoT de cádmio- telúrio revestido com TGA.	48
Figura 4.2.13. A - Espectro de emissão de MPA em diferentes concentrações de AL, excitado em 405 nm; B-Intensidade de fluorescência do MPA em diferentes concentrações de AL, emitido a 611,36 nm. Legenda: AL – Ácido levulínico.....	49
Figura 4.2.14. Intensidade de fluorescência do MPA com adição de ácidos H ₂ SO ₄ , HNO ₃ , HCl e AL, emitido a 619,8 nm. Legenda: MPA – Quantum dots de Ácido mercapto propiónico; H ₂ SO ₄ – Ácido sulfúrico; HNO ₃ – Ácido nítrico; AL- Ácido levulínico.	49

Índice de tabelas

Tabela 2.1. Propriedades físicas do ácido levulínico. Adaptado de (Bevilaqua, 2010).	8
Tabela 2.2. Valor de material e reagentes necessário para determinar AL por cromatografia líquida de alto desempenho.	12
Tabela 2.3. Limites de quantificação e detecção do ácido levulínico.	12
Tabela 2.4. Diferentes fontes de biomassa para realizar a síntese de CDoT por micro-ondas.....	14
Tabela 2.5. Visão geral dos diferentes métodos de síntese de CDoT.....	19
Tabela 2.6. Propriedades físicas de substâncias à temperatura de 30 °C.....	20

Nomenclatura

5-HMF - Hidroximetilfurfural

AL – Ácido Levulínico

CadTe – Quantum dots de cádmio-telúrio

CDoT - Pontos de carbonos

CE – Comissão Europeia

CE- Comissão Europeia

Cis-CDoT- Pontos de carbono dopado com L-cistina

Cr2-CDoT-Pontos de carbono dopado com dicromato de potássio

Cr-CDoT- Pontos de carbono dopado com cromato de potássio

Cu-CDoT – Pontos de carbono dopado com sulfato de cobre

Curc-CDoT- Pontos de carbono dopado com curcumina

DEG – Dietilenoglicol

dmH2-CDoT- Pontos de carbono dopado com dimetilglioxima

HMT-CDoT – Pontos de carbono dopado com hexametilenotetramina

MPA – Ácido mercapto propiónico

ODS- Objetivos Desenvolvimento Sustentável

ONU- Organização das Nações Unidas

QDoT – *Quantum dots*

QY- Rendimento quântico

Rpm- Rotação por minuto

TGA- Ácido tioglicólico

UE – União Europeia

1. Introdução

A tese apresentada foi desenvolvida no âmbito de obtenção do grau de Mestre em Ciências de Biorrecursos e foi realizado no Instituto Superior de Engenharia do Porto, juntamente com o laboratório LabRise, tendo por objetivo o desenvolvimento de uma metodologia para a identificação e quantificação da molécula ácido levulínico (AL).

Esta tese teve a foi realizada entre o período de 4 de outubro de 2020 e 4 de setembro de 2023 (cerca de 3 anos letivo).

A tese foi realizada no Departamento de Engenharia Química - ISEP e no laboratório LabRise.

1.1 Enquadramento

A exploração dos recursos naturais do planeta é fundamental para a sobrevivência do ser humano. Os estoques destes materiais, apesar de parecerem abundantes e infinitos, são escassos e, se usados de forma excessiva e desmedida, irão se esgotar. Pesquisadores alertam que o esgotamento destas fontes pode levar a uma extinção em massa, no qual 75 % das espécies do planeta simplesmente deixarão de existir. Assegurar uma produção e consumo responsáveis é um dos objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS) das Nações Unidas o qual a União Europeia (UE) se comprometeu. Um volume crescente de literatura tem demonstrado que os fluxos de comércio global são os principais contribuintes para os impactos ambientais do consumo. De facto, os países desenvolvidos importam combustíveis e outros recursos dos países em desenvolvimento, transferindo uma parcela significativas dos encargos ambientais relacionados com o consumo de bens para fora das suas fronteiras (Corrado, 2020).

Abordar a sustentabilidade ambiental da produção e do consumo é um desafio fundamental na agenda política global. Várias iniciativas e políticas destinadas a reduzir os impactos ambientais exortam a uma transformação radical dos padrões de produção e consumo (Corrado, 2020).

Ao adotar, na Conferência das Nações Unidas sobre ODS Rio+20 em 2012 (Nações Unidas (ONU), 2012), o Quadro de Programas de 10 anos sobre padrões de consumo e produção sustentáveis, os líderes globais reconheceram a importância de tomar medidas e mudar as formas de produção e consumo, a fim de alcançar um ODS global. Isto também foi destacado no objetivo de ODS da ONU (ONU, 2015), que visava assegurar padrões de consumo e produção sustentáveis e responsáveis. A Comissão Europeia (CE) comprometeu-se a integrar plenamente os ODS no quadro político da UE e nas prioridades da UE, avaliando o estado atual e identificando as preocupações de sustentabilidade mais relevantes (CE, 2016). O progresso no sentido de padrões de consumo e produção sustentáveis não diz respeito apenas às atividades internas da UE, uma vez que o consumo é uma força motriz de várias atividades que ocorrem fora das fronteiras da UE. A Comunicação "Comércio para todos" (CE, 2015) apoia a transição para uma política comercial e de investimento mais responsável, enquanto o sétimo plano de ação ambiental (7º PAA) (CE, 2013) salienta a necessidade de reduzir os impactos ambientais causados pelo consumo da UE para além das fronteiras da UE.

A perda e o desperdício de alimentos são ameaças graves para a sustentabilidade dos nossos sistemas alimentares. De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) cerca de um terço da produção mundial de alimentos para consumo humano, cerca de 1,3 mil milhões de toneladas, é perdido ou desperdiçado (FAO, 2011).

Recentemente, os governos estão a começar a demonstrar uma crescente consciencialização e a implementar políticas alimentares para resolver este problema. Os decisores políticos, as indústrias alimentares e os retalhistas, os investigadores e as organizações não governamentais estão a trabalhar em conjunto para promover um movimento social no sentido de uma maior valorização dos alimentos e de minimizar o desperdício alimentar global e os seus impactos. O primeiro passo para uma política alimentar eficaz consiste em identificar e quantificar o tipo de resíduos. Os termos perdas e desperdícios alimentares são frequentemente utilizados de forma indistinta, mas alguns estudos tentaram diferenciá-los com base nas fases de uma cadeia de abastecimento alimentar. As perdas de alimentos podem ser definidas como os alimentos descartados (produzidos para consumo humano) nas fases de produção, pós-colheita e processamento da cadeia de abastecimento alimentar e quando são descartados pelos utilizadores finais ao nível do retalho e do consumo, podem ser designados como “resíduos” alimentares (FAO, 2017).

O termo "desperdício alimentar" inclui os restos de alimentos gerados na produção agrícola, no manuseamento e armazenamento pós-colheita, no processamento posterior dos alimentos, na distribuição do comércio grossista e retalhista, nas cozinhas dos grandes consumidores e nos agregados familiares (Ojha *et al*, 2020).

Durante a produção agrícola, as perdas podem resultar de danos mecânicos e/ou derrames durante a operação de colheita; por exemplo, debulha, apanha de fruta, etc. As perdas no manuseamento e armazenamento pós-colheita incluem o derrame e a degradação durante o manuseamento, o armazenamento e o transporte entre a exploração agrícola e a distribuição. Além disso, a transformação industrial ou doméstica de alimentos também gera perdas durante várias operações unitárias, incluindo a triagem, a lavagem, o descasque, o corte e a cozedura, ou devido a falhas e acidentes nas linhas de processamento. A distribuição de alimentos nos mercados grossistas, supermercados e retalhistas também gera perdas e desperdício de alimentos. O último nível da cadeia de valor é o do consumo, que inclui perdas e desperdícios em casa ou nos restaurantes/restaurantes. Os nossos atuais hábitos de produção e consumo de alimentos são insustentáveis. O conceito de economia circular pode oferecer ferramentas para melhorar e otimizar a sustentabilidade de um sistema alimentar. Um ciclo alimentar sustentável pode ter cinco fases: produção de alimentos, transformação, distribuição, consumo de alimentos e gestão de resíduos alimentares (Wunderlich e Martinez, 2018). Se cada uma destas etapas for gerida corretamente, é possível alcançar a sustentabilidade global do ciclo alimentar. O objetivo da alimentação sustentável (Ojha *et al*, 2020).

Vários investigadores, bancos alimentares, agências governamentais e não governamentais propõem e implementam estratégias inovadoras para resolver o problema do desperdício alimentar. O cerne destas estratégias baseia-se nos três R's da gestão de resíduos - Reduzir, Reutilizar e Reciclar. Sendo assim, o uso de resíduos alimentares como uma fonte de reaproveitamento e alternativa à produção de novos produtos e/ou químicos por via biológica tem ganhado interesse nas indústrias de biotecnologia e biorrefinaria (Ellis, 2019).

O ácido-4-oxopentanóico ou ácido levulínico (AL), tem sido alvo de muitos estudos por ser uma molécula de fácil produção via sintética e, mais recentemente, via processos envolvendo biomassas. O processo inicia com a hidrólise de um carboidrato por uma catalise ácida para obter a glucose por hidrólise, uma reação de primeira ordem com sucessivas etapas de desidratação, o 5-HMF é um intermediário formado que, posteriormente, passa por um processo de hidratação e clivagem dando origem ao AL e ácido fórmico em quantidades molares iguais. Os métodos analíticos normalmente usados para a deteção e quantificação do AL são dispendiosos, como por cromatografia líquida de alto

desempenho, devido a quantidade de reagente a serem utilizados e as condições necessárias para realizar a análise.

1.2 Objetivo

O objetivo deste estudo é desenvolver um método de detecção e quantificação do Ácido Levulínico (AL) que seja simples e economicamente viável. Para alcançar esse propósito, recorreu-se aos Biorrecursos para sintetizar nanopartículas pontos de carbonos, conhecidas como CDoT que funcionam como sensores químicos para a detecção do AL. A metodologia escolhida para a detecção e quantificação do sensor à base de CDoT foi a fluorescência.

1.3 Organização do relatório

A presente dissertação encontra-se dividida em seis capítulos. O primeiro reflete a contextualização do tema abordado, apresenta os principais objetivos e uma breve caracterização do tema da tese bem como o local onde o projeto foi desenvolvido.

O segundo capítulo contempla os fundamentos teóricos que permitiram conhecer melhor a característica químicas da biomassa e onde deve ser aplicada. Além disso, descrevem-se e caracterizam-se os processos de síntese do AL. Apresentam-se a aplicação, dando maior ênfase às áreas onde ocorre a produção. Apresenta-se, ainda, o valor monetário de uma análise de detecção do ácido levulínico, a análise de tendência no mercado e o seu valor comercial.

No terceiro capítulo, são descrito a metodologia do plano experimental bem como a descrição da preparação da amostra e dos métodos experimental.

No quarto capítulo, são apresentados os resultados dos estudos de otimização, incluindo o tempo de síntese, o método de purificação de CDoT mais económico e, por fim os resultados de análise de CDoT aplicado como sensor de AL.

No último capítulo, são destacadas as conclusões do trabalho realizado, os resultados obtidos na otimização de síntese de CDoT assistida por micro-ondas, os resultados dos sensores com AL e algumas sugestões para trabalhos futuros.

2. Fundamentos teóricos

Nos últimos anos tem se verificado um interesse crescente na utilização de matérias-primas renováveis para a produção de químicos verdes, alternativas derivadas de petróleo. Contudo, no presente, a indústria alimentar gera grandes quantidades de desperdícios, nomeadamente fruta e legumes bons que devido a várias circunstâncias da cadeia de distribuição, acabam em resíduos. Embora a enorme quantidade de resíduos gerados seja de grande preocupação e acarrete graves prejuízos para o meio ambiente. Há uma estimativa que o desperdício alimentar dos agregados familiares, dos estabelecimentos de retalho e da indústria de serviços alimentares totaliza 931 milhões de toneladas por ano e em Portugal é de 861 838 toneladas por ano (Nairobi, 2021). Deste modo, é de extrema importância maximizar o seu aproveitamento, o que por sua vez pode constituir uma verdadeira solução ambiental.

Entre os recursos renováveis, a biomassa surge como uma importante alternativa para desenvolver tecnologias de geração de energia, e de subprodutos da indústria química. Novos estudos demonstram que a utilização dos resíduos orgânicos gerados terá um papel primordial no futuro como fonte de substâncias químicas. Estes resíduos por sua vez contribuirão para a criação de novas plataformas de bio produtos como alternativa de redução das emissões de dióxido de carbono (Bevilaqua, 2010). Nesse aspeto, o AL tem um papel importante neste segmento, devido à sua versatilidade como matéria-prima para a produção de diversos bio produtos, tais como: ácido pentanóico, usado como precursores de poliésteres e em resinas e, também a hidrogenação do AL em metiltetra-hidrofurano pode ser utilizado como aditivo em gasolina (Santana, 2020).

A grande vantagem na utilização de produtos derivados de biomassa decorre desta matéria-prima ser abundante, renovável e apresenta baixo valor agregado, ou seja, na maioria das vezes não teria um destino adequado, mas pode ser utilizado agora como fonte de carbono. Desta forma, evitam-se, graves prejuízos ambientais face ao desequilíbrio gerado pelo descarte inadequado desta matéria-prima (Santana, 2020).

A matéria-prima lignocelulósica é uma biomassa predominantemente composta de um complexo composto de estruturas de carboidratos, celulose (38-50 %), hemicelulose (23-32 %) e lignina (15-25 %) (Kamm B, *et al.* 2013).

O objetivo deste trabalho é desenvolver um método de detecção e quantificação do AL que seja simples e economicamente acessível. Para esse propósito, recorreu-se aos biorrecursos para sintetizar nanopartículas, CDoT. A fim de desenvolver sensores químicos do AL o método escolhido para detetar e quantificar o sensor feitos à base de CDoT é a fluorescência.

2.1 Matéria lignocelulósica

A matéria orgânica lignocelulósica é predominantemente composta por cadeias poliméricas de lignina, hemicelulose e celulose. Essas três estruturas polimérica estão ligadas entre si por ligações covalentes as quais originam uma rede resistentes a ataques microbianos, Figura 2.1. As fibrilas da

fração celulósica, um polissacarídeo composto por monómeros de glicose, assumem uma disposição espiral, de forma a conferir força e flexibilidade ao material. A fração celulósica encontra-se envolvida pela lignina, polímero aromático heterogêneo formado por ligações éter biologicamente estáveis, cuja função é aumentar a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos. A última, mas principal fração é a hemicelulose, que atua como um elo químico entre a celulose e a lignina, apresenta-se como uma estrutura ramificada e formada, principalmente, por unidades de pentoses (xilose, raminose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e radicais de acetilo (Lengoskwi, 2013).

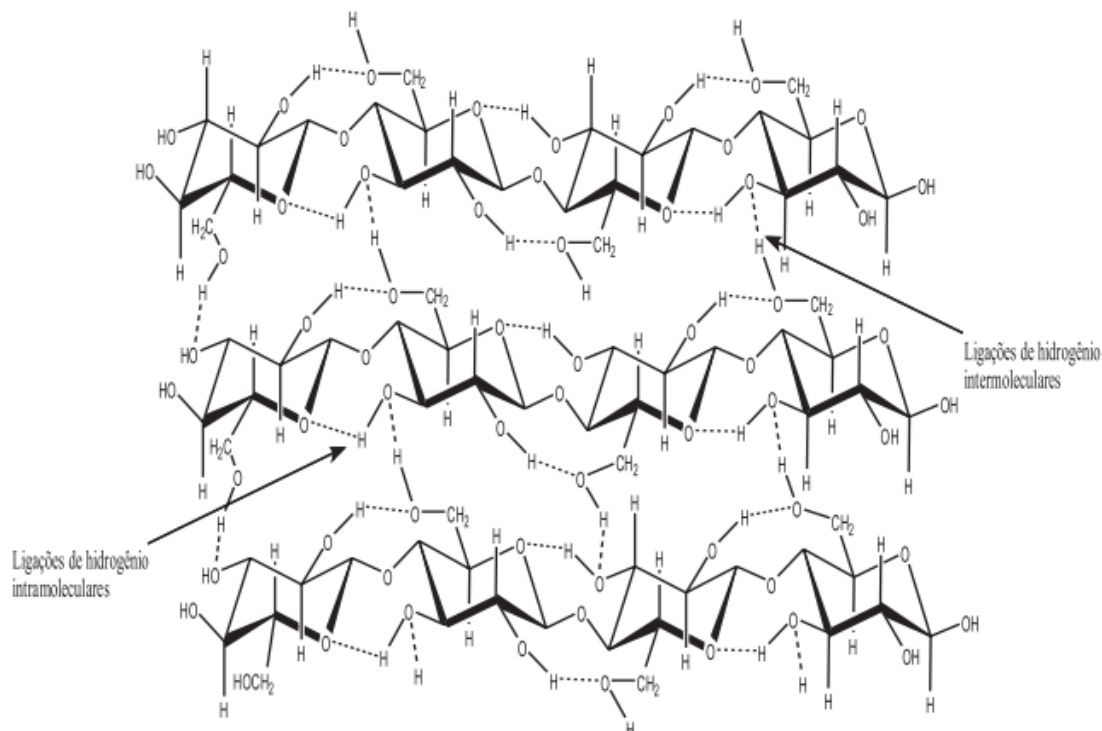


Figura 2.1. Representação das ligações de ramificações da celulose. Adaptado de (Santos, 2012).

A celulose é uma estrutura molecular $(C_6H_{10}O_5)_n$ formada por unidades de glicose, através de ligações químicas do tipo $\beta 1 \rightarrow 4$, como mostra a Figura 2.2 (Meschede, 2012).

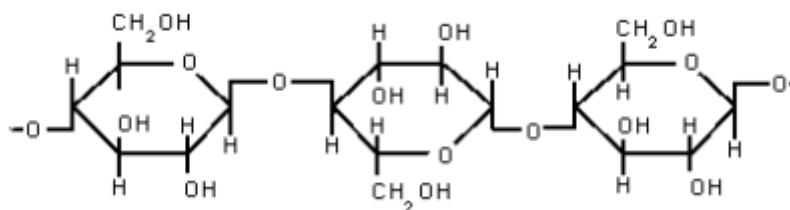


Figura 2.2. Estrutura da celulose formada por unidade de glicose. Adaptado de (Bevilaqua, 2010).

O grau de polimerização da celulose pode ser da ordem de 7000 a 10 000 monómeros por cadeia, o que lhe confere elevada massa molecular (Bevilaqua, 2010).

O polímero linear de celulose está associado através das ligações de hidrogênio que são responsáveis pela formação das fibras de celulose. Desta forma, as cadeias de celulose formam ligações de hidrogênio intramoleculares, entre grupos hidroxila da mesma cadeia e intermoleculares, ou seja, entre os grupos hidroxilas de cadeias adjacentes (Barud, 2006).

A hidrólise da celulose em meio ácido leva à liberação de monómeros de glicose, Figura 2.3.

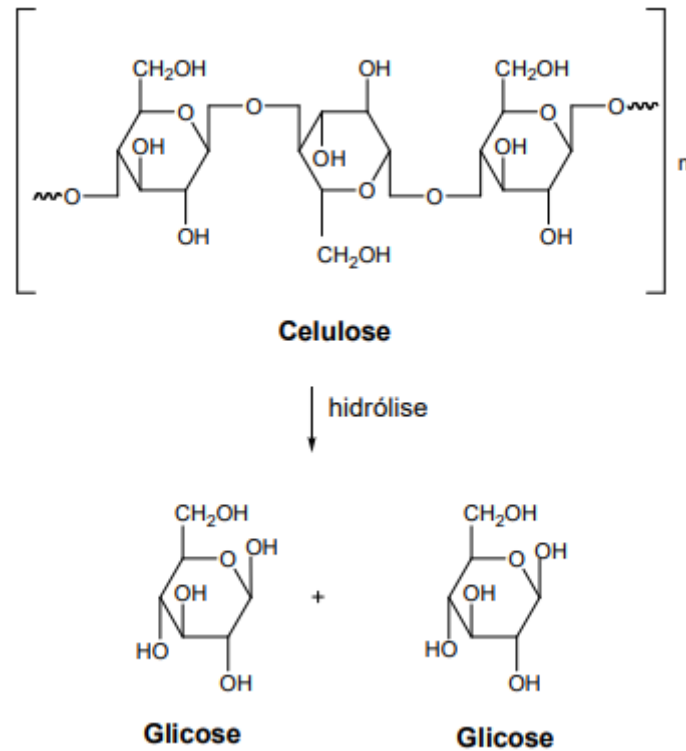


Figura 2.3. Hidrólise da celulose para formar unidades de glicose. Adaptado de (Bevilaqua, 2010)

A lignina é um bio polímero constituído por unidades de compostos aromáticos com estrutura amorfa e tridimensional, formado por polimerização oxidativa, Figura 2.4. A lignina, confere rigidez na parede celular e resistência a estresse biótico e abiótico, ou seja, apresenta-se como uma barreira de defesa física e química, dificultando o ataque de microrganismo fito patogénicos e confere rigidez à estrutura, por isso, usamos madeira para construir movéis, casas. A lignina está presente em diferentes partes biomassa vegetal, tais como, folhas, caule, casca e raízes (Meschede, 2012).

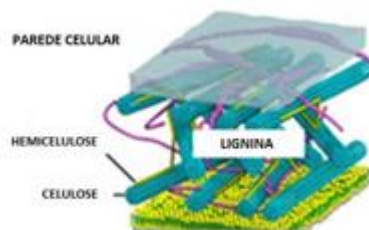


Figura 2.4. Disposição dos compostos hemicelulose, celulose e lignina na parede celular. Adaptado de (Braga, 2018)

A hemicelulose, Figura 2.5, é um bio polímero amorfo, geralmente formadas de 2 a 6 moléculas de carboidratos diferentes, unidos por ligações do tipo β -1,4 (Braga, 2018).

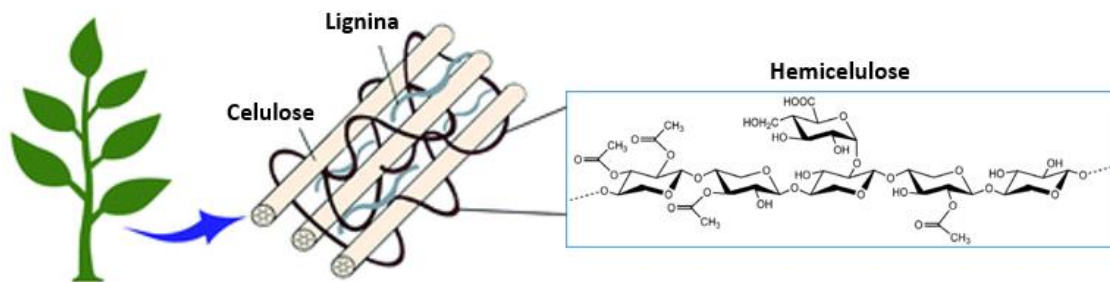


Figura 2.5. Disposição dos compostos hemicelulose na parede celular. Adaptado de (Naidjonoka, 2020)

Podemos afirmar que as hemiceluloses são moléculas menores que a celulose, formadas principalmente por xilose, arabinose, galactose, manose e ramnose (Braga, 2018).

Atualmente, a maior parte das necessidades de energia e a grande maioria dos produtos sintéticos e químicos são provenientes de combustíveis fósseis, devido à sua oferta abundante e custo relativamente baixo. Eventualmente, a utilização de recursos fósseis se tornará insustentável devido ao aumento e modernização da população mundial, preços crescentes e depleção dos recursos fósseis disponíveis e pressões ambientais (devido a emissões de gases tóxicos). A biomassa é o único recurso renovável de carbono fixo, que é essencial para a produção de combustíveis líquidos de hidrocarbonetos e produtos químicos (Rackemann, *et al.* 2011).

A natureza produz mais de 150 bilhões de toneladas de biomassa por ano por fotossíntese, com apenas 3 a 4 % utilizado por humanos para fins alimentares e não alimentares. Os resíduos agrícolas e florestais de baixo valor, gramíneas e culturas energéticas são fontes preferidas de biomassa para a fabricação produtos do ponto de vista técnico e socioeconômico. Atualmente, uma quantidade substancial de pesquisas está sendo realizada em todo o mundo para identificar transformações químicas atraentes da biomassa em massa produtos químicos orgânicos. O *National Renewable Energy Laboratory* (Denver, EUA) identificou o AL como um dos vários produtos químicos de plataforma derivados que podem ser produzidos a partir de biomassa (Rackemann, *et al.* 2011).

2.2 Ácido levulínico

O AL tem sido alvo de muitos estudos por ser uma molécula de fácil produção via sintética e, mais recentemente, via processos envolvendo biomassas, Figura 2.6.

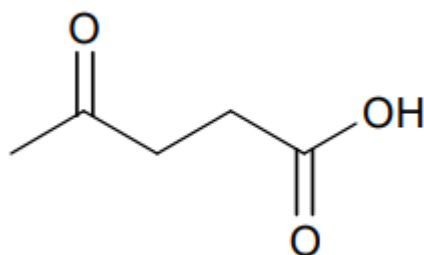


Figura 2.6. Estrutura do ácido levulínico. Adaptado de (Bevilaqua, 2010)

O AL é uma molécula com 5 carbonos de estrutura linear contendo um grupo ácido carboxílico na posição 1 e um grupo carbonila na posição 4. Este ácido foi descrito por Freiherrn von Grote e Tollens em 1875. Os autores deste estudo obtiveram o ácido por aquecimento do açúcar com ácido concentrado, dissolvido em água durante muitos dias. Durante o processo, notaram a formação de ácido fórmico e água, bem como a produção de uma considerável quantidade de humina. Os autores deram o nome desta

substância de AL porque a rotação levógiro da frutose, chama-se levulose e foram o reagente da reação do ácido gerado (Kamm B, *et al.* 2013).

Embora, a importância do AL como um químico intermediário para a indústria tenha sido reconhecida devido à notável reatividade excepcional do grupo cetona e carbonilo e a alta reatividade das lactonas (γ -valerolactona e α -valerolactona), o AL nunca foi comercialmente produzido em grandes volumes. Desde 1956, AL tem sido considerado como uma plataforma química de alto potencial. Contudo, o custo intensivo de produção que procede através a desidratação das hexoses, formação do 5-HMF e posterior a clivagem de uma mole de ácido fórmico fez com que impedisse a possibilidade de competitividade do ácido levulínico no mercado por ser um intermediário químico derivado da matéria-prima fóssil. Em 1970, a comunidade química teve em atenção o AL como uma matéria-prima, todavia, no final do século XX o AL demonstrou uma alternativa de custo-eficiência a partir da biomassa e isto ganhou atenção por ser um processo de biorrefinaria e fez com que resolvesse o problema de matérias-primas onerosas, baixo rendimento, custo excessivos de equipamentos de produção e, também permitiu ter uma fácil recuperação e tratamento (Kamm B; *et al.* 2013).

O departamento de energia dos EUA, identificou o AL como uma plataforma de 12 potenciais químicos no conceito de biorrefinaria. A ampla gama do AL em possíveis produtos secundários, muitas aplicações nas industriais ou como um intermediário em química orgânica, tem sido um esforço intensivo de pesquisa durante décadas. Desta forma, foram desenvolvidas novas rotas de síntese de compostos químicos de relevância para as indústrias, especificamente para aplicação como solventes, monómeros e aditivos para combustíveis (Kamm B, *et al.* 2013).

O preço de venda do AL diminuiu aproximadamente de 12 a 8 €/kg em 454 toneladas de produção anual em 2005 para 3 €/kg e, atualmente custa entre 5 a 7 €/kg. Os Projetos económicos indicam que aplicação de processos de biorrefinaria faz com que o custo de produção de AL pode diminuir de 0,07 a 0,2 €/kg dependendo da escala de operação (Kamm B, *et al.*).

Este ácido de baixa massa molecular é altamente polar e como consequência é compatível com solventes como água, etanol, cetona, aldeído, ácidos orgânicos, ésteres e éteres (Bevilaqua, 2010).

Algumas das principais propriedades físicas do AL são mostradas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Propriedades físicas do ácido levulínico. Adaptado de (Bevilaqua, 2010).

Propriedades físicas	Valores	Referências
Fórmula	$C_5H_8O_3$	Bevilaqua, 2010
Massa molar	116,11 g/mol	
pK _a	4,59	
Ponto de fusão	37 °C	
Ponto de ebulição	246 °C	
Índice de refração (20 °C)	1,1447	
Densidade	1,14 g/cm ³	
Tensão superficial (25 °C)	39,7 mN.m ⁻¹	
$\Delta_{vap}H$	74,4 kJ.mol ⁻¹	NIST, 2022
$\Delta_{fus}H$	9,20 kJ.mol ⁻¹	Dos Santos, 2015
Potencial de redução	-1,3 V	

O AL é o principal produto gerado a partir da hidrólise da glicose, no entanto, na reação de degradação da glicose também é gerado 5-HMF, um produto intermediário da reação.

2.2.1 Síntese do ácido Levulínico

O AL é atualmente produzido por via petroquímica utilizando hidrólise e hidrogenação de anidrido maleico ou álcool furfurílico. Entende-se que estas vias são complexas e causa um preço elevado no mercado e também aumenta a poluição ambiental (Morone, 2015). A falta de produção comercial em larga escala é principalmente atribuída aos elevados custos das matérias-primas necessárias para sua síntese. A produção em alta pureza do AL normalmente requer uma rota de conversão petroquímica, que envolve o uso de compostos como anidrido maleico ou a hidrólise do álcool furfurílico. Esses processos são dispendiosos e contribuem para tornar o AL menos competitivo como um produto químico intermediário (Rackemann, 2011).

Um provável mecanismo para a reação de formação de 5-HMF e de AL por hidrólise de matéria orgânica que está sugerido no esquema da Figura 2.7. O AL é o principal produto a partir da hidrólise da glicose, no entanto, na reação de degradação da glicose é gerado 5-HMF, como um produto intermediário (Bevilaqua, 2010).

A produção do AL a partir da biomassa pode ter duas rotas de síntese: A primeira rota pode ser por tratamento ácido da glucose, frutose, manose ou galactose a partir de polímeros de carboidratos tais como celulose, hemicelulose, amido ou mono e dissacarídeos por via de formação de D-frutose e 5-HMF. A segunda rota pode ser por tratamento ácido de pentoses tais como xilose e arabinose a partir de hemicelulose que produz o furfural e de seguida por redução catalítica para álcool furfúril e subsequente abertura do anel na água (Kamm B, *et al.* 2013).

O AL pode ser obtido por aumento de temperatura sem ocorrer a reação de frutose com nenhum tipo de ácido. No entanto, a produção do AL ocorre a formação de 5-HMF o que faz com que o rendimento da reação e a velocidade de reação depende da natureza do catalisador, a sua concentração, temperatura e pressão (Kamm B, *et al.* 2013).

Muitos estudos da cinética na produção de AL a partir da glucose revelam que a reação não é completamente compreendida e muitas reações intermediárias são identificadas. Por exemplo: O processo inicia com a hidrólise de um carboidrato por uma catalise ácida para obter a glucose, o 5-HMF é um intermediário formado a partir de D-frutose por uma reação de primeira ordem via sucessivas etapas de desidratação e 5-HMF passa por um processo de hidratação e clivagem dando origem ao AL e ácido fórmico e quantidades molares iguais (Kamm B, *et al.* 2013).

Nos passos de síntese do AL é comum ocorrer a formação de humina e uma alta taxa de decomposição da glucose que é favorecida em altas temperaturas; o aumento da formação de 5-HMF ocorre com o aumento da temperatura e concentração do ácido (catalisador); O aumento da seletividade da formação do AL ocorre com o aumento da acidez em baixa temperatura, aproximadamente 100 °C, através do qual, muitos ácidos diferentes são encontrados na atividade do catalisador que é utilizado. Por exemplo, o catalisador ácido clorídrico é 12 vezes mais ativo do que ácido sulfúrico, mantendo uma proporção de seletividade, enquanto o ácido fosfórico é muito fraco para ser aplicado como catalisador (Tarabanko, 2002).

Uma via alternativa para a síntese de AL é a hidrólise de biomassa lignocelulósica, Figura 2.2 e Figura 2.3, tornando-o um químico verde e minimiza os problemas ambientais em processo Biorrefinaria, Figura 2.7.

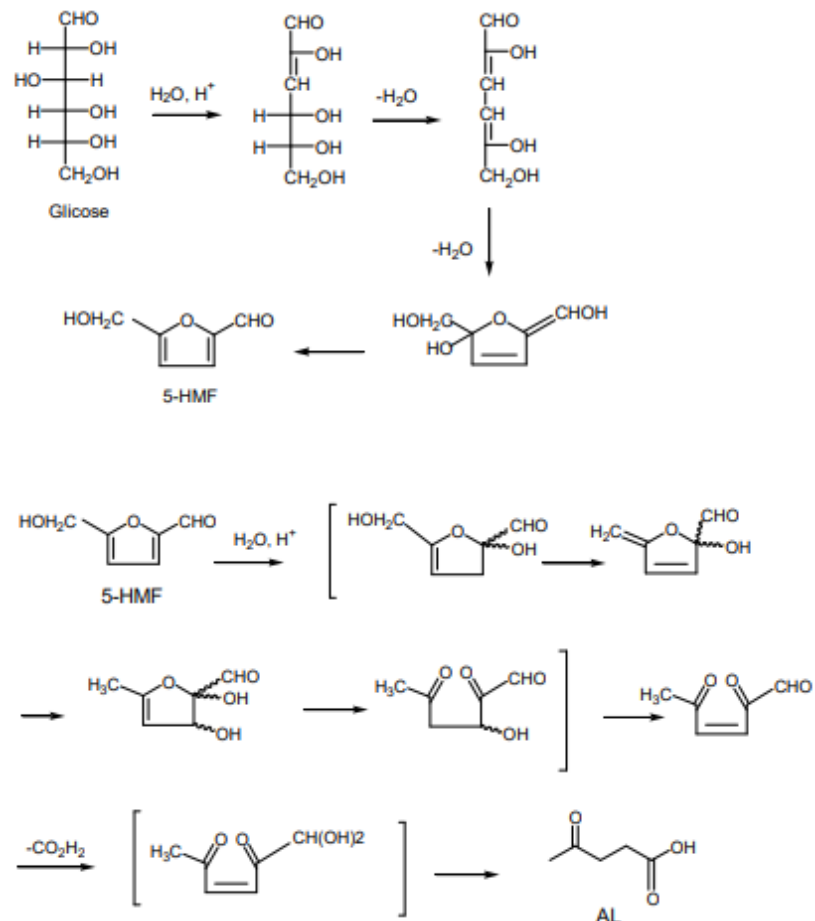


Figura 2.7. Mecanismo proposto para conversão de glicose em ácido levulínico. Adaptado de (Bevilaqua, 2010).

2.2.2. Aplicação do ácido levulínico

O AL é uma molécula com inúmeras possibilidades de aplicação, tal como se pode verificar na Figura 2.8 serve para produção de aditivos alimentares, por exemplo.

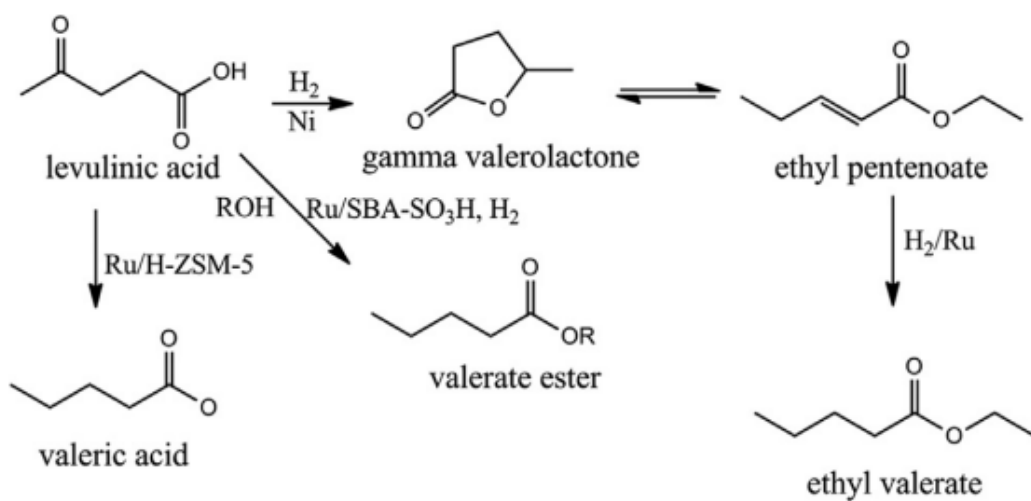


Figura 2.8. Formação dos derivados do AL para usar em aditivos alimentares. Adaptado de (Moronei, 2015).

Conforme previamente mencionado, o AL não tem sua utilização limitada ao campo dos combustíveis, ele também pode ser utilizado na produção de monômeros para posterior polimerização em produtos derivados de petróleo, herbicidas, resinas e solventes entre outros que estão resumidos na Figura 2.9.

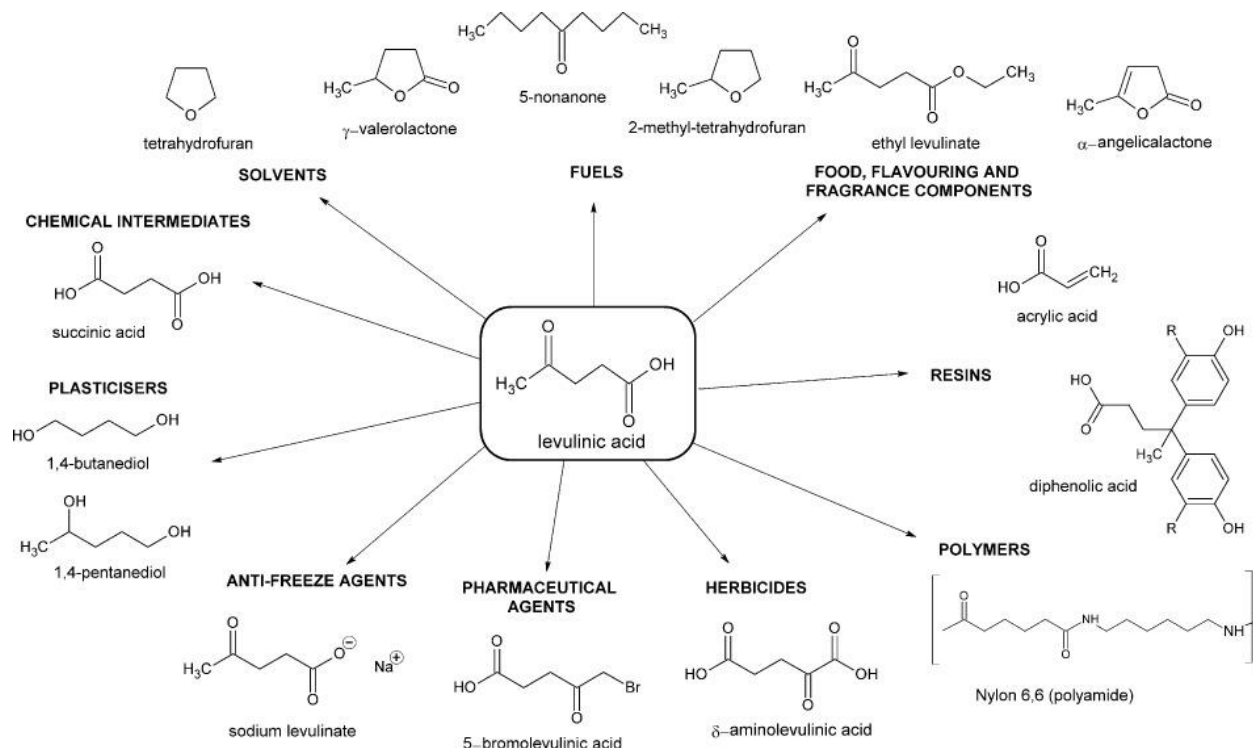


Figura 2.9. AL como uma plataforma química para outros produtos químicos e combustíveis. Adaptado de (Rackemann, 2011).

2.2.3 Detecção do ácido levulínico

Os métodos analíticos normalmente usados para a detecção e quantificação do AL são dispendiosos, como por cromatografia líquida de alto desempenho, devido a quantidade de reagente a serem utilizados e as condições necessárias para realizar a análise para além do elevado investimento no equipamento. No entanto, é de realçar que o AL é uma com uma estrutura molecular muito simples e sem grandes grupos funcionais, fazendo com que se torne difícil de a especificar e faz com que recorrem a uso de cromatografias. Mesmo os estudos por cromatografia líquida de alto desempenho em amostras reais e com diagramas cronológicos muito bem elaborados.

Para termos uma noção dos custos dispendiosos, uma das características de um equipamento de cromatografia líquida de alta performance para determinar AL são: O comprimento de onda de 270 nm e uma coluna C18 ((150×4) mm×3 μ m), fase móvel sendo uma mistura de água: acetonitrilo 97:3 (v/v) (ambas as fases são modificadas com a adição de 0,1 % de ácido fórmico), usando o modo isocrático e 0,6 ml.min⁻¹ e com volume de injeção de 20 μ l (Bevilaqua, 2013).

Para além das largas dezenas de milhares de euros de custo de aquisição da coluna de cromatografia e os reagentes para determinação de AL têm um valor estimado de 977,70 €, Tabela 2.2. No entanto, tanto a cromatografia líquida de alto desempenho como a cromatografia gasosa originam resultados para o AL com bons limites de detecção e quantificação, Tabela 2.3.

Tabela 2.2. Valor de material e reagentes necessário para determinar AL por cromatografia líquida de alto desempenho.

Material / Reagente	Valor monetário	Bibliografia
5-HMF \geq 99,9 %	55,10 €/g	Sigma Aldrich, 2023
AL 98 %	21,10 €/50 g	
Acetonitrilo \geq 99,9 %	81,50 €/100 ml	
Coluna ((150×4) mm×3 μ m)	C18 820,00 €	Waters, 2023

Tabela 2.3. Limites de quantificação e detecção do ácido levulínico.

Equipamento	Limite Detecção	Limite Quantificação	Referência
Cromatografia líquida de alto desempenho	2,5 mg.L ⁻¹	8,3 mg.L ⁻¹	Bevilaqua, 2013
Cromatografia gasosa	0,25 mg.L ⁻¹	10 μ g.ml ⁻¹	Wang, 1999

Desta forma, o objetivo deste trabalho visa encontrar um método fácil, simples e economicamente viável para a detecção e quantificação do AL. Para alcançar esse objetivo, planeasse utilizar CDoT para a detecção do AL. Além disso, pretendesse recorrer aos polímeros de impressão molecular (MIPs) como elemento de reconhecimento da molécula alvo, utilizando-os como plataforma sensora de transdução de sinal ótico. Essa abordagem visa proporcionar um método mais acessível e eficiente para a detecção e quantificação do AL.

2.3 Pontos de carbonos

O CDoT são nanopartículas de composição essencialmente de carbono que possuem propriedades óticas e eletrônicas bastante benéficas, como por exemplo, uma alta luminescência, absorção ótica de banda larga, baixa toxicidade, produção simples, baixo custo, e elevada estabilidade fotoquímica. Os CDoT são quimicamente inertes e apresentam boa solubilidade em água. Normalmente, são tipicamente dimensionados entre 1 e 10 nm, embora possam ser sintetizados com tamanhos maiores (Sendão, 2019).

Os CDoT apresentam uma forma geralmente esférica ou quase esférica com um núcleo que pode ser amorfo ou cristalino, dependendo da origem das nanopartículas. Essas partículas são frequentemente descritas como tendo um núcleo composto por regiões amorfas ou cristalinas com grupos funcionais na superfície. O núcleo das partículas é predominantemente composto por carbono gráfico sp² ou por folhas de óxido de grafeno ou grafeno interligadas por átomos de carbono sp³ no meio, organizados numa estrutura diamantífera (Sendão, 2019). Sobre a superfície do CDoT, podem ser encontrados vários grupos funcionais tais como aminas, álcoois ou ácidos carboxílicos, os quais lhes conferem uma excelente solubilidade em água. Estes grupos funcionais também permitem que os CDoT sofram outras etapas de funcionalização à medida que fornecem um produto químico base para acoplamento a outras moléculas, por exemplo, os ligandos. As etapas de funcionalização servem respetivamente como um meio de melhorar a fotoluminescência do CDoT ou modificar as suas propriedades físicas ou de

interação com outras moléculas (Lin, 2021). Podem ser utilizados em várias aplicações, entre as quais se destacam, os sensores óticos e eletroquímicos, os catalisadores e terapia fotodinâmica (Sendão, 2019).

Os CDoT exibem uma série de propriedades que podem variar significativamente de acordo com vários fatores, tais como: variações na composição dos precursores, as condições de reação, o tipo de metodologia sintética utilizada e o tratamento pós-sintético que lhe foi aplicado. Isto implica que as nanopartículas resultantes possuem um núcleo interno estável, mas uma estrutura e composição externa variável (Lin, 2021).

Até ao momento, foram desenvolvidos diversos métodos sintéticos para a síntese de CDoT, os quais podem ser classificados em duas vias: método de “baixo para cima” (no inglês *bottom-up*) e “método de cima para baixo” (no inglês *top-down*), conforme a Figura 2.10(Kang, 2020).

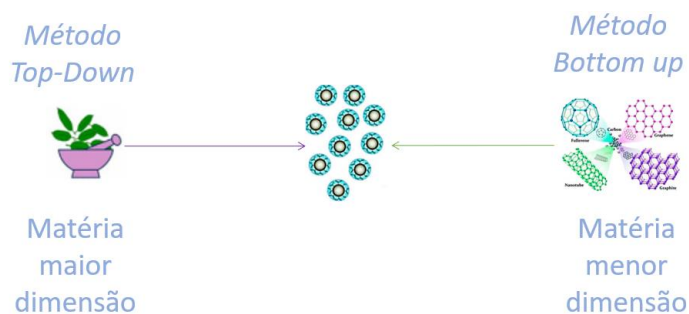


Figura 2.10. Métodos de síntese e as suas diferenças.

A abordagem *bottom-up* converte pequenas moléculas, tais como glicose, frutose ou aminoácidos, em CDoT. Esta abordagem de síntese tem uma vantagem de uma boa relação custo-eficácia, facilidade de operação e simples requisitos de equipamento e, portanto, têm sido amplamente utilizados na síntese de CDoT (Kang, 2020). Em contrapartida, abordagem *top-down* envolve o processo de decompor os carbonos de materiais maiores por exemplo: o resíduo de matéria orgânica, grafeno de grandes dimensões, nanotubo de carbono, grafite, carvão ativado comercial (Kang, 2020).

A biomassa é uma substância complexa, abundante, heterogênea, biodegradável e orgânica que pode ser obtida de diversas fontes tais como erva perene, resíduos orgânicos domésticos, resíduos da agricultura, pesca, avicultura, criação de animais, silvicultura e indústrias alimentares, ou seja, toda a matéria orgânica independente da sua proveniência ou organismo que lhe deu origem (Lin, 2021).

Os resíduos de biomassa são uma fonte natural de carbono orgânicos, composto principalmente por celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e/ou proteínas (Lin, 2021). Esses resíduos são renováveis, ecologicamente amigáveis e amplamente disponíveis, representando uma fonte inócua de carbono para a produção de CDoT. Contudo, a maioria dos resíduos de biomassa é atualmente descartada para compostagem, depositada em aterro ou queimada abertamente, o que conduz a um desperdício de recursos, causando alguns problemas ambientais que ameaçam a saúde humana (Lin, 2021).

Devido a preocupação com meio ambiente surgiu o CDoT que são preparados a partir de recursos naturais e mostram as seguintes vantagens comparativamente com os CDoT sintetizados de moléculas inorgânicas., tais como:

1. os precursores do CDoT são mais abundantes, amigos do ambiente e apresentam melhor biocompatibilidade;
2. a maioria dos recursos naturais são ricos em heteroátomos, que podem render CDoT feitos por heteroátomos sem adicionar fontes externas de heteroátomos.

Por conseguinte, novas aplicações de síntese dos CDoT tenha surgido, tais como: nas áreas dos sensores, catálise, liberação de fármacos, bioimagem, energia e outros campos têm vindo a crescer (Lin, 2021).

A origem dos resíduos de biomassa como matéria-prima na produção de CDoT são diversas e existem inúmeros métodos de síntese, Figura 2.11.

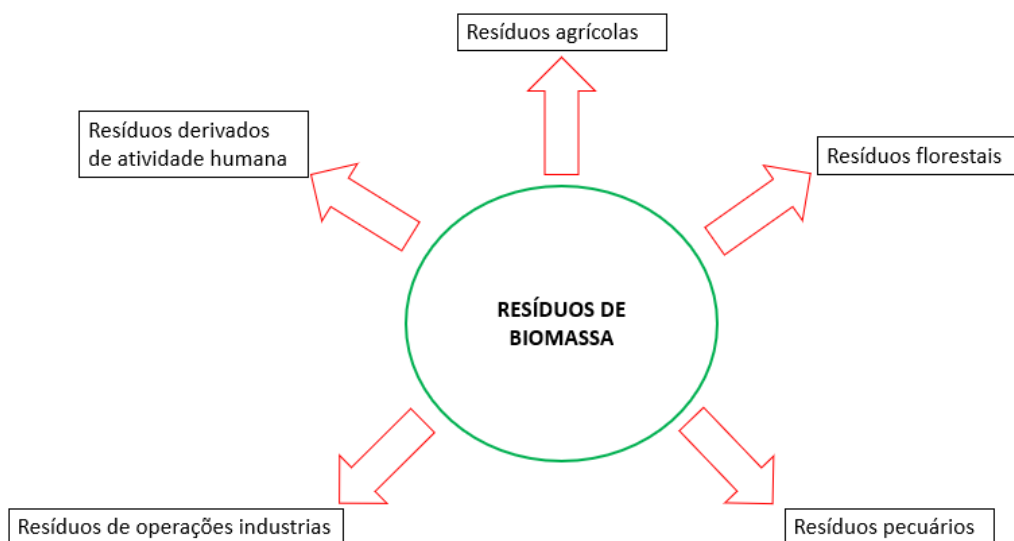


Figura 2.11. Principais fontes de resíduos de biomassa. Adaptado de (Kang, 2020).

As matérias-primas utilizadas na síntese do CDoT afetam as propriedades fluorescentes, por exemplo, após algumas semanas de armazenamento, os CDoT obtidos a partir de casca ananás podem ser totalmente degradados, enquanto os CDoT de casca de pepino apresentam grande estabilidade. Outro aspecto a ter em conta é que os rendimentos quânticos (QY) podem ser diferentes, por exemplo, caca de alho e casca de taro pelo mesmo método de síntese apresentam QY diferentes (Kang *et al*, 2020). A Tabela 2.4 mostra a aplicação do CDoT sintetizado por diferente matéria orgânica.

Tabela 2.4. Diferentes fontes de biomassa para realizar a síntese de CDoT por micro-ondas.

Biomassa	Método de síntese	Aplicação	Referência
Farinha	Micro-ondas	Detetar Hg ²⁺	Meng, <i>et al.</i> 2019
Pétalas de rosa		Detetar moléculas	
Bicho da seda		Bio-imagem	
Soroalbumina		Detetar Pb ²⁺	

2.3.1 Métodos de síntese

O CDoT pode ser sintetizado por diferentes métodos, independentemente, da abordagem ser top-down ou bottom-up. Os métodos de síntese mais são muito variados e podem ser desde a pirólise, uso de ultrassons, temperatura elevada a pressões superiores à atmosférica, hidrotérmicos, ablação a laser, o uso de plasma, oxidação eletroquímica ou mesmo o uso de radiação micro-ondas.

- Pirólise

A carbonização por pirólise é um método muito clássico para a preparação de CDoT. Apresenta muitos pontos fortes, incluindo simplicidade, conveniência, baixa toxicidade. A preparação de CDoT pode, geralmente, ser concluída numa única etapa, sem muito equipamento ou processos complicados. O precursor sofre uma pirólise diretamente na mufla, dando origem a CDoT com baixo QY. Considerando que o CDoT sintetizado por pirólise têm geralmente um QY insatisfatório, são necessários

outros métodos para auxiliar a preparação. Por exemplo, os CDoT produzidos por pirólise foram dispersos em água e tratados com reação ultrassônica, o que resultou em novos CDoT com um tamanho de partícula mais uniforme e um QY elevado de 14,5 %. Além disso, uma fluorescência mais forte pode ser obtida através da introdução de um gás inerte na reação para evitar a oxidação de CDoT por ar. A carbonização pirolítica é um método muito simples de preparar CDoT. No entanto, devido ao seu baixo QY e à elevada necessidade de equipamento, é urgente procurar melhores soluções para se adaptar ao desenvolvimento futuro (Lin, 2021).

- Ultrassons

O método de síntese ultrassônica realiza a reação através do efeito térmico da cavitação e da vibração de alta frequência. Apresenta vantagens incomparáveis, tais como o efeito ecológico, económico, de forte penetração e uniforme. O CDoT obtido por carbonização simples têm geralmente um tamanho de partícula bastante grande e uma morfologia de superfície menos uniforme, mas o método de síntese ultrassônico pode compensar esta deficiência. Por conseguinte, é possível obter CDoT com excelente desempenho combinando ultrassons com outros métodos. O percurso é seco e triturado até ficar em pó, é disperso em água para irradiação ultrassônica com sensores ultrassônicos, e a solução é filtrada e centrifugada por sua vez, em seguida, os CDoT têm que ser preparados com sucesso com um elevado QY de 14,5 %. Exceto para a irradiação ultrassônica direta de substratos, os compostos adequados podem ser adicionados para funcionalizar CDoT para obter produtos mais desejáveis. Vale a pena enfatizar que existem poucos relatos sobre a preparação de CDoT pelo método ultrassônico, o que pode ser atribuído ao efeito térmico local gerado pelo método ultrassônico e que pode facilmente levar a um aquecimento desigual das amostras, tornando assim a eficiência global da reação inferior à do aquecimento direto ou do micro-ondas. No entanto, ainda existem alguns desafios no estudo da preparação de CDoT por síntese ultrassônica, a principal razão é que o efeito térmico das ondas ultrassônicas é muito menor do que o do aquecimento direto ou micro-ondas. Por conseguinte, existe um enorme espaço para melhorias na síntese de CDoT pelo método ultrassônico, Figura 2.12 (Lin, 2021).

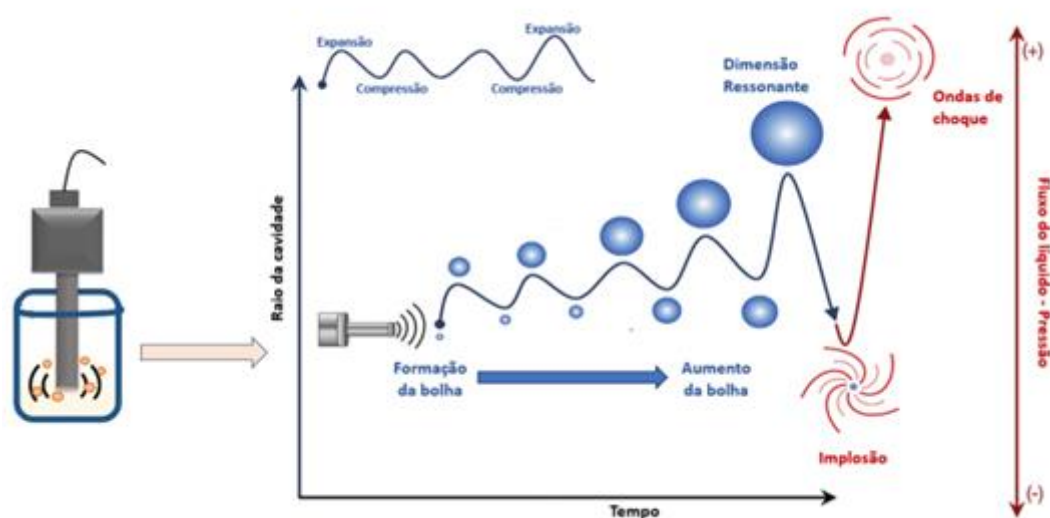


Figura 2.12. Esquema de um sistema ultrassônico. Adaptado de (Lin, 2021).

- Hidrotérmico

O método hidrotérmico, Figura 2.13, é amplamente utilizado e apreciado por numerosos investigadores pois pode ser utilizado precursores de carbono e colocados num recipiente selado com água a alta temperatura e pressão para sintetizar CDoT. As vantagens deste método são: ser ecológico,

não tóxico, de baixo custo e de operação simples. O método é realizado através da mistura com água e do aquecimento a 180 °C durante um tempo pré-estabelecido. O resultado é uma grande quantidade de elementos de carbono, nitrogénio e oxigénio nos CDoT o que provoca um QY elevado de 13,6 %. Do mesmo modo, há diferenças na dimensão das partículas, passivação e grupos de superfície (Lin, 2021).

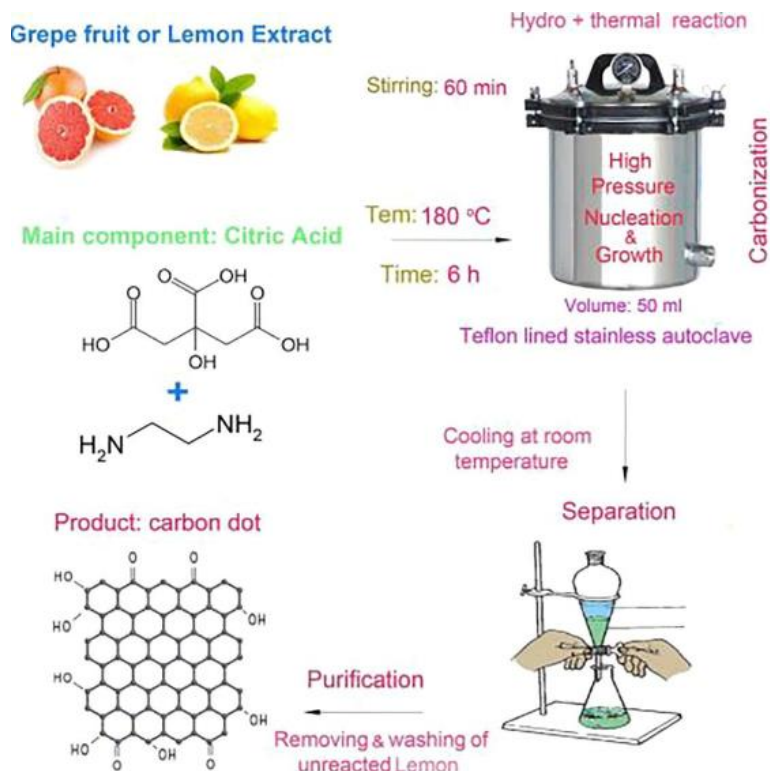


Figura 2.13. Esquema de preparação e síntese de CDoT pelo método hidrotérmico. Adaptado de (Lin, 2021).

- Ablação por laser

A ablação por laser tem sido aplicada na síntese de CDoT, devido às vantagens de um curto período e de uma operação simples e, também demonstra que a síntese por ablação a laser de CDoT a partir de grafite, Figura 2.14-A. O CDoT sintetizado apresenta um desempenho de fluorescência, estável e sintonizável através da funcionalização rápida a laser de partículas de carbono. A funcionalização por irradiação a laser tem uma influência importante na origem da QY como se mostra na Figura 2.14-B. Da mesma forma, uma via fácil para sintetizar nanopartículas de carbono fluorescentes por ablação a laser de pós de carbono em suspensão em solvente orgânico, como se mostra na Figura 2.14-A. A superfícies do CDoT pode ser modificada através de solventes adequados, assim a emissão por fluorescência do CDoT pode ser regulada alterando os grupos funcionais da sua superfície, o que é atribuído aos ligando de superfície do CDoT. O QY é tão elevado como 12 %, o que faz ser adequado para aplicações optoelectrónicas. O CDoT obtido apresenta emissão de QY de duplo comprimento de onda, como se pode ver na Figura 2.14-C. O diagrama esquemático da síntese do CDoT a partir de fibra de carbono é apresentado na Figura 2.14-D (Cui, 2021).

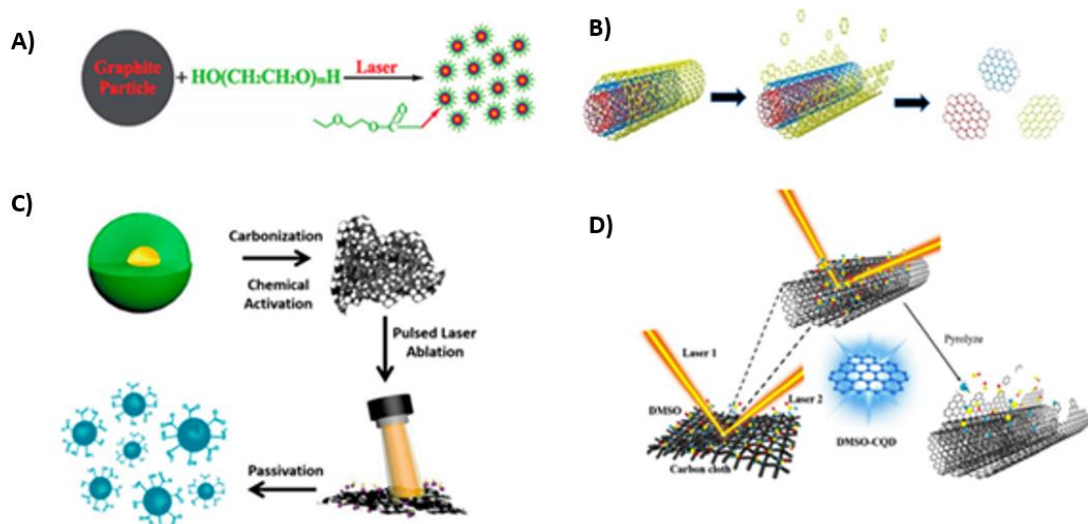


Figura 2.14. Esquema de síntese de CDoT por ablação a laser. A – Irradiação de laser em pó de carbono; B – Multi parede de nanotubos de grafite para produzir CDoT; C – Síntese de CDoT a partir de biomassa; D - Preparação ultra-rápida e altamente eficiente de por ablação por laser pulsado de feixe duplo. Adaptado de (Cui, 2021).

- Plasma em solução

Recentemente desenvolveram uma nova tecnologia, designada por plasma em solução, tornou-se um método alternativo para a síntese de nano materiais de carbono em condições moderadas, por exemplo: temperatura ambiente e pressão atmosférica. Durante o processo de plasma em solução, o plasma pode ser gerado entre eléctodos, submersos na solução, utilizando uma fonte de alimentação bipolar pulsada, como se mostra na Figura 2.15. As moléculas próximas dos eléctodos são continuamente colididas pelos electrões que saem dos eléctodos. Estas colisões provocam a excitação e a dissociação das moléculas. Assim, o SP pode induzir a formação de várias espécies altamente reativas que podem levar a uma reacção de síntese rápida para o nano material de carbono. Esta evidência deu uma pista para a síntese rápida de CDoT dopados com azoto com grupos funcionais ricos (Kim,2020).

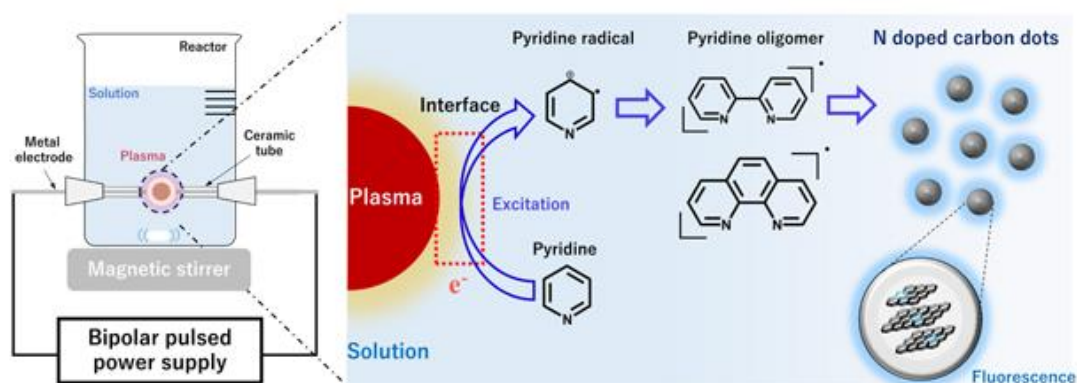


Figura 2.15. Esquema experimental síntese de CDoT por solução de plasma. Adaptado de (Kim, 2020).

- Oxidação electroquímica

No método de oxidação electroquímica, Figura 2.16, a grafite ou o grafeno ou os nanotubos de carbono funcionam como eléctrodo de trabalho e são clivados por oxidação-redução sob alta tensão ($\pm 1,5$ a ± 3 V).

Existem duas abordagens para a oxidação eletroquímica. Uma é que as ligações carbono-carbono do grafeno ou dos nanotubos de carbono são diretamente fraturadas por oxidação eletroquímica. A outra é que a água é oxidada para se transformar num radical livre de hidroxilo ou num radical livre de oxigênio que pode clivá-los por oxidação em CDoT. Os resultados obtidos pelo método de oxidação eletroquímica apresentam elevados níveis de estabilidade, mas a sua desvantagem é que tanto o pré-tratamento das matérias-primas como a purificação do produto final são demoradas. Além disso, é difícil realizar a produção em massa do CDoT devido ao baixo rendimento (Chen, 2018).

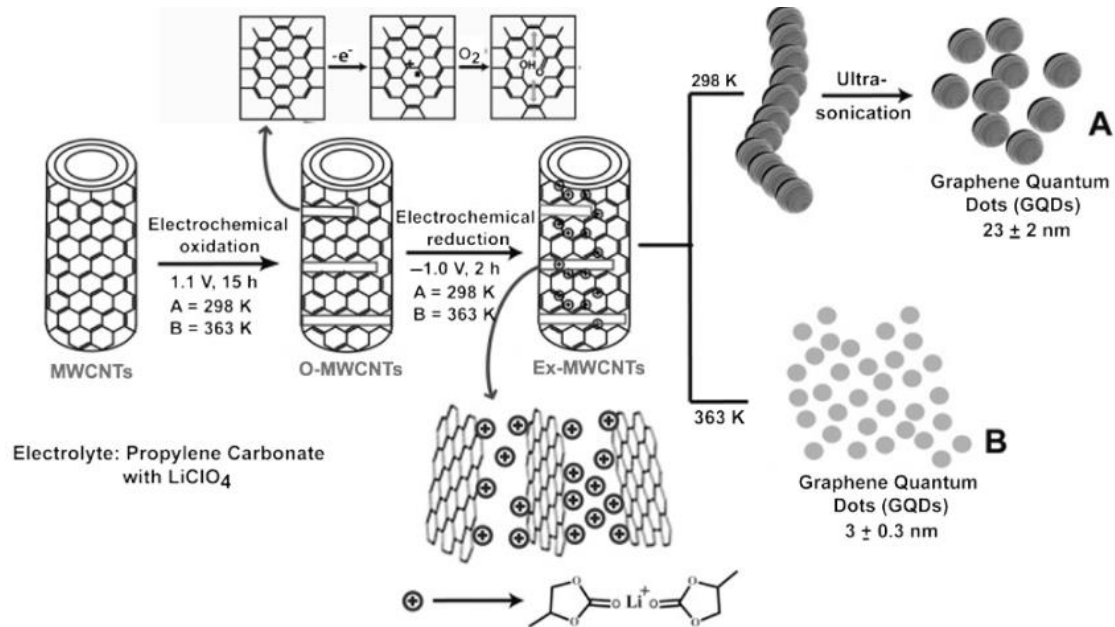


Figura 2.16. Ilustração da síntese por oxidação eletroquímica. Adaptado de (Chen, 2018).

- Micro-ondas

Como se sabe, alguns materiais com uma grande constante dielétrica podem ser facilmente aquecidos pelo método assistido por micro-ondas, e as micro-ondas podem penetrar facilmente nas cerâmicas e nos plásticos e ser refletidas pelo metal. Além disso, a taxa de aquecimento altera-se com o aumento do teor geral de água. O aquecimento instantâneo do meio através de micro-ondas não só demora menos tempo, como também pode alterar a temperatura em tempo real, ajustando a potência, o que permite poupar muita energia. Por conseguinte, os CDoT também são frequentemente sintetizados utilizando métodos assistidos por micro-ondas. Além disso, uma estratégia em que as matérias naturais são secas e depois trituradas até ficarem em pó. Posteriormente, esse pó é dissolvido em um solvente e depois aquecido no micro-ondas, produzindo um CDoT, Figura 2.17 (Lin, 2021).

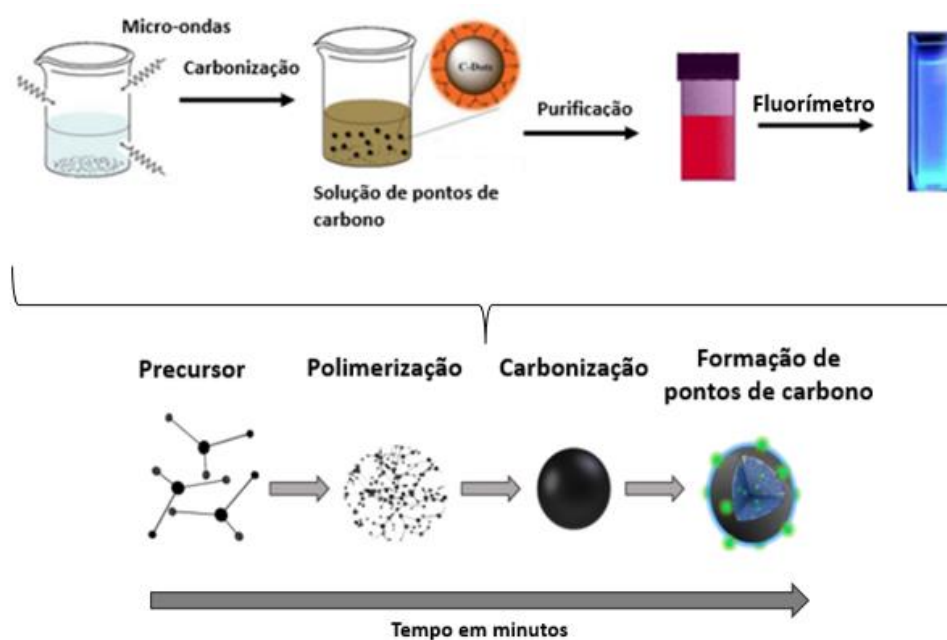


Figura 2.17. Síntese de CDoT assistida por micro-ondas com a metodologia bottom-up Adaptado de (Lin, 2021).

Sendo assim, a fotoluminescência do CDoT pode estar associada a diversos fatores que variam de acordo com a estrutura dessas nanopartículas. Entre os fatores mais estudados encontram-se: o valor de pH, a estrutura, o tamanho e a presença de grupos funcionais químicos na nanopartícula.

A Tabela 2.5 descreve os métodos mais comuns de síntese de CDoT, apresentando as vantagens e desvantagens de cada método.

Tabela 2.5. Visão geral dos diferentes métodos de síntese de CDoT

Método	Vantagens	Desvantagens	Bibliografia
Ablação por laser	Rápido, eficaz e altamente fluorescente	Baixo rendimento e pode ter um baixo QY e um fraco controlo do tamanho.	Wareing <i>et al</i> , 2021
Oxidação eletroquímica	O tamanho e a nano estrutura são controláveis, de baixo custo e elevado rendimento	gama reduzida de precursores à escolha. A dopagem com heteroátomos é difícil	Wareing <i>et al</i> , 2021
Ultrassom	Menor tempo de síntese; Maior rendimento	Volume limitado na produção industrial	Chen <i>et al</i> , 2018
Hidrotérmico	Simple, rápido e amigo do ambiente	Pré-tratamento com forte oxidação.	Chen <i>et al</i> , 2018
Micro-ondas	Menor tempo de síntese; Maior rendimento	Volume limitado na produção industrial	Chen <i>et al</i> , 2018

O CDoT é um material fácil de sintetizar, portanto, vários estudos têm sido realizados para otimizar o método de preparação e os precursores utilizados, visando obter as melhores propriedades possíveis. Devido ao seu alto potencial em uma ampla gama de aplicações, o sensor se destaca pela sensibilidade de detecção, seletividade e foto estabilidade. Neste trabalho, optou-se por utilizar o método de síntese assistida por micro-ondas para a preparação dos CDoT, visando obter resultados ainda mais promissoras.

2.3.2 A escolha do método de síntese

O método escolhido para este trabalho para a tese é a síntese assistida por micro-ondas devido à sua eficiência, à simplicidade em termos de dispositivo e ao seu funcionamento, este método é uma forma rentável com uma forte vantagem competitiva pela produção de grandes quantidades de CDoT fluorescentes. A Figura 2.18 mostra um diagrama da síntese de CDoT assistida por micro-ondas.



Figura 2.18. Síntese de CDoT por micro-ondas assistida.

Micro-ondas são radiações eletromagnéticas que varia de 0,3 a 300 GHz. No entanto, micro-ondas mais comum nos aparelhos são emitidas radiações a 2,45 GHz para evitar interferências com dispositivos de telecomunicações. O sucesso e a eficácia do uso das micro-ondas na química derivam da capacidade das moléculas polares em absorver a radiação de micro-ondas e convertê-las em calor, através de aquecimento dielétrico. Este fenômeno é impulsionado pela polarização dielétrica e perda de condução onde moléculas polares, que têm um momento dipolo elétrico sofrem uma rotação molecular quando irradiada com micro-ondas, enquanto tentam continuamente alinhar-se no sistema de campo elétrico. A medida que o campo altera, as moléculas invertem a direção e geram aquecimento por perda dielétrica e fricção entre as moléculas (Medeiros, 2019).

A capacidade de conversão da energia eletromagnética de uma substância por micro-ondas é expressa pelo fator tangente de perda, δ ,

Tabela 2.6. Quanto mais alto o δ de um determinado solvente mais rápido e mais eficiente é o seu processo de aquecimento, enquanto o δ for baixo, o valor indicativo de um processo de aquecimento é lento e ineficiente após a irradiação com micro-ondas (Medeiros, 2019).

Tabela 2.6. Propriedades físicas de substâncias à temperatura de 30 °C.

Solvente	Tangente de perda (δ)	Referência
Ácido sulfúrico	3,855	Barros, 2013
Etanol	1,113	
Glicerina	0,699	
Metanol	0,521	
Água	0,105	
Acetonitrila	0,062	
Acetona	0,054	
Hexano	0,020	

Um dos maiores desafios frequentemente encontrados sob um regime de aquecimento convencional é o volume da amostra. A capacidade para conseguir uma transferência uniforme de calor num determinado volume varia em função do tamanho e do volume. Por exemplo, o aquecimento de um

pequeno volume (por exemplo 10 ml) requer significativamente menos tempo para alcançar a temperatura definida e o equilíbrio em comparação com um maior volume (comparativamente a 250 ml). Isto pode ter efeitos drásticos no aumento da escala e particularmente se os precursores forem suscetíveis a degradação ou se forem instáveis sob regimes de aquecimento prolongado (Dudley, 2015).

- Tempo de reação

O efeito do tempo de reação sobre as propriedades óticas do CDoT é bastante semelhante ao da reação com a temperatura. Um longo tempo de reação levará à destruição da estrutura da superfície do CDoT devido à sobre carbonização, Figura 2.19. Enquanto um curto tempo de reação causará uma carbonização insuficiente do carbono e, portanto, resultam em CDoT com fraca emissão de fluorescência. É de notar que o efeito do tempo de reação sobre as propriedades óticas do CDoT é dependente da temperatura. A otimização do tempo de reação apenas é significativa quando a reação é realizada a uma temperatura adequada, no entanto, se a temperatura de reação não for suficientemente elevada não será obtido CDoT útil mesmo que o tempo de reação seja ultralongo (Kang *et al*, 2020)

O tempo de reação tem um impacto significativo no QY de CDoT sintetizados a partir de biomassa. O QY do CDoT aumenta primeiro com o aumento do tempo de reação e depois diminui juntamente com um prolongamento do tempo de reação devido a matéria orgânica ser totalmente carbonizada (Bandi *et al*, 2016).

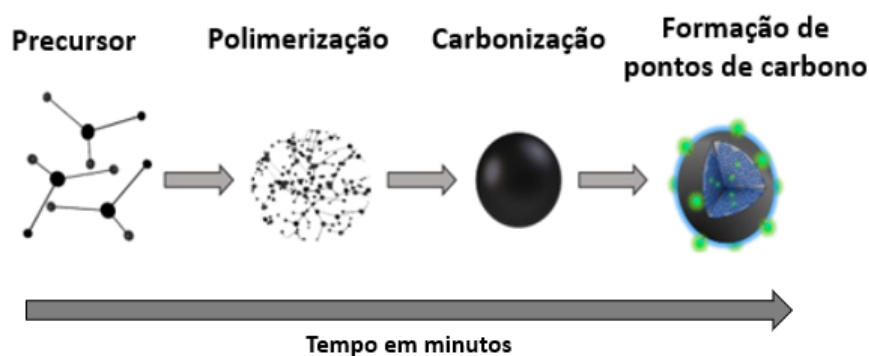


Figura 2.19. Caminho de reação para a formação do CDoT com o aumento do tempo. Adaptado de (Medeiros, 2019).

- Funcionalização do CDoT

A funcionalização é um método de modificação dos grupos funcionais presente nas superfícies de moléculas e consiste na ligação de uma molécula ou material na superfície de outro material. Essa estratégia é muito utilizada para modificar a superfície de um material, bem como alterar as propriedades de interesse. A funcionalização do CDoT é uma realizada para melhorar o desempenho fotofísico e fotoquímico, conferindo aos CDoT propriedades exclusivas, ampliando a possibilidade de aplicação ou até mesmo a sua seletividade em relação a uma molécula alvo (Sheehan *et al*, 1961).

Segundo alguns estudos, a modificação de superfície do nano material de carbono pode ser realizada por dois métodos de funcionalização, por meio de ligações covalentes e não covalentes (conjugação de natureza $\pi \rightarrow \pi^*$, utilizando a natureza hidrofóbica do material). A funcionalização covalente modifica a conectividade da ligação alterando os grupos funcionais e as propriedades nano material. Em geral, essa funcionalização ocorre por meio de reações químicas usando materiais com caráter hidrofílicos. Em termos de funcionalização, a natureza da ligação covalente é mais robusta em comparação com a ligação não covalente, ou seja, a ligação covalente formada entre as moléculas e o ponto de carbono pode ser altamente estável. Sendo assim, existem diversas reações que podem ser usadas para esse fim, dentre elas, destacam-se as reações de cicloadição, fluoreação/bromação, adição eletrofílica, adição

nucleofílica e reações radicalares (Sheehan *et al*, 1961). Os métodos mais conhecidos para funcionalizar o CDoT são: dopagem com heteroátomos e modificação por superfície.

A dopagem com heteroátomos pode ser utilizada para ajustar eficazmente a estrutura intrínseca e a distribuição de elétrons nos CDoT, incluindo a dopagem com não metais e metais. Entre os vários não-metais, a dopagem com nitrogénio é um método muito eficaz para melhorar o QY do CDoT, uma vez que o elétron capturado pelo nitrogénio pode apresentar um elevado QY. Além disso, a dopagem com nitrogénio pode ser utilizada para regular a fluorescência e determinar o comportamento de independência da excitação devido a estados de superfície funcionalizado. Há outros dopantes não metálicos, como o enxofre, o fósforo, o silício, ou uma combinação de diferentes dopantes (conhecida como co-dopagem) para melhorar as propriedades óticas do CDoT. No entanto, a dopagem com metais pode ser utilizada para otimizar as propriedades óticas através da modulação da estrutura de bandas e conferir novas funcionalidades aos CDoT dopados. Vários átomos metálicos, como o cobre, o gadolínio e o manganês, são utilizados para funcionalizar o CDoT. Os CDoT dopado com cobre podem ser fortes catalisadores porque os átomos de cobre atuam como fortes aceitadores ou dadores de elétrons. Além disso, os CDoT dopados com gadolínio podem ser utilizados para bioimagem de fluorescência e ressonância magnética de modo dual, uma vez que os átomos de gadolínio são os agentes de contraste. Por conseguinte, a dopagem química com heteroátomos constitui uma estratégia ideal para a engenharia da estrutura eletrónica e das propriedades óticas do CDoT, mas o aumento simultâneo da toxicidade exige atenção (Chen *et al*, 2019).

A modificação da superfície é uma estratégia para funcionalizar o CDoT com iões, moléculas orgânicas, polímeros e proteínas, Figura 2.20. Ao contrário da dopagem com heteroátomos, a modificação da superfície com ligandos funcionais pode ser utilizada para variar os estados da superfície e aumentar o número de sítios ativos. Na modificação iónica os catiões e aniões, especialmente os iões metálicos, podem ser facilmente ligados à superfície do CDoT para introduzir novos sítios ativos, proporcionando assim um meio para reação química emergentes e potenciais aplicações. Na modificação de iões metálicos alguns iões metálicos de transição comuns, como Fe^{3+} , Cu^{2+} e Mn^{2+} têm sido utilizados para modificar CDoT devido às suas propriedades fotofísicas e químicas únicas. O cloreto de ferro (III) é um agente oxidante suave que pode remover átomos de hidrogénio de um substrato aromático, resultando em novas ligações carbono-carbono entre anéis adjacentes. A utilização de ferro (III) para modificar a superfície do CDoT pode melhorar as propriedades catalíticas do CDoT. O ião cobre (II) associado ao CDoT acrescentam importantes funções biocatalíticas, proporcionando assim um meio para catalisar várias reações químicas. Por outro lado, o CDoT modificados com L-cisteína podem ser utilizados para a imagiologia *in situ* a longo prazo do aparelho de Golgi porque a L-cisteína ou os seus resíduos podem estabelecer ligações cruzadas com o aparelho de Golgi. O CDoT modificados com polímeros com impressão molecular são utilizados como sonda biocompatível para a deteção de células cancerosas, uma vez que os polímeros com impressão molecular permitem o reconhecimento específico do ácido glucurónico na superfície de determinados cancros. Entretanto, a modificação da superfície, ou seja, a funcionalização da superfície é também uma forma muito eficaz de aumentar o QY do CDoT. Os polímeros ou outras moléculas fixam-se ou ligam-se à superfície do CDoT para aumentar a eficiência da luminescência, porque a emissão resultante das armadilhas de energia da superfície tornar-se-á mais estável após a funcionalização de superfície (Chen *et al*, 2019).

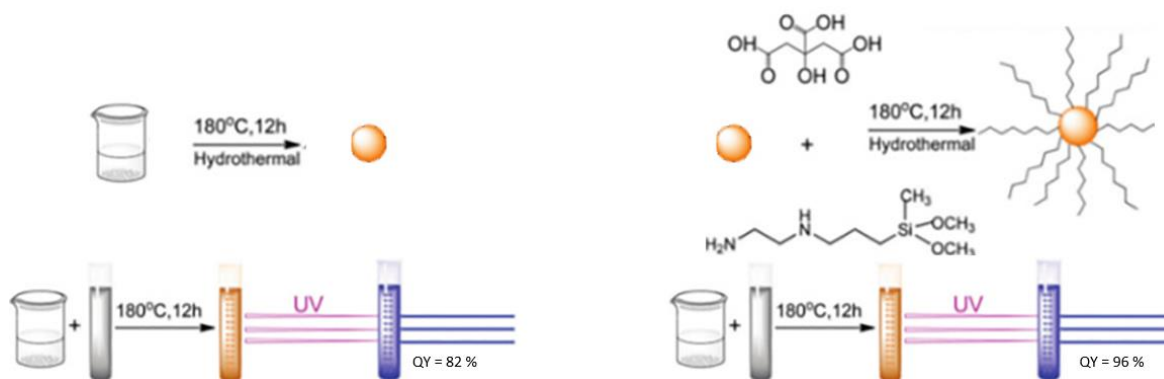


Figura 2.20. Ilustração da funcionalização do CDoT. Adaptado de (Chen, 2019).

O efeito da funcionalização de superfície afeta o QY de fluorescência de CDoT, ou seja, em geral sem a funcionalização o QY é relativamente baixo. A funcionalização é frequentemente utilizada para melhorar a intensidade de emissão de fluorescência de CDoT e alargar a sua aplicação aos ensaios bioanalíticos. Desta forma, pode diminuir os defeitos de superfície e aumentar a probabilidade de recombinação de na banda de valência (*exciton-hole*)o que evitará com que os CDoT de aglomeração aumentam a sua intensidade de emissão de fluorescência.

A funcionalização inclui duas abordagens, isto é, limitar o CDoT com alguns agentes de cadeia longa e oxidar as superfícies do CDoT com ácidos fortes. Devido a presença de ácidos carboxílicos de cadeia longa e algumas outras substâncias funcionais presentes em resíduos de biomassa, a carbonização e funcionalização ocorrem ao mesmo tempo durante a síntese de CDoT. Os resíduos de biomassa são frequentemente auto-passivados, ou seja, as suas superfícies são enriquecidas com hidroxilo, amina, carboxil ou grupos de tióis. Os CDoT auto-passivados preparados a partir de resíduos de biomassa exibem, geralmente boas propriedades óticas (Kang *et al*, 2020).

- Polaridade do CDoT

O CDoT pode ser preparado a partir de diversos precursores e rotas sintéticas, todos com impacto direto as suas propriedades químicas, físicas e óticas. Em relação a síntese de CDoT por micro-ondas, a polaridade rege a interação entre os precursores e os solventes, permitindo a possibilidade de preparação de partículas hidrofílicas, hidrofóbicas (Medeiros, 2019).

Os CDoT hidrofílicas são mais frequentemente sintetizados devido ao fato de que a água pode ser utilizada como solvente e requer baixa temperatura de reação. A sua superfície é tipicamente decorada com mistura contendo oxigénio e nitrogénio (carboxilos, hidroxilos e aminas) que podem ser relevantes em bio imagem, sensores, administração de medicamentos e aplicações foto catalíticas. Os precursores utilizados com sucesso para síntese de CDoT são: carboidratos, aminoácidos e proteínas (Liu, 2016).

Os CDoT hidrofóbicos são de interesse em aplicações biológicas, nos sistemas vivos, uma vez que requer a utilização de carbono relativamente insolúvel na água. Os melhores precursores para síntese de CDoT hidrofóbicos a maioria são aminoácidos e lípidos pois, não se dissolvem facilmente na água. Alguns solventes orgânicos podem efetivamente melhorar a sua solubilização, mas não pode ser facilmente removido subsequentemente da mistura reacional, ou seja, os vestígios de alguns destes solventes orgânicos são tóxicos para os organismos vivos, a sua utilização é muito limitada no desenvolvimento de aplicações biológicas (Medeiros, 2019).

O CDoT derivado de resíduos de biomassa, suas intensidades de emissão de fluorescência mudam em resposta a uma mudança no valor de pH, portanto, eles podem ser usados como sensores de pH. Por exemplo, o CDoT sintetizado usando um método hidrotérmico que possui muitos grupos de carboxil e grupos hidroxila em sua superfície. Devido à protonação e desprotonação de grupos carboxila sob

diferentes condições de pH e a mudança resultante na propriedade de carga eletrostática, a intensidade de emissão do CDoT diminui gradualmente à medida de acordo com o valor do pH (Kang, *et al.* 2020).

2.4 Mecanismo de fluorescência

Existem sensores baseados em CDoT que utilizam a fluorescência para detecção. Por outras palavras, é um sistema que ao interagir com o analito sinaliza sua presença a partir da alteração da intensidade da emissão (extinção ou aprimoramento), variação no comprimento de onda e/ou tempo de vida, qualquer mudança nas propriedades fotoluminescentes é utilizada como uma forma de detecção. O desenvolvimento desses sensores leva em conta três principais fatores: a interação direta do analito com os CDoT, a pós-funcionalização e a integração com outros fluoróforos como materiais sensoriais. Os CDoT servem como sensores para uma ampla gama de analitos, como iões, pequenas moléculas, macromoléculas, células e mesmo bactérias. A categoria que mais se destaca usando CDoT é a detecção de iões metálicos, muito embora tem crescido o número de aplicação envolvendo moléculas orgânicas (Sun *et al.*, 2017).

A luminescência é descrita como a emissão de luz na faixa do visível de 400 a 700 nm do espectro eletromagnético em consequência de uma transição eletrónica. Inicialmente, o processo envolve a absorção de um fóton por uma molécula, que levam a formação de um estado eletronicamente excitado. Nesta etapa a molécula absorve uma quantidade específica de energia para excitar um elétron de um menor estado de energia para um estado de energia mais elevado, para que ocorra a transição eletrónica na molécula é necessário que o um fóton incidente tenha uma energia igual à diferença entre os dois estados eletrónicos excitado e fundamental. Quando o fóton é absorvido promove o elétron a um estado excitado, este elétron permanece neste estado por uma fração infinitamente pequena de tempo e volta para o estado fundamental novamente. Esse processo é o que chamamos de transição eletrónica. Desta forma, para tornar mais didático a compreensão dos fenómenos envolvidos em uma transição eletrónica, estes podem ser divididos em dois processos: absorção e emissão de radiação eletromagnética (Lampman, *et al.* 2010).

O processo de absorção é quando uma radiação contínua é incidida sobre uma amostra transparente e parte da radiação pode ser absorvida. Consequentemente, a radiação residual é difratada por um componente ótico sendo a responsável pelo espectro de absorção. A absorção é um processo quântico e somente ocorre quando a radiação incidente tenha a energia necessária para que o fóton absorvido promova a transição de um elétron na molécula entre os orbitais ocupados para os orbitais desocupados. Normalmente, a transição envolve a orbital molecular preenchido de mais alta energia (HOMO) e a orbital molecular vazio de mais baixa energia (LUMO) da molécula (Lampman, *et al.* 2010).

As principais transições eletrónicas são correspondentes aos níveis de energia ocupados (ligantes) e desocupados (antiligantes, representados por *). Cada transição está associada a um cromóforo, que é composto por um grupo de átomos que são capazes de produzir as absorções características nas moléculas. Diversas transições com diferentes energias podem ocorrer pela presença de diferentes grupos orgânicos absorvedores, Figura 2.21 (Lampman, *et al.* 2010).

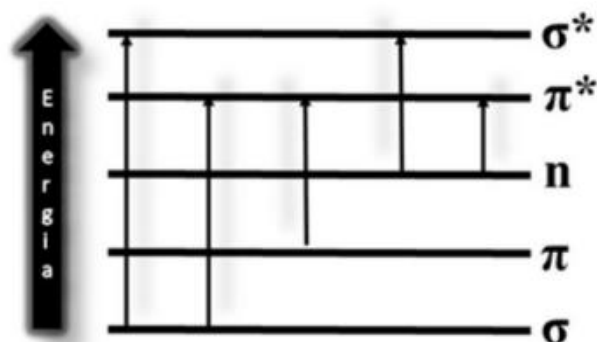


Figura 2.21. Diagrama geral de transições moleculares em compostos orgânicos e as principais transições eletrônicas. Adaptado de (Lampman, *et al.* 2010).

No processo de absorção a transição eletrônica ocorre por meio da absorção de fótons que irá excitar as moléculas para um estado eletrônico de energia mais elevada. Este estado eletrônico é composto por diferentes níveis vibracionais e rotacionais. A quantidade de energia absorvida no processo determina em quais níveis vibracionais e rotacionais o elétron excitado será colocado (Lampman, *et al.* 2010).

O processo de emissão em um cromóforo cujas transições eletrônicas podem ser divididas em dois tipos: a fluorescência e a fosforescência. Estes dois fenômenos de emissão são similares por apresentarem a mesma forma de excitação realizada por absorção de fóton. Comumente são mencionados por um termo mais genérico, denominado como fotoluminescência. A fotoluminescência enquadra-se como um tipo de luminescência que é um termo mais amplo para os métodos com diferentes formas de emissão. No processo de emissão de fluorescência as transições eletrônicas envolvem estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin e a fosforescência envolvem estados eletrônicos de multiplicidade de spin distintos. Consequentemente, a emissão por fluorescência apresenta tempo de vida curto de luminescência, menos de 10^{-5} s, enquanto a fosforescência apresenta um tempo de vida de vários segundos ou mais após o término da irradiação. Semelhante ao processo de absorção, a regras de seleção espectroscópicas para a emissão definem se as transições são/ou não permitidas. As transições devem ser permitidas tanto por multiplicidade de spin, quanto por simetria (Skoog, *et al.* 2002).

Em uma molécula perfeita, após a absorção de um fóton, ocorre a excitação da molécula do estado inicial (geralmente o estado fundamental) para o estado excitado. O estado excitado emite um fóton com a mesma energia/frequência/comprimento de onda, regressando para o estado fundamental (inicial). A estes processos são denominados de processos de excitação e emissão (desexcitação ou decaimento). Geralmente, a emissão de fotoluminescência tem comprimento de onda maior que a radiação usada para a sua excitação. No entanto, quando uma molécula é excitada, ela retorna ao seu estado eletrônico de menor energia, as transições eletrônicas desviam um pouco das regras de seleção ideais. Para moléculas fotoluminescentes, a emissão de um fóton pode não acontecer com a mesma energia que a do fóton de excitação, e outros mecanismos de desativação podem ocorrer. Quando uma molécula é excitada, esta pode ser levada para qualquer outros níveis vibracionais e a energia vibracional em excesso é perdida pelo processo de liberação de calor para o ambiente. A perda de energia resultará na relaxação vibracional até o nível vibracional de mais baixa energia. Consequentemente, quando ocorre a fluorescência a transição a partir do nível vibracional de um estado eletrônico excitado para qualquer um dos níveis vibracionais do estado fundamental, as perdas de energia ocorrem por relaxação vibracional até atingir o nível vibracional de mais baixa energia do estado fundamental, Figura 2.22 (Joseph *et al.* 2002).

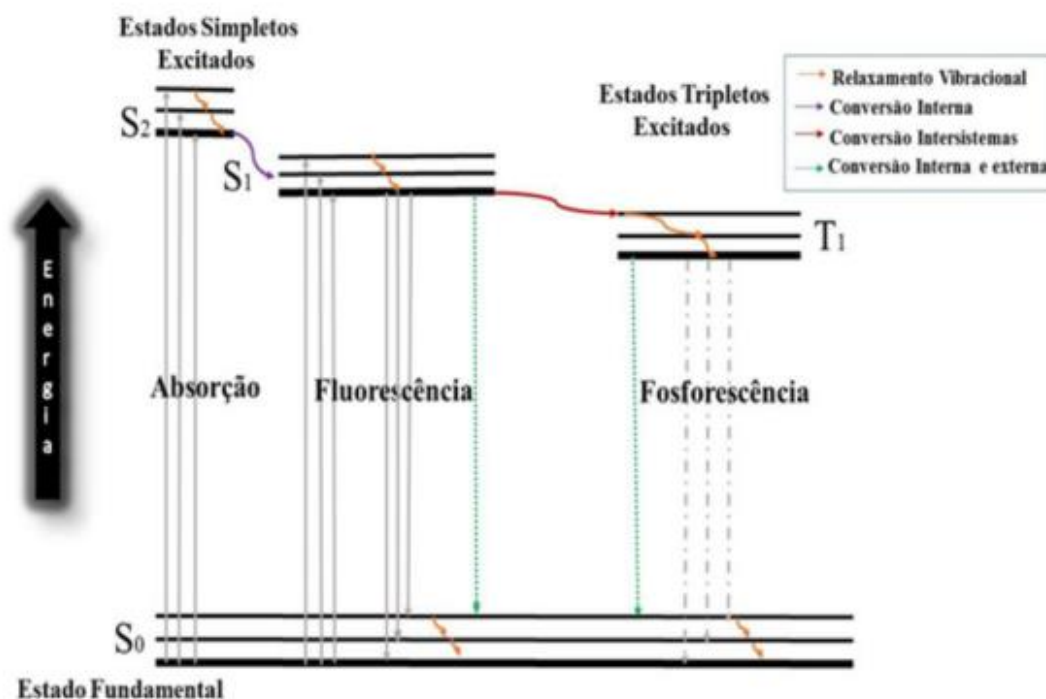


Figura 2.22. Diagrama de energia dos possíveis mecanismos em um sistema fotoluminescente. Adaptado de (Skoog, et al. 2002)

Os espectros de emissão podem ser obtidos por meio da escolha prévia do comprimento de onda de excitação. A energia correspondente irá excitar a molécula para qualquer um dos níveis vibracionais do estado eletrônico com a subsequente perda de energia para o primeiro estado eletrônico excitado. O espectro de emissão consiste no registro da intensidade de luminescência em função da variação do comprimento de onda quando são excitados num comprimento de onda fixo. Para a obtenção dos espectros de excitação, a molécula somente irá emitir se puder absorver a radiação incidente, o que permitirá que a mesma seja excitada a algum dos seus estados eletrônicos. Os espectros de excitação são obtidos medindo-se a intensidade de luminescência em um comprimento de onda fixo (Vaz, et al. 2015).

O tamanho do ponto de carbono afeta o tamanho do comprimento de onda de emissão que por sua vez influencia a diferença de energia entre a banda molecular mais ocupada (HOMO) e a orbital molecular menos ocupada (LUMO). Como o tamanho da partícula diminui, a diferença de energia entre HOMO e LUMO aumenta, levando a uma maior necessidade energética para excitar os elétrons do HOMO para o LUMO. Após excitação, o elétron relaxará e voltará ao estado do inicial com a emissão da luz. Consequentemente, podemos afirmar que o déficit energético determina o comprimento de onda de emissão, ou seja, nanopartículas menores emitem em comprimentos de onda mais curtos, embora mais energéticos, Figura 2.23 (Yuan, 2017).

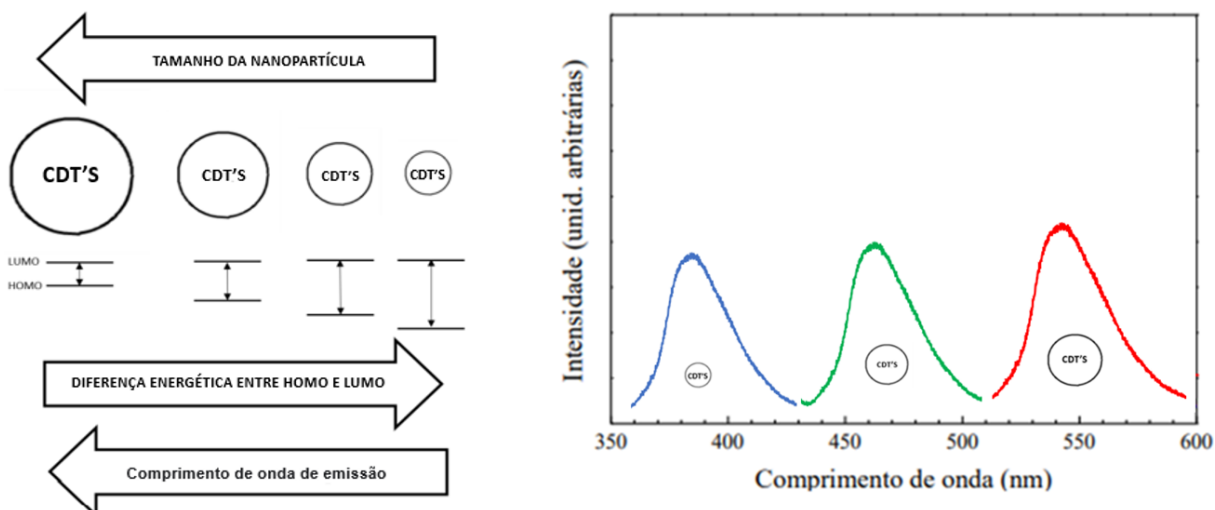


Figura 2.23. Representação do tamanho do CDoT com seu comprimento de onda de emissão. Adaptado de (Sendão, 2019).

Os sensores baseados em CDoT utilizam a fluorescência para a detecção. Por outras palavras, esse sistema sinaliza a presença do analito por alterações na intensidade da emissão, variação no comprimento de onda e/ou tempo de vida da fluorescência. Qualquer modificação nas propriedades fotoluminescentes é utilizada como um método de detecção. No desenvolvimento desses sensores um fator crucial a ser considerado é a interação direta do analito com os CDoT (Sun *et al*, 2017).

No entanto, é importante ressaltar que vários autores relatam a presença de vários subprodutos moleculares fluorescentes após a síntese de CDoT, independentemente, da abordagem utilizada, seja *top-down* ou *bottom-up*. Estes subprodutos são impurezas fluorescentes, designados por fluoróforos e interfere na intensidade de fluorescência de uma solução de CDoT o que faz mascarar a verdadeira emissão do CDoT, Figura 2.24(Krysmann, 2012). Desta forma, pode explicar a emissão reforçada de uma solução de CDoT não purificados pois contém tanto o CDoT quanto os fluoróforos, Figura 2.24 (Krysmann, 2012).

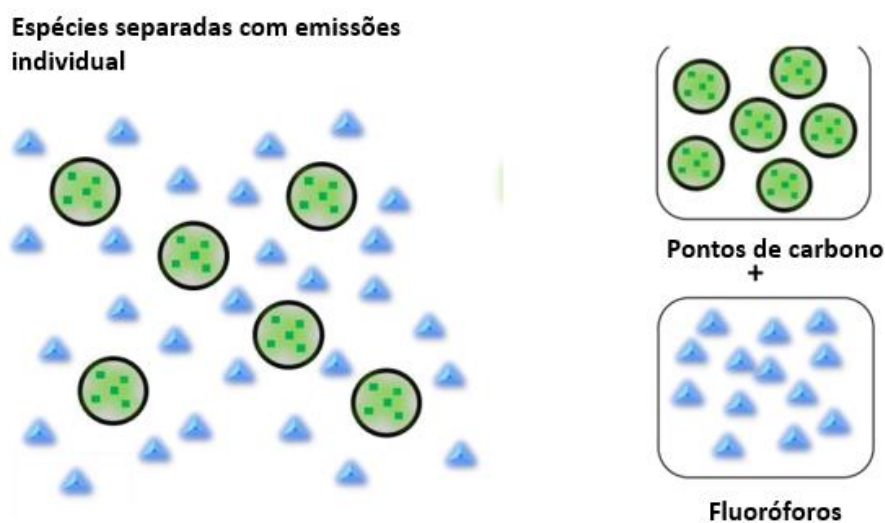


Figura 2.24. Representação da emissão por CDoT aliada à emissão de impurezas, fluoróforos moleculares.

Os CDoT têm sido extensivamente estudados como o sensor para detetar vários produtos químicos sob diferentes efeitos.

A emissão de luz de uma molécula pode ser desativada por vários fatores, incluindo a interação com outras moléculas. Independentemente de como a luminescência é extinta, esse processo é denominado de supressão. Esse fenómeno pode ocorrer por diversos tipos de interação como transferência de energia, rearranjo molecular, supressão estática (formação de complexo) e supressão dinâmica. A supressão dinâmica ou colisional ocorre, como o próprio nome sugere, quando há colisões entre o CDoT e a molécula supressora. Após a colisão, CDoT retorna ao seu estado fundamental sem a emissão de luz, ou seja, os eletrões retornam para o estado fundamental sem que ocorra a emissão de fluorescência.

Em contrapartida, o processo de supressão estática é observado quando ocorre a formação de um complexo não fluorescente, entre o CDoT e a molécula supressora (Valeur *et al.*, 2012).

A interação física direta entre o CDoT e o supressor não seja estritamente necessário para a extinção da luminescência porém nos casos da supressão dinâmica e da estática há a necessidade desse contato (Valeur *et al.*, 2012).

A compreensão dos mecanismos de supressão é fundamental para o desenvolvimento de CDoT como sensores precisos e práticos com uma ampla gama de aplicações. Quando a fluorescência de CDoT diminui linearmente com o aumento da concentração de analito, o mecanismo supressão pode ser comprovado por meio do método de contagem de fótons único de correlação temporal que resulta em nenhuma flutuação nos perfis de decaimento de CDoT após a adição de analitos (Melvin, *et al.* 2021).

3. Metodologia

O objetivo desta tese visa desenvolver uma metodologia baseado em CDoT com o propósito de oferecer uma abordagem analítica mais económica em comparação com as técnicas de deteção convencionais do AL. Devido à alta sensibilidade do CDoT, surgiu a ideia em criar um método que possa ser aplicado na indústria de bio refinaria na determinação do AL. A Figura 25 representa as etapas do plano de laboratorial realizadas ao longo da tese para a metodologia de usar os CDoT como sensores químicos.

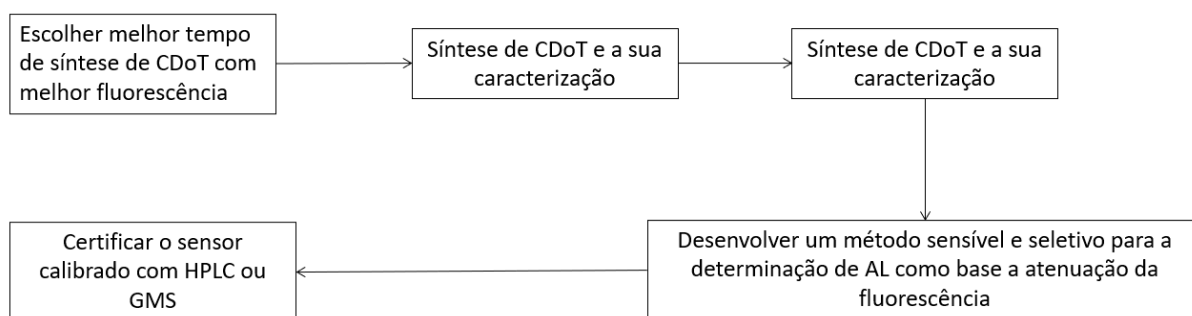


Figura 25. Ilustração do plano de investigação.

3.1 Equipamentos

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram: um micro-ondas de 700 W adquirido por Becken, uma estufa “Drying oven digit” adquirido por Trade Raypa, filtros de seringa hidrofóbico 13 mm PTFE com 100 pcs/pK de 0,22 μm adquirido por LabFill, um triturador adquirido por Moulinex, uma centrifuga modelo 5804 adquirido por eppendorf, uma balança analítica $\pm 0,0001$ g adquirido por Denver instrument e aparelho de pH modelo 713 (Metrohm). Um espectrofotómetro UV-vis modelo *evolution 220* adquirido por Thermo Scientific e um fluorímetro “homemade” constituído por uma fonte de alimentação estabilizada para alimentar um LED de 405 nm da Roithner Lasertechnik (Ref. LED450-01), um detetor CCD USB2000, fibra óticas com 0,6 mm de diâmetro (P600-2-UV-VIS) e porta-cuvetes de quatro vias (USB4000) da Oceanoptics.

3.2 Reagentes

Os reagentes utilizados foram: açafão adquirido por Pingo Doce, casca de abóbora Bolina adquirido por supermercado local; hidróxido de sódio, fosfato de potássio a 98 % adquirido por Panreac; ácido levulínico a 98 %, curcumina a 98 % e L-cistina a 98,5 % adquiridos por Sigma Aldrich; sulfato de cobre penta hidratado, dicromato de potássio, cromato de potássio, peróxido de hidrogénio a 50 %, ácido nítrico a 70 %, ácido clorídrico a 37 %, ácido sulfúrico a 97 % adquirido por Merck; *Quantum dots* de

cádmio-telúrio revestido por ácido tioglicol (TGA) e *quantum dots* de cádmio-telúrio revestido por ácido mercaptopropiônico (MPA) foram fornecidos pelo LabRise/ISEP.

3.3. Parte experimental

A síntese, purificação e caracterização dos CDoT foram realizadas por meio de um conjunto de técnicas aplicadas, conforme descrito a seguir.

3.3.1 Síntese do CDoT

A preparação da amostra foi adaptada de acordo com o método proposto por o (Gul *et al.* 2020). Inicialmente, recolheu-se cascas de abóbora bolina, e colocou-se em estufa a 80 °C durante 12 horas para retirar toda a sua humidade. Posteriormente, triturou-se amostra e armazenou-se em um frasco a temperatura ambiente.

O processo de síntese dos CDoT foi realizado em um solução de DEG através da irradiação de micro-ondas. Resumidamente, 0,2 g de biomassa foram dissolvidos em 20 g de DEG e 10 µl de ácido sulfúrico concentrado em um gobelé de vidro de 100 ml. Após agitação da solução, esta foi submetida à irradiação de micro-ondas por determinado período de tempo a uma potência de 700 W em micro-ondas. Ao final deste processo, foi arrefecido à temperatura ambiente. Uma amostra de 1,5 ml de solução resultante, que apresentava uma coloração escura, passou por um processo de purificação. Inicialmente, foi submetida a centrifugação à 14600 rpm durante 10 min. e, posteriormente, foi filtrada através dos microfiltros de seringa com poros de 0,22 µm. A solução filtrada obtida tem um volume final de cerca de 1,3 ml de solução de CDoT purificado. A Figura 26, apresenta as etapas realizadas na síntese e purificação do CDoT.

No processo de dopagem de CDoT, repetiu-se o processo de síntese e purificação. No entanto, em cada processo de síntese foi utilizado diferentes dopantes no qual são adicionados numa proporção de 0,50 mmol por cada 0,2 g de precursor. Os dopantes utilizados e as suas quantidades foram: 184 mg de curcumina, 70 mg de hexametenotetramina, 58 mg de dimetilgloxima, 120 mg de L-cistina, 79 mg de sulfato de cobre, 147 mg de dicromato de potássio e 97 mg de cromato de potássio.

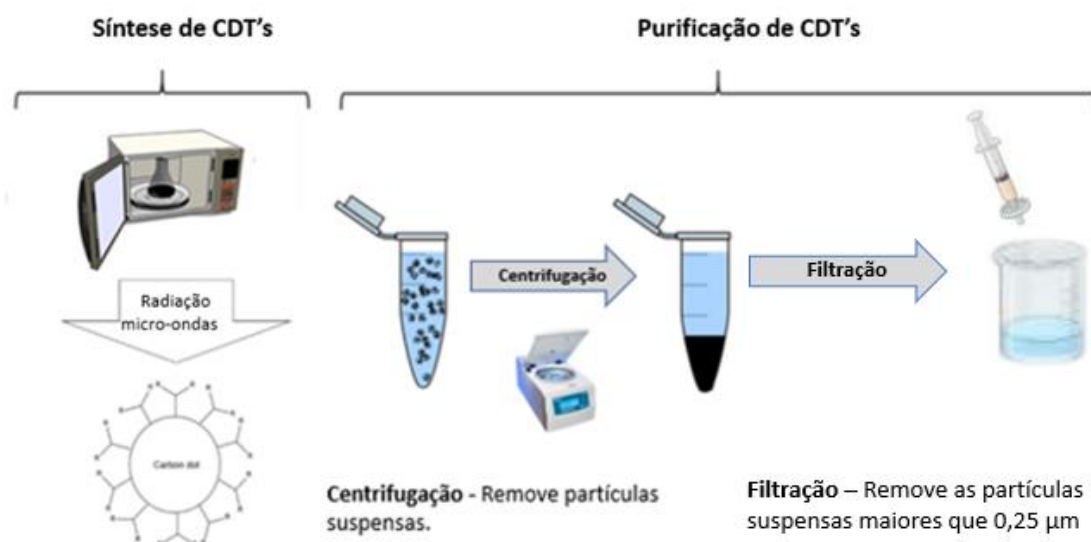


Figura 26. Representação das etapas da síntese de CDoT.

3.3.2 Espectroscopia UV-Vis

O espectro foi registado, utilizando soluções convenientemente diluídas com água desionizada à temperatura ambiente em um espectrofotómetro UV-Vis. Para essa finalidade, foi utilizado uma cuvete de quartzo com um caminho ótico de 10 mm e a varredura foi realizada no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 800 nm.

3.3.3 Espectroscopia de fluorescência

Os espectros de fluorescência, sob as soluções convenientemente diluídas com água desionizada foram registados à temperatura ambiente utilizando uma cuvete de plástico com caminho ótico de 10 mm. Os espectros foram capturados utilizando o *software spectrasuite* (versão 2.0.162 de 64 bit) e posteriormente processados usando o *software* Microsoft Excel 365. Os parâmetros de análise no *software spectrasuite* incluíram um período de tempo de integração de 100 ms, sendo a média de espectro de 1 e amaciamento de 11.

O LED utilizado como fonte de excitação foi posicionado de modo a formar um ângulo de 90° em relação ao sistema de deteção utilizado.

3.3.4 Influência do pH

Para investigar a influência do pH na luminescência do CDoT, foram realizados testes utilizando a solução tampão de fosfato de potássio a 0,100 mol L⁻¹, devido a sua ampla faixa de ação tamponante (de 5,8 a 8,0 valores de pH). O ajuste do pH foi feito com o uso de soluções de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio sendo controlada por meio de um aparelho de pH. Um alíquota de 100 µL do CDoT purificados foi diluído em 4,90 ml da solução tampão de pH conhecido e realizada as medidas. Os espectros de emissão foram obtidos com um comprimento de onda de excitação de 405 nm.

3.3.5 Deteção ao AL

O espectro foi registado à temperatura ambiente em um espectrofotómetro fluorescência usando uma cuvete de plástico com 10 mm de caminho ótico com excitação a 405 nm.

3.3.5.1 CDoT

Para avaliar a deteção do AL recorreu-se às seguintes etapas. Primeiro, adicionou-se numa cuvete de plástico 2,40 ml de CDoT purificados e, previamente diluídos 50 vezes. O espectro foi registado à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 100 µL de AL à solução e realizou-se novamente a medição. Os espectros obtidos foram posteriormente tratados usando o *software* Microsoft Excel 365.

Reste procedimento foi repetido para os CDoT dopados, permitindo a comparação dos resultados entre as amostras purificadas e dopadas.

3.3.5.2 *Quantum dots* de cádmio-telúrio

Para avaliar a deteção do AL foram seguidos os seguintes passos: adicionou-se numa cuvete de plástico 2,40 ml de QDoT e o espectro foi registado à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 100 µL de AL e realizou-se novamente a medição. Os espectros obtidos foram posteriormente tratados usando o *software* Microsoft Excel 365.

3.3.5.3 *Quantum dots* de cádmio-telúrio MPA

Previamente, 0,7 mg de MPA foram pesados e diluiu-se em 10 ml de água, resultando em uma solução com concentração de 0,17 g.L⁻¹. Posteriormente, essa solução foi diluída em 50 vezes.

Para verificar a detecção do AL foram adicionados 2,40 ml de QDOT numa cuvete de plástico e o espectro foi registado à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 100 µL de AL à solução e procedeu-se à medição novamente. Os espectros obtidos foram posteriormente tratados usando o *software* Microsoft Excel 365.

4. Resultados

Nesta secção discutiremos as características e funcionalidades relacionadas ao CDoT sintetizado e purificado são discutidos a seguir e objetivam evidenciar a integridade da nanopartícula avaliando as propriedades luminescentes do material e, também são mostradas algumas condições de otimização na síntese dos CDoT. Por fim, abordaremos a tentativa de detecção do AL.

4.1 Síntese de CDoT

No sentido de verificar se era possível substituir o DEG por água como um solvente mais ecológico e mais económico, foi feita a síntese dos CDoT em DEG e em água. É de referir que os CDoT foram sintetizados nas mesmas condições, a diferença está unicamente no solvente de síntese. Desta forma, a Figura 1 apresenta o resultado dos espectros de UV-vis do CDoT sintetizados em água e em DEG.

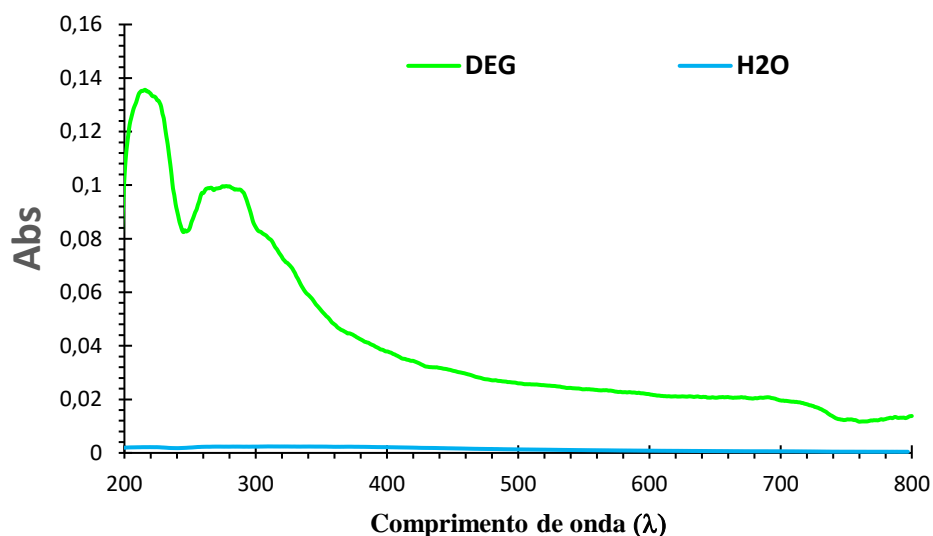


Figura 4.1 Espectro de absorvância da síntese de CDoT com diferentes solventes e com fator de diluição de 10x.
 Legenda: DEG – CDoT sintetizado em dietilenoglicol e H2O – CDoT sintetizado em água.

Conforme ilustrado na Figura 4.1, observa-se que a síntese de CDoT utilizando água resultou em uma mistura reacional cujo espectro de absorvância é muito semelhante ao da água, o que indica a ausência de síntese de nanopartículas. No entanto, o espectro de absorvância obtido na síntese com DEG apresenta um perfil típico de nanopartículas, com uma absorvância máxima de 0,13 em torno de 220 nm e uma queda na absorvância à medida que o comprimento de onda aumenta acima de 30 nm, o que é uma característica distintiva de nanopartículas.

No caso da síntese em água, não apresentou absorvância o que significa que não formou CDoT. Por um lado, quando aumenta o tempo síntese a matéria orgânica é carbonizada. A explicação é que a água é um solvente polar com um fator de perda δ (tan) de 0,105 isto indica que absorve mais fácil a radiação por micro-ondas. Consequentemente a matéria orgânica é degradada mais rapidamente e, além disso também devido ao ponto de ebulição baixo, a água é totalmente evaporada durante o processo, o que resulta numa dificuldade em obter uma solução de CDoT. Por outro lado, se reduzir o tempo de síntese causará uma carbonização insuficiente o que leva a uma formação de CDoT inadequada, consequentemente, não apresenta absorvância. Este ensaio foi realizado com uma quantidade de 0,200 g de matéria orgânica dissolvida em 20,0 ml de água.

É importante ressaltar que para síntese de CDoT conduzida por micro-ondas, dos dois solventes experimentados, o ideal é o DEG.

4.1.1 Otimização do tempo de síntese

Para este estudo, optou-se por analisar a característica fluorescente, uma vez que a quantidade de nanopartículas formadas está diretamente relacionada com a quantidade de CDoT gerados, conforme ilustrado na Figura 4.1.1. O sinal de primeira ordem a 405 nm indica o desvio de luz devido a formação de sólidos em suspensão e o sinal de segunda ordem a 500 nm, indica a fluorescência dos CDoT formados quando excitados a 405 nm.

Inicialmente, observou-se um aumento na fluorescência dos CDoT com o prolongamento do tempo de reação, Figura 4.1.1-A, evidenciando a primeira etapa de formação dessas partículas, que se estende

até aproximadamente 95 segundos, como indicado na Figura 4.1.1-B. Posteriormente, à medida que o tempo de reação se prolonga, a fluorescência dos CDoT diminui, esse decréscimo está associado à carbonização progressiva da matéria orgânica.

Este trabalho visou determinar o tempo ideal para realizar a síntese de CDoT nas condições descritas em 3.3.1, utilizando casca de abóbora triturada como matéria orgânica, na quantidade de 0,200 g, dissolvida no solvente DEG.

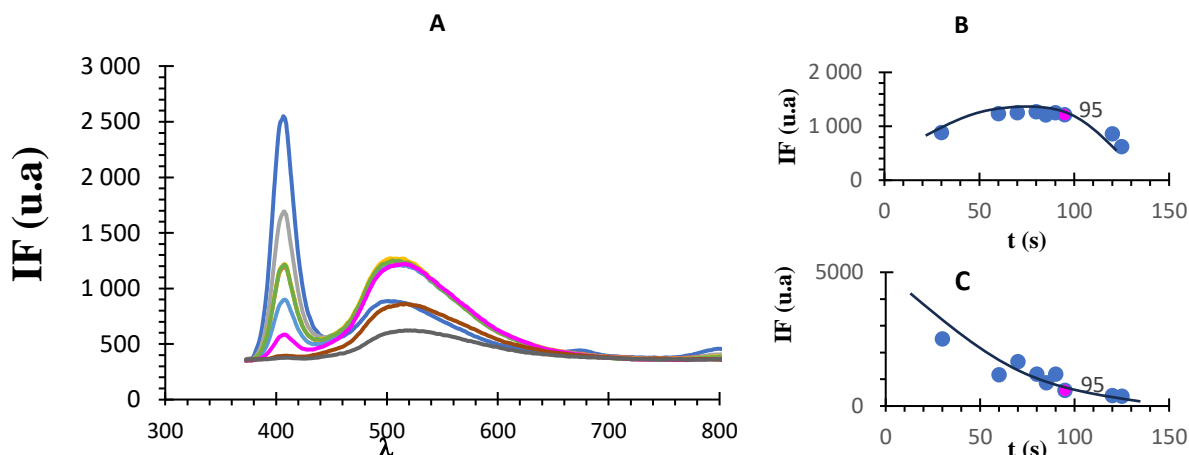


Figura 4.1.1. A - Espectro de intensidade de fluorescência no melhor tempo para a síntese de CDoT excitado a 405 nm; B-Evolução da intensidade de fluorescência em função do tempo de síntese ao comprimento de onda de emissão a 511,43 nm; C- Evolução da intensidade de dispersão em função do tempo de síntese ao comprimento de onda de 405,06 nm.

De acordo com a Figura 4.1.1-A verificou-se que o CDoT excitado a 405 nm, independentemente do tempo de síntese, apresenta uma emissão a 500 nm. É de notar que verificou-se que a medida que prolonga o tempo de síntese o sinal de primeira ordem reduz, indicando que há menos desvio de luz devido a uma maior formação de CDoT. No entanto, com o prolongamento do excesso de tempo também faz com que o sinal de segunda ordem seja reduzido, devido a carbonização total da matéria orgânica.

De acordo a Figura 4.1.1-B, verificou-se que após 95 s apresenta uma maior intensidade de fluorescência, atingindo 1300 unidades de uma intensidade e uma emissão de 511,43 nm. Este tempo foi escolhido pois apresenta, também, uma menor dispersão de primeira ordem. Figura 4.2-C. Isso indica uma redução na formação de sólidos suspensos, tornando esse período de reação de 95 s ideal para síntese de CDoT.

4.1.2 Purificação dos CDoT

Com objetivo de determinar qual seria a técnica de purificação mais eficiente para obter a solução de CDoT purificado, foi utilizada centrifugação e a filtração, por serem económicas, rápidas e reprodutíveis.

4.1.2.1 Purificação do CDoT por centrifugação

Com o intuito de determinar a técnica de purificação mais eficaz do CDoT, inicialmente procedeu-se à purificação do CDoT aplicando exclusivamente a centrifugação. É de referir que os CDoT foram purificados em diferentes condições. A condição “A” foi utilizada uma rotação de 10000 rpm durante 5 min. A condição “B” foi utilizada uma rotação de 14600 rpm durante 5 min e condição “C” foi utilizada uma rotação de 14600 durante 10 min.

O estudo do efeito das diferentes condições de purificação do CDoT permite conhecer as propriedades óticas do CDoT, Figura 4.1.2.1-A. A fluorescência do CDoT aumenta de acordo com o aumento da rotação e do tempo de centrifugação.

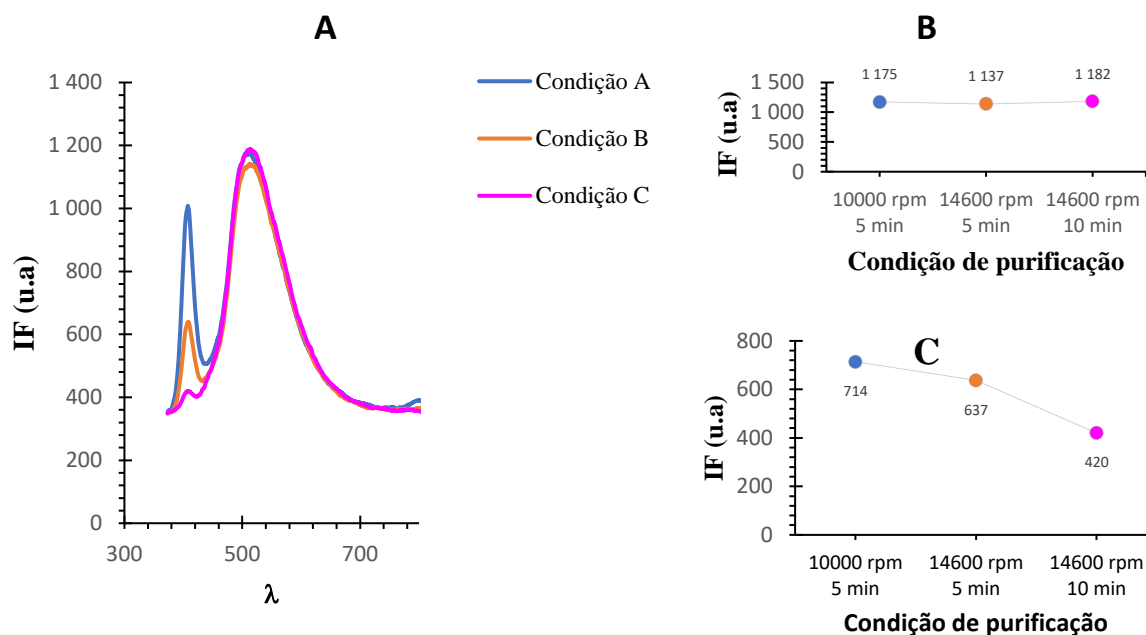


Figura 4.1.2.1. A- Espectro de intensidade de fluorescência de purificação por centrifugação do CDoT obtido da casca de abóbora excitado a 405nm; B-Evolução de intensidade de fluorescência das diferentes condições de purificação, emitido a 511,43 nm; C- Evolução de intensidade de dispersão das diferentes condições emitido a 405,06 nm.

De acordo com a Figura 4.1.2.1-A e B, verificou-se que a melhor condição de centrifugação é de 14600 rpm durante 10 min. Esta condição demonstrou um sinal de fluorescência mais elevado, 1182 intensidade de fluorescência. Além disso, apresenta uma melhor separação dos sólidos em suspensão dos CDoT conforme ilustrado na Figura 4.1.2.1-C, menor dispersão de primeira ordem, indicando uma quantidade menor de sólidos em suspensão.

Assim, pode-se concluir que para purificação de CDoT o ideal é uma centrifugação com 14600 rpm durante 10 min.

4.1.2.2 Purificação do CDoT por centrifugação e filtração

Para dar continuidade ao processo de purificação, após a centrifugação, realizou-se posteriormente uma filtração com filtro de 0,22 μm. É de referir que os CDoT foram apenas centrifugados em diferentes condições: Condição “A” foi utilizada uma rotação de 10000 rpm durante 5 min. A condição “B” foi utilizada uma rotação de 14600 rpm durante 5 min e condição “C” foi utilizada uma rotação de 14600 durante 10 min.

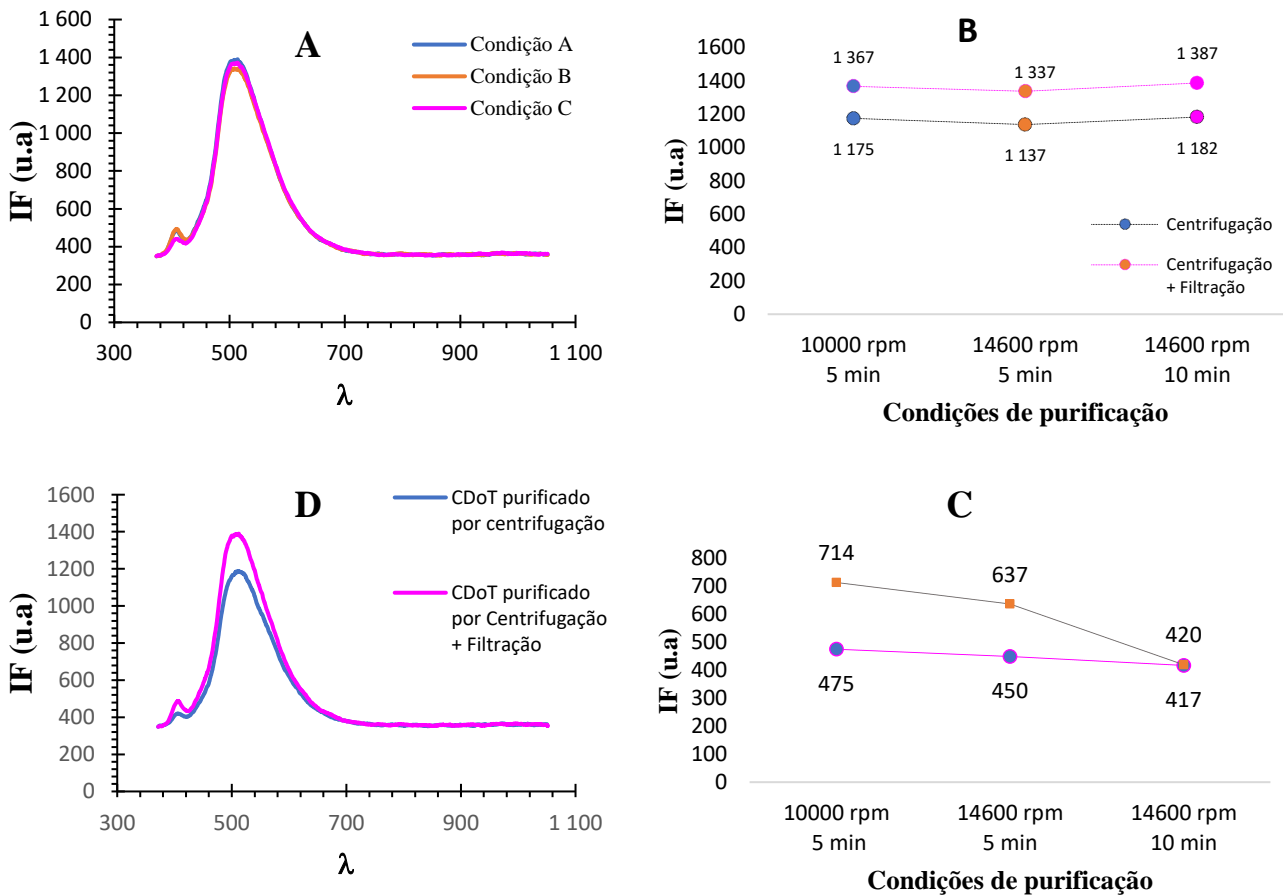


Figura 4.1.2.2. A- Espectro de intensidade de fluorescência de purificação por centrifugação e filtração do CDoT obtido da casca de abóbora excitado a 405nm; B-Perfil de intensidade de fluorescência das diferentes condições de purificação, emitido a 511,43 nm; C- Perfil de intensidade de dispersão das diferentes condições emitido a 405,06 nm; D – Espectro de intensidade de fluorescência por centrifugação e centrifugação com filtração do CDoT apenas na condição “C” excitado a 405 nm.

Desta forma, verificou-se que a condição de purificação “C” com uma filtração foi a que apresentou um maior sinal de fluorescência, 1187, Figura 4.1.2.2-B e D. No entanto, a dispersão de primeira ordem decresceu significativamente, Figura 4.1.2.2-C. Embora, a evidência de maior intensidade de fluorescência não ser forte, escolheu-se a condição C de centrifugação, pois apresenta menor quantidade de sólidos em suspensão.

4.1.3 Análise dos fatores de diluição

No sentido de verificar qual a melhor concentração de CDoT no meio para a detecção ao AL, realizou-se uma série de diluições a partir da mistura original e avaliou-se a intensidade de fluorescência. Consideramos uma concentração adequada aquela na qual o aumento do fator de diluição provoca uma diminuição do sinal de fluorescência. Este estudo abrangeu tanto os CDoT sintetizado a partir da casca de abóbora nas condições descritas em 3.3.1 como também todos os CDoT dopados com sulfato de cobre, dimetilglioxima, cromato de potássio, dicromato de potássio, hexametilenotetramina, L-cistina e curcumina, Figura 4.1.3.

A intensidade de fluorescência foi realizada nas soluções de CDoT devidamente diluídas com água desionizada.

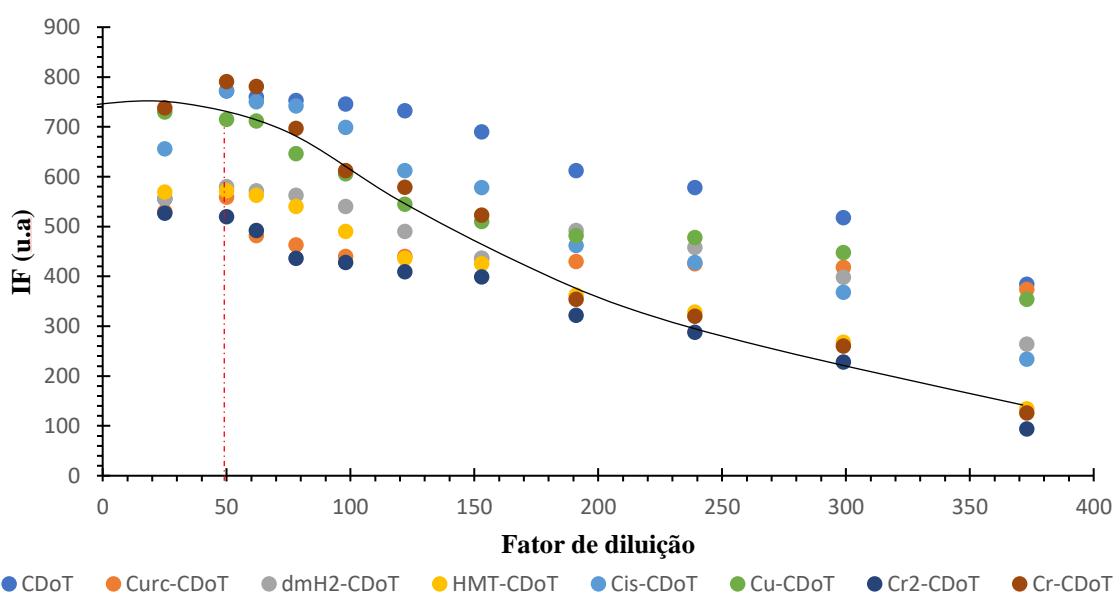


Figura 4.1.3. Zona ideal de trabalho com fator de diluição para CDoT derivado de abóbora bolina emitido a 511,43 nm.
Legenda: CDoT-Pontos de carbono derivado da casca de abóbora; Curc-CDoT- ponto de carbono dopado com curcumina; dmH2-CDoT-ponto de carbono dopado com dimetilglioxima; HMT-CDoT-ponto de carbono dopado com hexametilenotetramina; Cis-CDoT – ponto de carbono dopado com L-cistina; Cu-CDoT-ponto de carbono dopado com sulfato de cobre; Cr2-CDoT-ponto de carbono dopado com dicromato de potássio; Cr-CDoT-ponto de carbono dopado com cromato de potássio.

De acordo com a Figura 4.1.3, de uma forma geral, todos os CDoT testados apresentam um fator de diluição ideal que deve ser superior a 50 vezes. A partir desta concentração torna-se evidente que uma diminuição da concentração do fluoróforo implica uma diminuição da intensidade de fluorescência.

4.2 Análise da reação do CDoT com AL

No sentido em estudar a aplicação do CDoT como sensor de AL, verificou-se que era necessário realizar experimentos com CDoT dopado. No entanto, em cada processo de síntese foi utilizado diferentes dopantes no qual são adicionados numa proporção de 0,50 mmol por cada 0,2 g de precursor, a condição de síntese do CDoT dopado está descrita em 3.3.1.

O AL apresenta na sua estrutura dois grupos funcionais: ácido carboxílico (COOH) e cetona (C=O). O átomo de oxigênio é mais eletronegativo que o átomo de carbono, portanto, possui maior habilidade de atrair elétron para si em comparação com o átomo de carbono. Assim os elétrons π da ligação C=O tendem a transferir uma maior densidade eletrônica para o átomo de oxigênio, levando a criação de uma carga positiva no átomo de carbono. O centro eletrofílico do átomo de carbono é de importância fundamental para as reações químicas do grupo carboxilo, pois um ataque nucleofílico é favorecido nestas condições.

Desta forma, os dopantes utilizados para os ensaios foram escolhidos de acordo com o grupo funcional que possuem e capazes de reagir com o AL. A Curcumina apresenta na sua estrutura uma grande quantidade de grupos de metoxila (OCH₃) e esperou-se que reagisse com grupo carboxilo do AL por substituição nucleofílica.

Dimetilglioxima possui grupo de oximas (RR'-C=NOH). Em geral as oximas podem ser transformadas na amida (R-CONH₂) através de reação com um ácido.

Hexametilenotetramina constitui na sua estrutura grupo amina (NH₃) e pode reagir com o ácido carboxílico reação de substituição nucleofílica.

Cromato de potássio, dicromato de potássio reduz o ácido carboxílico, enquanto o sulfato de cobre oxida o ácido carboxílico através de ligação covalente de coordenação, o que pode causar uma formação de quelatos.

L-cistina apresenta na sua estrutura grupo amina (NH₂) e o radical ácido carboxílico (COOH) podem ligar-se covalentemente no grupo do ácido carboxílico do AL, através da reação de substituição nucleofílica.

Além do teste de reação com os CDoT, experimentou-se a reação do AL a outras nanopartículas, como *quantum dots* de cádmio telúrio com diferentes estabilizadores tais como o MPA e TGA, ambos apresentam na sua estrutura o grupo tiol (HS).

O efeito do AL sobre as nanopartículas foi estudado pela adição de 100 μ l de AL a 98 % a 2,4 ml de sensor químico devidamente diluída.

- CDoT

De acordo com a Figura 4.2.1, verificou-se que a fluorescência não altera com a presença do AL, ou seja, os pontos de carbonos derivados da *casca abóbora bolina* não reage com AL o que leva ao resultado não satisfatórios para aplicação como sensor de AL. Desta forma, foi realizado novos estudos para tornar o ponto de carbono sensível ao AL. Uma das formas a realizar é uma técnica conhecida por dopagem.

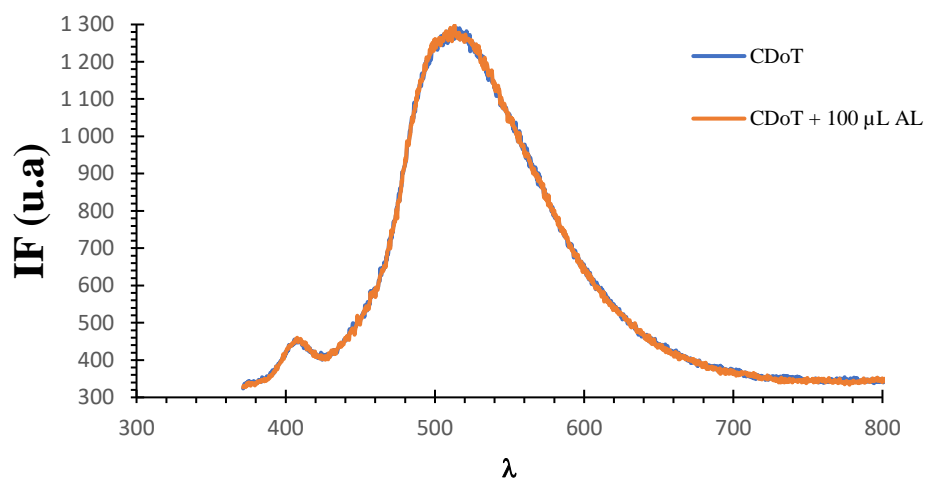


Figura 4.2.1. Espectro de emissão de pontos de carbonos derivado cucurbita máxima quando é excitado a 405 nm.

- Efeito do pH

No sentido de verificar o impacto do pH do meio na estabilidade do CDoT, ou seja, se condiciona os CDoT de estarem em suspensão devido o ponto isoelétrico, realizou-se um estudo focalizado nos CDoT sintetizados a partir da abóbora. O efeito da influência do pH, na intensidade de sinal de luminescência, foi avaliado entre 2,25 a 12,12. A intensidade de fluorescência do CDoT pode ser observada na Figura 4.2.2. Nesta análise, as configurações no fluorímetro incluíram uma janela de 400 ms com a média de espectro de 1 com um amaciamento de 11.

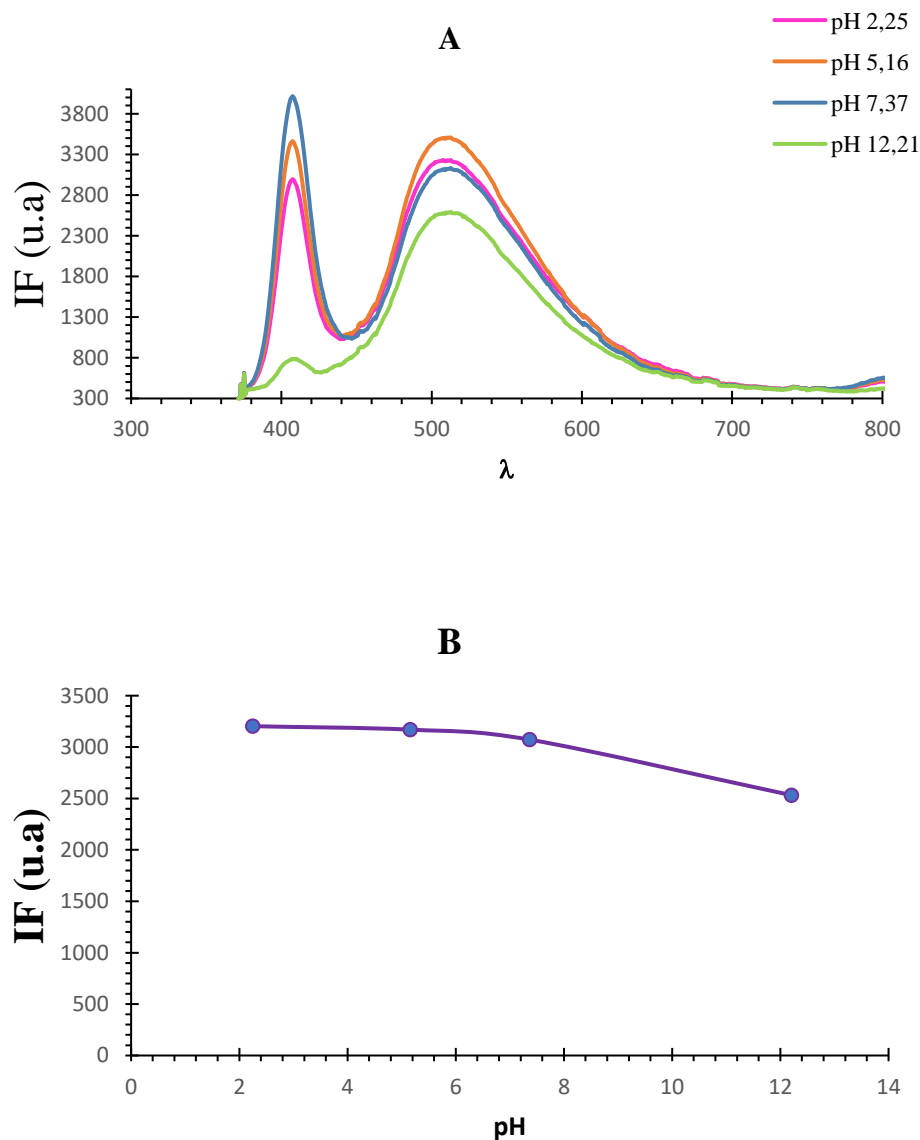


Figura 4.2.2. A-Espectro de emissão de CDoT em diferentes soluções tampão, excitado em 405 nm; B-Intensidade de fluorescência em diferentes soluções tampão, emitido a 511,43 nm.

Como apresentado na Figura 4.2.2-B, não houve uma variação significativa de intensidade de sinal entre os valores de pH de 2,25 e 7,37. Contudo, no meio com pH de 2,25 não foi observado uma supressão significativa da intensidade a diminuir consideravelmente a fluorescência do CDoT. Desta forma, o meio com pH ácido afeta apenas o sinal de primeira ordem o que indica formação de sólidos suspensos.

Concluiu-se que adição de AL é uma adição ácido e o efeito do pH não afeta significativamente a intensidade de fluorescência dos CDoT para valores baixos de pH.

- CDoT dopado com cromato de potássio

No sentido de estudar a aplicação do CDoT como sensor de AL, experimentou-se dopar CDoT com 97 mg de cromato de potássio na síntese. O cromato de potássio, possui um íon CrO_4^{2-} e espera-se que reduz o ácido carboxílico através de ligação covalente de coordenação, o que pode causar uma formação de quelatos.

De acordo com a Figura 4.2.3, verificou-se que a dopagem com cromato de potássio não houve alteração na fluorescência. Isto indica que o AL não apresenta especificidade com este íon. Contudo, a

variação da intensidade de fluorescência foi pouco significativa. No entanto, devido a formação do pico de primeira ordem indica que há formação de sólidos suspensos e, também não reage com o AL, o que leva ao resultado não satisfatórios para aplicação como sensor.

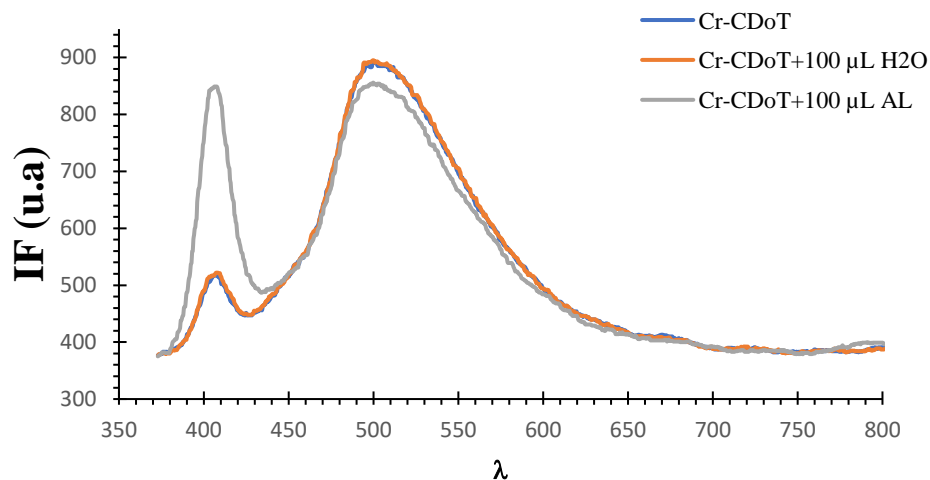


Figura 4.2.3. Espectro de emissão de pontos de carbonos dopado com cromato quando é excitado a 405 nm.

- CDoT dopado com dicromato de potássio

No sentido de estudar a aplicação do CDoT como sensor de AL, experimentou-se dopar CDoT com 147 mg de dicromato de potássio na síntese dos CDoT dopados.

Dicromato de potássio, possui um ião $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ e espera-se que reduz o ácido carboxílico através de ligação covalente de coordenação, o que pode causar uma formação de quelatos.

De acordo com a Figura 4.2.4, verificou-se que ao adicionar AL o sinal de fluorescência altera, entretanto, há um aumento significativo no sinal de primeira ordem. Desta forma, pode-se concluir que o AL apresenta uma reação com CDoT dopado dicromato, pois ocorre reação que, por sua vez aumenta o sinal de primeira ordem indicando formação de partículas em suspensão o que leva ao resultado não satisfatórios para aplicação como sensor.

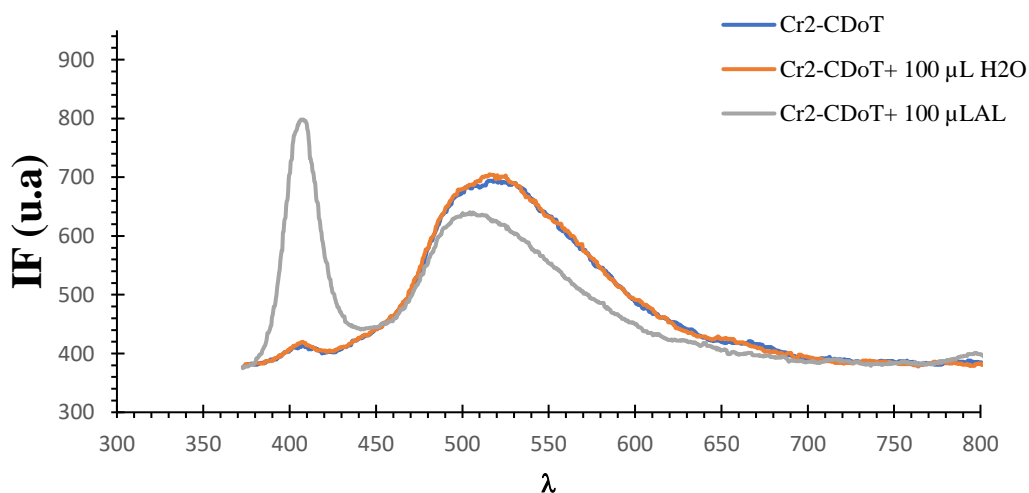


Figura 4.2.4. Espectro de emissão de pontos de carbonos dopado com dicromato quando é excitado a 405 nm.

- CDoT dopado com sulfato de cobre

No sentido de estudar a aplicação do CDoT como sensor de AL, experimentou-se dopar CDoT com e 79 mg de sulfato de cobre na síntese pois o sulfato de cobre, possui um íon Cu^{2+} e espera-se que oxida o ácido carboxílico através de ligação covalente de coordenação, o que pode causar uma formação de quelatos.

De acordo com a Figura 4.2.5, verificou-se que a dopagem do CDoT com sulfato de cobre apresentou aparentemente uma interação com o analito, ou seja, a variação da intensidade de fluorescência ocorreu. No entanto, devido o aumento significativo do sinal de primeira ordem indica que há formação de sólidos suspensos, o que leva ao resultado não satisfatórios para aplicação como sensor.

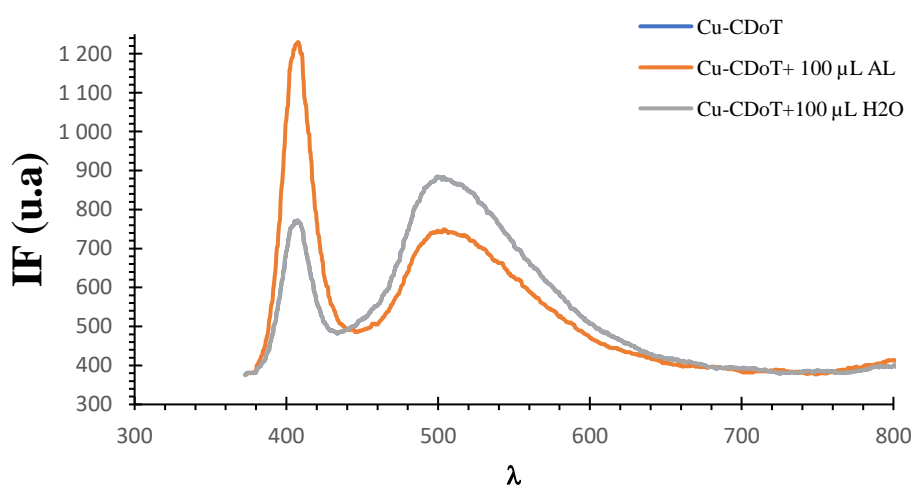


Figura 4.2.5. Espectro de emissão de pontos de carbonos dopados com cobre quando é excitado a 405 nm.

- CDoT dopado com L-Cistina

No sentido de estudar a aplicação do CDoT como sensor de AL, dopou-se o CDoT com 120 mg de L-cistina na síntese. A L-cistina apresenta na sua estrutura o grupo amina (NH_2) o que permite ligar-se covalentemente no grupo do ácido carboxílico do AL, através da reação de substituição nucleofílica.

De acordo com a Figura 4.2.6, verificou-se que o CDoT dopado com L-cistina ao adicionar AL o sinal de fluorescência altera, entretanto, ocorre uma sobreposição de sinal de fluorescência. Este fenômeno acontece devido a substância cisteína ser fluorescente e emitir no mesmo comprimento de onda do sensor causando uma sobreposição de sinais. Desta forma, pode-se concluir que o AL aparenta apresentar reação com L-cistina pois apresentou uma interação com o analito, mas não obteve resultados satisfatórios para aplicação como sensor.

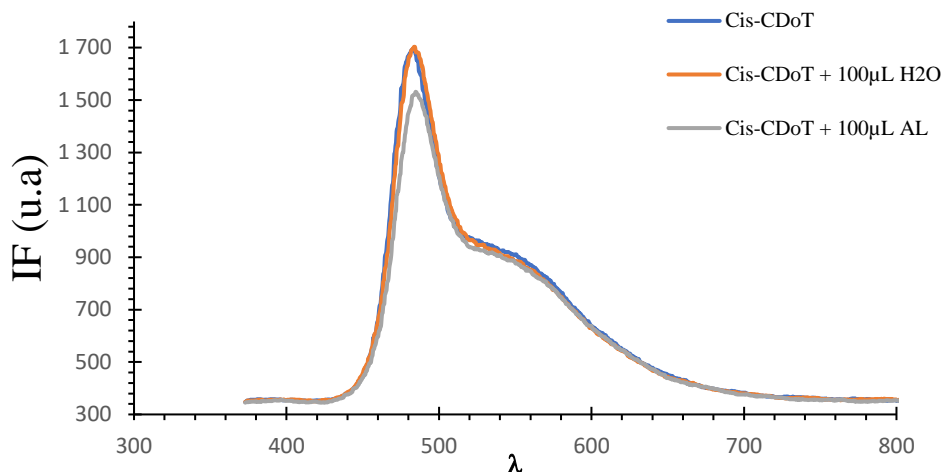


Figura 4.2.6. Espectro de emissão de pontos de carbono dopado com L-cistina quando é excitado a 405 nm.

- CDoT dopado com dimetilglioxima

No sentido de estudar a aplicação do CDoT como sensor de AL, dopou CDoT com 58 mg de dimetilglioxima na síntese. Dimetilglioxima possui grupo de oximas ($RR'-C=NOH$). Em geral as oximas podem ser transformadas na amida ($R-CONH_2$) através de reação com um ácido.

De acordo com a Figura 4.2.7, verificou-se que o ponto de carbono dopado com dimetilglioxima ao adicionar AL o sinal de fluorescência não altera, entretanto, ocorre uma sobreposição de sinal de fluorescência. Este fenômeno acontece devido a substância dimetilglioxima ser fluorescente e emitir no mesmo comprimento de onda do sensor causando uma sobreposição de sinais. Desta forma, pode-se concluir que o AL não apresenta resultados satisfatórios para aplicação como sensor.

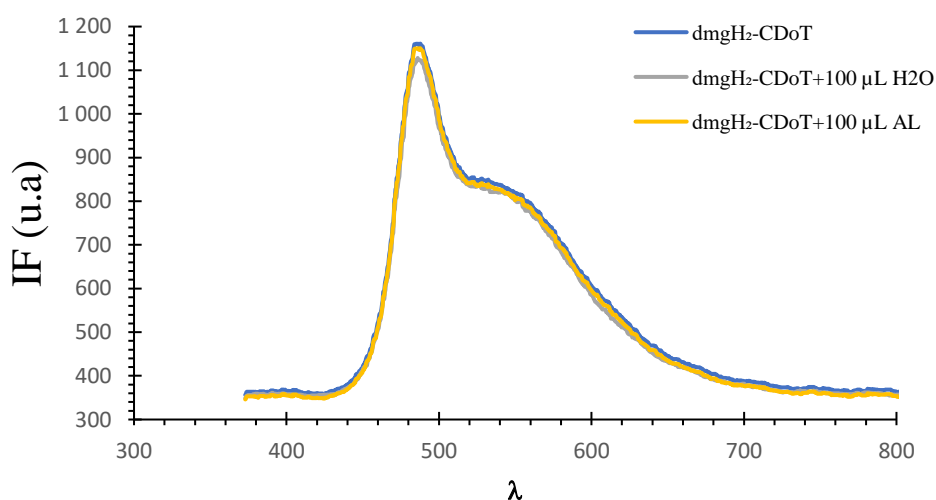


Figura 4.2.7. Espectro de emissão de pontos de carbono dopado com dimetilglioximal quando é excitado a 405 nm.

- CDoT dopado com hexametilenotetramina

No sentido de estudar a aplicação do CDoT como sensor de AL, dopou CDoT com 70 mg de hexametilenotetramina na síntese. Hexametilenotetramina constitui na sua estrutura o grupo amina (NH_3) e esperou-se que ocorresse uma reação com o ácido carboxílico através de reação de substituição nucleofílica.

De acordo com a Figura 4.2.8, verificou-se que o ponto de carbono dopado com hexametilenotetramina ao adicionar AL o sinal de fluorescência não altera, entretanto. Desta forma, pode-se concluir que o AL não reage com o grupo funcional amina o que leva ao resultado não satisfatórios para aplicação como sensor.

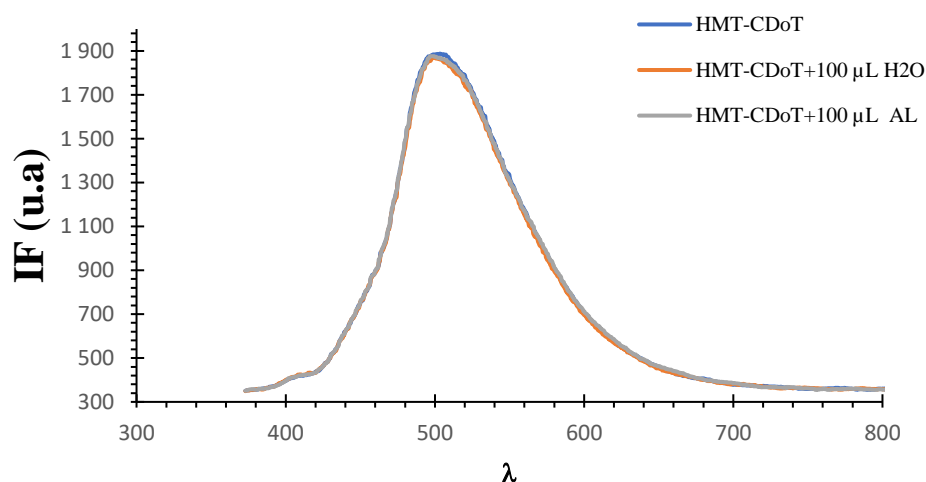


Figura 4.2.8. Espectro de emissão de pontos de carbonos dopado com hexametilenotetramina quando é excitado a 405 nm.

- CDoT dopado com curcumina

No sentido de estudar a aplicação do CDoT como sensor de AL, dopou CDoT com 184 mg de curcumina na síntese. A Curcumina apresenta na sua estrutura uma grande quantidade de grupos de metoxila (OCH_3) e esperou-se que reagisse com grupo carboxilo do AL por substituição nucleofílica.

O espectro de fluorescência obtido para os CDoT dopados com curcumina é bastante diferente dos restantes CDoT estudados, apresenta uma intensidade significativamente diferente.

De acordo com a Figura 4.2.9.1, ao adicionar o AL o sinal não altera, entretanto, ocorre uma reação que deve ser estudada para ser bem compreendida. Esta reação é apenas notável com a precipitação do AL, Figura 4.2.9.2. No entanto, foi feito um estudo com diferentes ácidos, tais como: ácido clorídrico, ácido sulfúrico e ácido nítrico, todos com equidade molar. Verificou-se que a reação também ocorre na presença destes ácidos inorgânicos. Concluiu-se que CDoT dopado com curcumina não apresenta reação com AL, o que leva ao resultado não satisfatório para aplicação como sensor de AL.

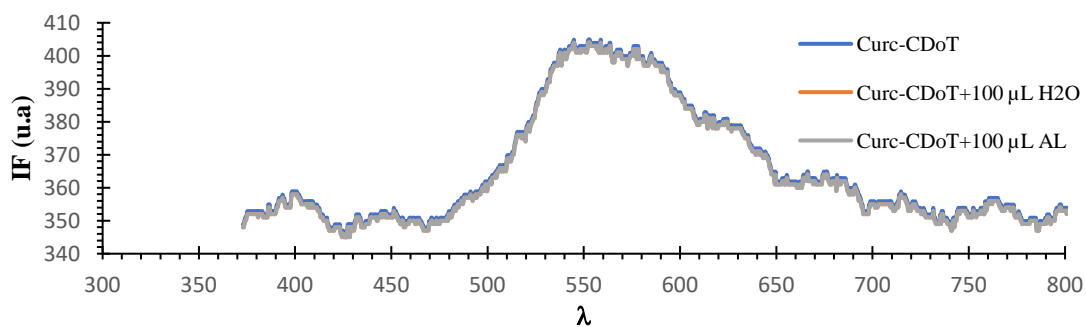


Figura 4.2.9.1. Espectro de emissão de pontos de carbonos dopado com curcumina quando é excitado a 405 nm.

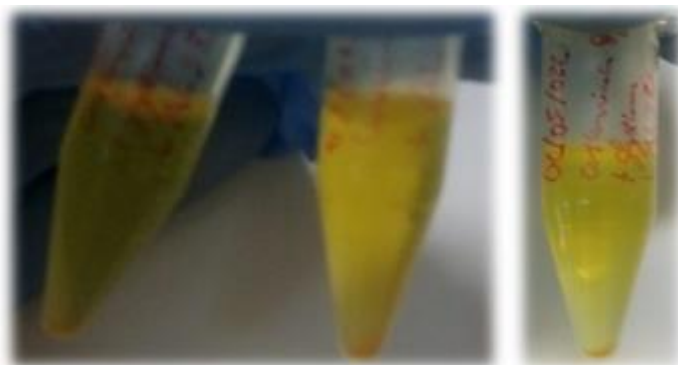


Figura 4.2.9.2. Precipitação do ácido levulínico com pontos de carbonos funcionalizados com curcumina.

- CDoT dopado com curcumina e dimetilglioxima

No sentido de estudar a aplicação do CDoT como sensor de AL, dopou CDoT com 184 mg de curcumina e com 58 mg de dimetilglioxima na síntese. Recorreu-se os dois dopantes pois pretendia aumentar a capacidade do CDoT em ter grupos de metoxila (OCH₃) proveniente da curcumina e grupo de oximas (RR'-C=NOH) proveniente do dimetilglioxima. Em geral esperou-se que reagisse com grupo carboxilo do AL por substituição nucleofílica.

De acordo com a Figura 4.2.10, verificou-se que ao adicionar ácido levulínico o sinal de fluorescência altera, entretanto, há uma redução significativo na intensidade de fluorescência. Desta forma, pode-se concluir que o ácido levulínico apresenta uma reação com CDoT dopado com curcumina e dimetilglioxima.

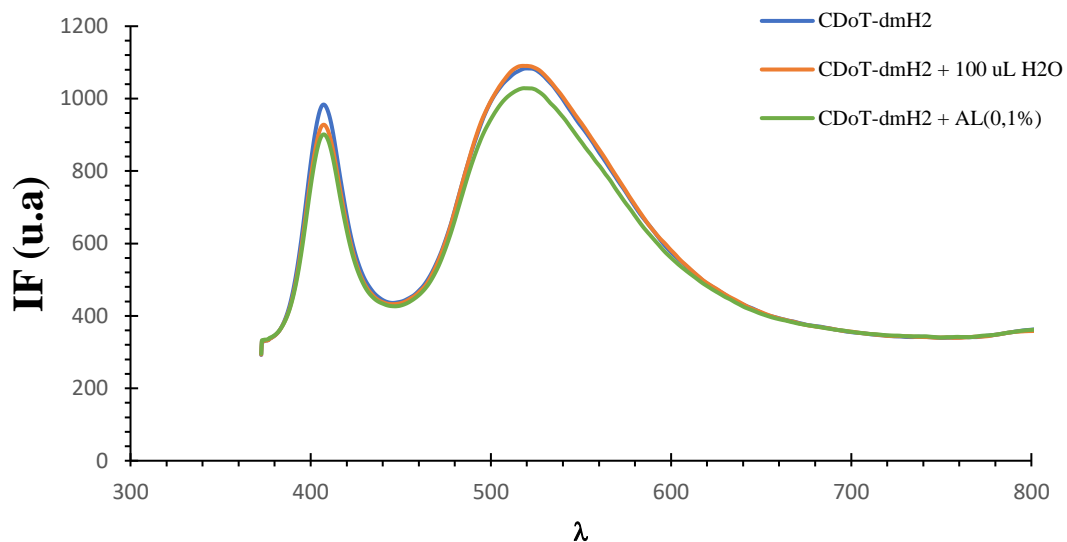
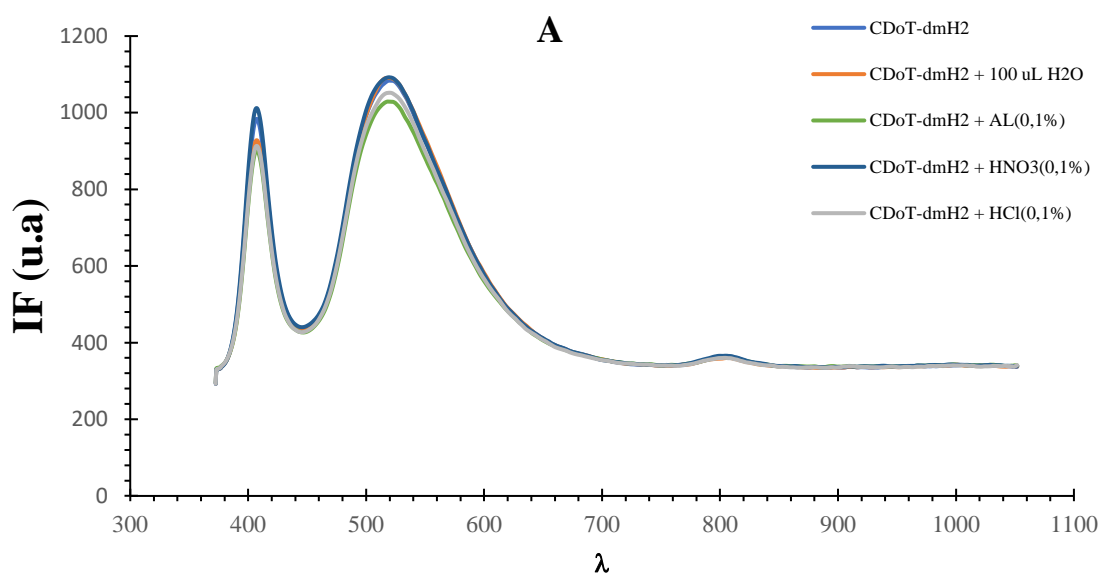


Figura 4.2.10.1. Espectro de emissão de CDoT dopado com dimetilglioxima, excitado a 405 nm. Legenda: CDoT-dmH2 – ponto de carbono dopado com curcumina e dopado com dimetilglioxima.

No sentido de verificar se o CDoT reage com diferentes ácidos, foi feito um estudo com ácido clorídrico e ácido nítrico, todos com equidade molar, Figura 4.2.10.2.



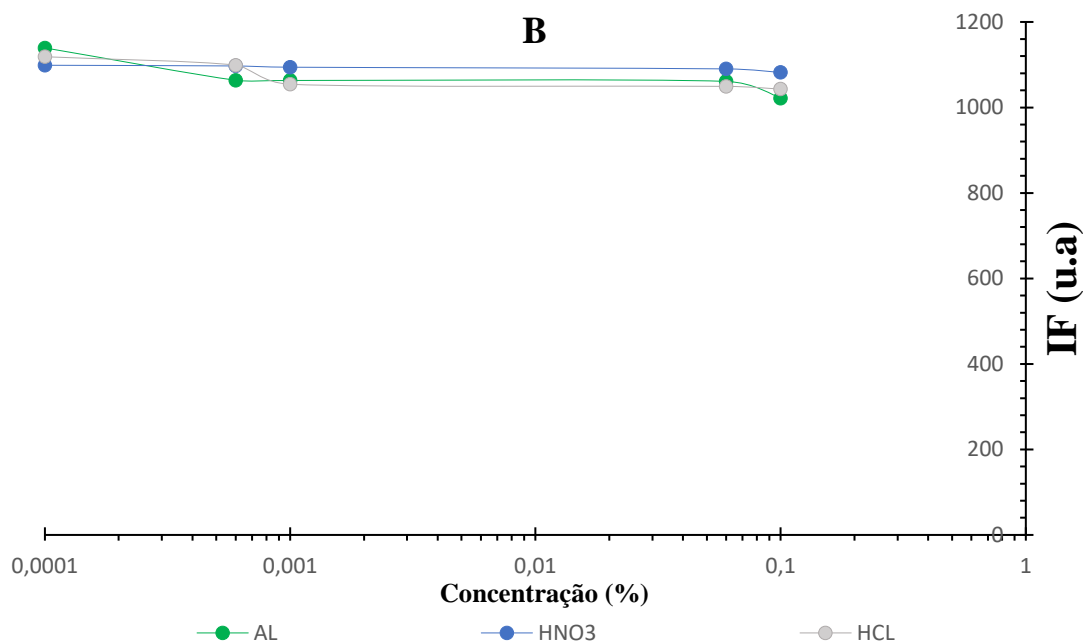


Figura 4.2.10.2. A- Espectro de emissão de CDoT dopado com dimetilglioxima com adição de diferentes ácidos em equimolar, excitado a 405 nm; B- Intensidade de fluorescência do dmH2-CDoT com adição de ácidos, emitido a 511,43 nm.
 Legenda: CDoT- dmH2 – Ponto de carbono dopado com curcumina e dimetilglioxima.

De acordo com a Figura 4.2.10.2-A, ao adicionar o ácido levulínico o sinal diminui, entretanto, ocorre uma reação que deve ser estudada para ser bem compreendida. Esta reação é apenas notável com a redução de intensidade de fluorescência, juntamente, com o aumento de sinal de primeira ordem. Desta maneira, foi experimentado com outros ácidos, tais como: ácido clorídrico e ácido nítrico em diferentes concentrações com equidade molar, Figura 4.2.10.2-B.

Com a evidência de uma redução pouco significativa da intensidade de fluorescência, concluiu-se que CDoT dopado com curcumina e dimetilglioxima não apresenta reação com AL, pois o comportamento com a adição de AL é semelhante dos restantes ácidos o que leva ao resultado não satisfatório para uma possível aplicação como sensor de AL.

- Quantum dots de cádmio-telúrio revestidos com TGA

De acordo com a Figura 4.2.11.1, a variação da intensidade de fluorescência é praticamente extinta com a adição de AL, o que leva ao resultado não satisfatório para aplicação como sensor.

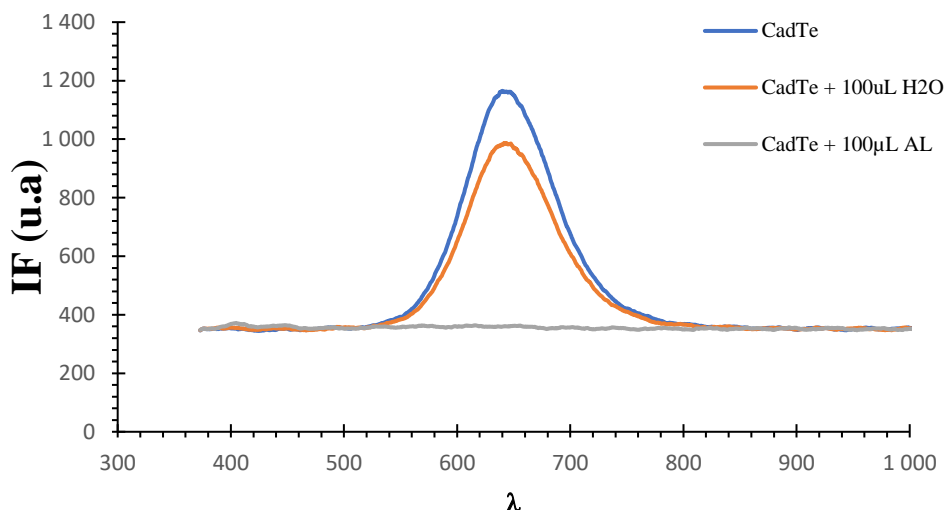


Figura 4.2.11.1. Espectro de emissão de QdoT de Cádmió-telúrio revestido com TGA quando é excitado a 405 nm.

Verificou-se com que ao adicionar o AL na cuvette ocorre a precipitação em poucos minutos, Figura 4.2.11.2. Suspeitando-se que este fenómeno ocorra com outros ácidos inorgânicos tais como: ácido clorídrico, ácido nítrico e ácido sulfúrico. Sendo assim, foi realizado estudo do efeito do pH no meio para verificar se o pH afeta a camada de superfície dos pontos de carbonos, o seu ponto isoelétrico, condiciona a estabilidade dos pontos de carbono de estarem em suspensão.



Figura 4.2.11.2. Precipitação do ácido levulínico com QdoT de cádmio- telúrio revestido com TGA.

- Quantum dots de cádmio-telúrio revestido com MPA

Como se verificou que havia diminuição brusca da intensidade de fluorescência com a adição do AL concentrado, estudou-se o efeito da adição com várias concentrações de AL, Figura 4.2.12. Desta forma, recorreu-se a uma solução de *quantum dots* revestido de ácido mercaptopropiónico (MPA).

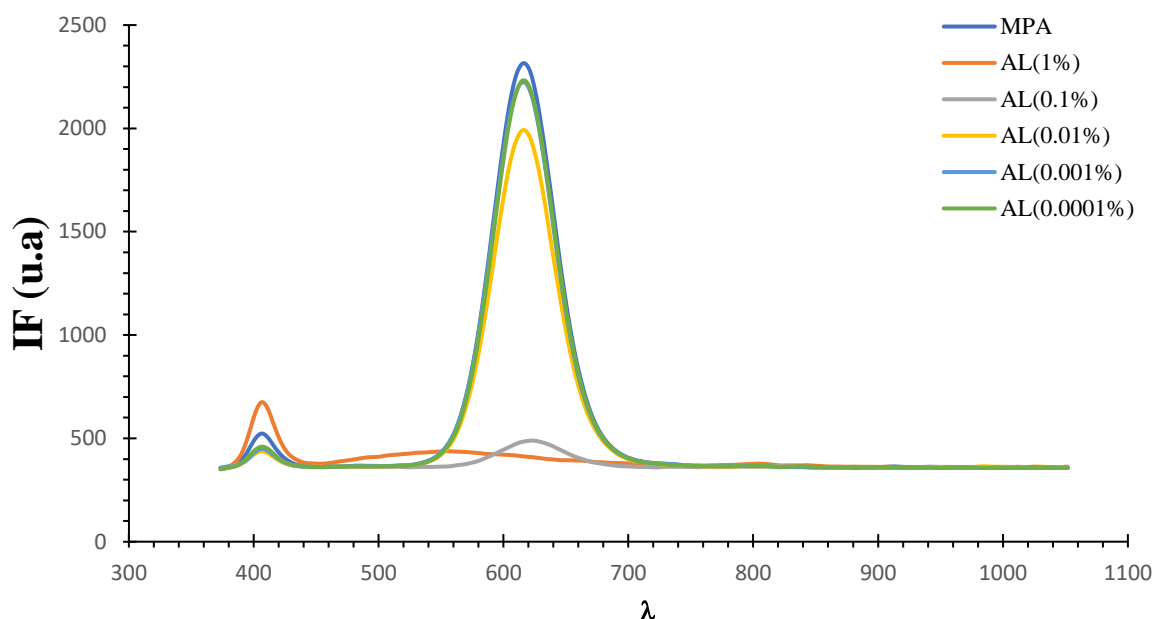


Figura 4.2.12. Espectro de emissão de MPA em diferentes concentrações de AL, excitado em 405 nm; B-Intensidade de fluorescência do MPA em diferentes concentrações de AL, emitido a 611,36 nm. Legenda: AL – Ácido levulínico.

De acordo com a Figura 4.2.12, verificou-se que o MPA reage com adição de AL num intervalo de concentração de 1 % a 0,0001 %.

No entanto, foi feito um estudo com diferentes ácidos: ácido clorídrico, ácido sulfúrico e ácido nítrico, todos com equidade molar para verificar se a reação também ocorre na presença destes ácidos.

- *Quantum dots MPA com diferentes ácidos*

No sentido de verificar se o MPA reage com diferentes ácidos, repetiu-se o ensaio com a adição de ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido clorídrico e ácido levulínico em equidade molar. A concentração variou no intervalo de 0,001 % a 0,000001 %, Figura 4.2.13.

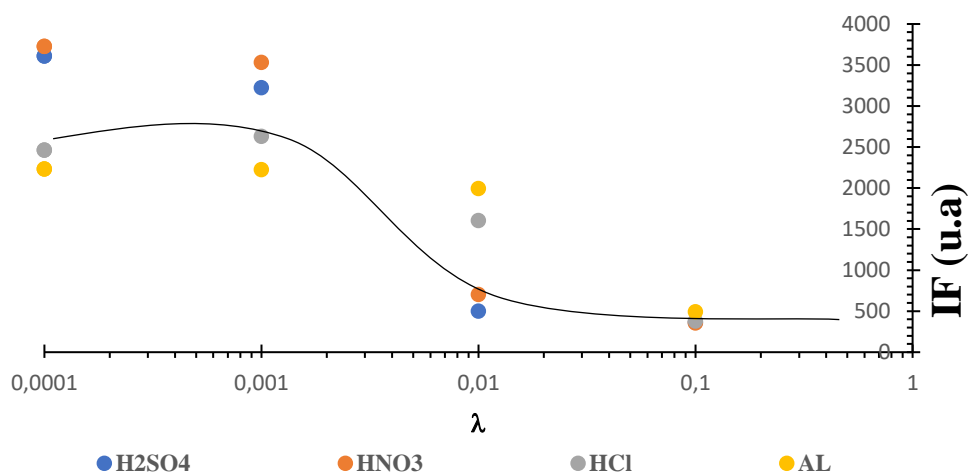


Figura 4.2.13. Intensidade de fluorescência do MPA com adição de ácidos H_2SO_4 , HNO_3 , HCl e AL, emitido a 619,8 nm. Legenda: MPA – Quantum dots de Ácido mercapto propiônico; H_2SO_4 – Ácido sulfúrico; HNO_3 – Ácido nítrico; AL- Ácido levulínico.

De acordo com a Figura 4.2.13, verificou-se que ao aumentar a concentração dos ácidos a intensidade de fluorescência reduzia e, também o ácido levulínico apresentou um comportamento semelhante aos ácidos sulfúrico, nítrico e clorídrico. Logo, conclui-se que o AL também reage com *quantum dots* revestido por MPA igual aos outros ácidos. Para além do *quantum dots* revestido com MPA, também foram experimentados *quantum dots* dopado com glutaciona e *quantum dots* dopados com cistina, no entanto, todos eles apresentaram um resultado igual ao MPA.

Conclusão

O CDoT derivado da casca da abóbora bolina não apresentou reação ao AL com modificação da intensidade de fluorescência e, também se conseguiu mostrar reação do AL positiva com CDoT dopado com sulfato de cobre, cromato de potássio, dicromato de potássio, curcumina, dimetilglioxima, hexametenotetramina, L-cistina. Os CDoT dopado com cobre e crómio não apresenta alteração na fluorescência enquanto CDoT dopado com curcumina o sensor reage formando uma precipitação, pode-se verificar até mesmo com outros tipos de ácidos, tais como: ácido clorídrico, ácido nítrico e ácido sulfúrico o que leva ao resultado não satisfatórios para aplicação como sensor.

O CDoT dopado com dimetilglioxima não apresentou resultados satisfatórios para aplicação como sensor pois a substância dimetilglioxima é fluorescente e emiti no mesmo comprimento de onda do CDoT causando uma sobreposição de sinais. Já o CDoT dopado com hexametenotetramina não apresentou reação com AL o que leva ao resultado não satisfatórios para aplicação como sensor para AL.

O CDoT dopado com curcumina e dimetilglioxima também não apresentou resultado satisfatório para aplicação como sensor de AL.

O CDoT dopado com L-cistina, apresentou aparentemente uma interação com o AL, mas a variação da intensidade de luminescência não obteve resultados satisfatórios para aplicação com sensor.

Como os resultados não foram os esperados com os pontos de carbonos, recorreu-se ao uso de *quantum dots* cádmio-telúrio. Embora o AL extinguisse a fluorescência dos *quantum dots*, esta extinção deve-se ao caráter ácido do AL e não é sensor específico do ácido em estudo.

Sintetizou-se pela primeira vez pontos de carbonos a partir de casca seca de abóbora bolina assistida por micro-ondas. Os resultados obtidos permitiram concluir que o solvente ideal para síntese de pontos de carbonos é o DEG. Os CDoT apresentam absorvância típica desta família de nanopartículas e mostram-se bastante fluorescentes quando excitados a 405 nm. Ainda com base no estudo de síntese o melhor tempo é de 95 s pois apresenta uma melhor intensidade de fluorescência e, também é o tempo que apresenta uma menor dispersão de primeira ordem, ou seja, a partir deste tempo formam-se menos sólidos em suspensão. Estes resultados foram para o precursor casca de abóbora bolina e, também experimentou com casca de maçã variedade “porta da loja” cujo os resultados são idênticos, todavia, não foram mostrados na tese.

Esses estudos mostram que os pontos de carbonos são materiais versáteis e que a aplicação para sensor requer um estudo muito bem detalhado. Vale mencionar que foi importante este estudo pois estes dados não são encontrados na literatura.

Sugestões para trabalhos futuros

Atendendo à temática abordada neste estudo, identificam-se várias pesquisas que podem ser realizadas. Propõe-se que se continue a pesquisar a reação dos pontos de carbonos dopado com L-cistina pois, apresentou aparentemente uma interação com o AL, mas devido a sobreposição de sinais a variação da intensidade de luminescência não obteve resultados satisfatórios para aplicação como sensor seletivo para ácido levulínico.

Ainda relativamente aos pontos de carbonos, sugere-se pesquisar outros compostos para funcionalizar a superfície dos mesmos e, assim aumentar a capacidade de especificidade com ácido levulínico.

Por último, sugere-se que seja estudado novos recursos naturais contendo N, S, P ou outros compostos devem ser explorados para sintetizar pontos de carbonos derivados de resíduos vegetais ou orgânicos. Seria igualmente vantajoso este tipo de estudo pois estaria a aplicar a economia circular na indústria química e, também tornando a química mais verde.

Referência bibliográficas

- Bandi, R., Gangapuram, B. R., Dadigala, R., Eslavath, R., Singh, S. S., & Guttena, V. (2016). Facile and green synthesis of fluorescent carbon dots from onion waste and their potential applications as sensor and multicolour imaging agents. *RSC advances*, 6(34), 28633-28639
- Barros, E. F. (2013). Produção monitorada on-line por FT-NIR de biodiesel etílico e metílico via catálise homogênea ácida induzida por micro-ondas. Tese de dissertação de Mestrado. Consultada a 8 de outubro de 2022.
- Bevilaqua, D. B. (2010). Produção de ácido levulínico por meio de hidrólise ácida da casca de arroz. Tese de dissertação de Mestrado. Consultada a 24 de Agosto de 2021.
- Braga, R. D. S. (2018). Desenvolvimento de filme polimérico à base de hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar. Tese de dissertação de Mestrado. Consultada a 27 de setembro de 2021.
- Chen, B. B., Liu, M. L., Li, C. M., & Huang, C. Z. (2019). Fluorescent carbon dots functionalization. *Advances in colloid and interface science*, 270, 165-190. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.06.008>
- Chen, W., Lv, G., Hu, W., Li, D., Chen, S., & Dai, Z. (2018). Synthesis and applications of graphene quantum dots: a review. *Nanotechnology Reviews*, 7(2), 157-185.
- Chen, W., Lv, G., Hu, W., Li, D., Chen, S., & Dai, Z. (2018). Synthesis and applications of graphene quantum dots: a review. *Nanotechnology Reviews*, 7(2), 157-185.
- Comissão europeia (2013) Comunicação da comissão ao parlamento europeu, ao conselho, ao comité económico e social europeu e ao comité das regiões. Consultado a 15 de junho de 2023 através
- Comissão europeia (2015) Relatório Geral sobre a Atividade da União Europeia foi adotado pela Comissão Europeia. Op.europa.ue. Consultado a 15 de junho de 2023 através. Consultado a 14 de junho de 2023 através https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:8a8ef5e8-99a0-11e5-b3b7-01aa75ed71a1.0007.02/DOC_1&format=PDF
- Comissão europeia (2016) Relatório Geral sobre a Atividade da União Europeia foi adotado pela Comissão Europeia. Op.europa.ue. Consultado a 15 de junho de 2023 através <https://op.europa.eu/webpub/com/general-report-2016/pt/>
- Cormack, P. A., & Elorza, A. Z. (2004). Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. *Journal of Chromatography B*, 804(1), 173-182.
- Corrado, S., Rydberg, T., Oliveira, F., Cerutti, A., & Sala, S. (2020). Out of sight out of mind? A life cycle-based environmental assessment of goods traded by the European Union. *Journal of cleaner production*, 246, 118954.
- Cui, L., Ren, X., Sun, M., Liu, H., & Xia, L. (2021). Carbon dots: Synthesis, properties and applications. *Nanomaterials*, 11(12), 3419.
- de Medeiros, T. V., Manioudakis, J., Noun, F., Macairan, J. R., Victoria, F., & Naccache, R. (2019). Microwave-assisted synthesis of carbon dots and their applications. *Journal of Materials Chemistry C*, 7(24), 7175-7195.
- Dos Santos, T. R., Nilges, P., Sauter, W., Harnisch, F., & Schröder, U. (2015). Electrochemistry for the generation of renewable chemicals: electrochemical conversion of levulinic acid. *Rsc Advances*, 5(34), 26634-26643.

Duarte, A. J., & Esteves da Silva, J. C. (2010). Reduced fluoresceinamine as a fluorescent sensor for nitric oxide. *Sensors*, 10(3), 1661-1669.

Dudley, G. B., Richert, R., & Stiegman, A. E. (2015). On the existence of and mechanism for microwave specific reaction rate enhancement. *Chem. Sci.* 6, 2144–2152.

Ellis, N. R., & Tschakert, P. (2019). Triple-wins as pathways to transformation? A critical review. *Geoforum*, 103, 167-170.

European Commission. (2016). Next steps for a sustainable European future European action for sustainability. *Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and The Committee of the Regions, Strasbourg, 22, 2016.*

FAO (2011) Global food losses and food waste. Food agriculture Organization of United Nations Consultado a 2 de setembro de 2022 através <https://www.fao.org/3/i2697e/i2697e.pdf>

FAO (2017) *The future of food and agriculture. Trends and challenges.* Food agriculture Organization of United Nations. Consultado a 2 de setembro de 2022 através <https://www.fao.org/3/i6583e/i6583e.pdf>

Figueiredo, E. C., Dias, A. C. B., & Arruda, M. A. Z. (2008). Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. *Revista brasileira de ciências farmacêuticas*, 44, 361-375. Consultado a 31 de janeiro de 2022 através <https://www.scielo.br/j/rbcf/a/fqVMmzrYyfRmFjFPLYkptBd/?format=pdf&lang=pt>

Gong, N., Wang, H., Li, S., Deng, Y., Chen, X. A., Ye, L., & Gu, W. (2014). Microwave-assisted polyol synthesis of gadolinium-doped green luminescent carbon dots as a bimodal nanoprobe. *Langmuir*, 30(36), 10933-10939.

Gul, Urooj; Kanwal, Shamsa; Tabassum, Sobia; Gilani, Mazhar Amjad; Rahim, Abdur (2020). Microwave-assisted synthesis of carbon dots as reductant and stabilizer for silver nanoparticles with enhanced-peroxidase like activity for colorimetric determination of hydrogen peroxide and glucose. *Microchimica Acta*, 187(2), 135–. doi:10.1007/s00604-019-4098-x

Haginaka, J., Tabo, H., & Kagawa, C. (2008). Uniformly sized molecularly imprinted polymers for d-chlorpheniramine: Influence of a porogen on their morphology and enantioselectivity. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 46(5), 877-881.

Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Ashkarran, A. A., de Aberasturi, D. J., de Larramendi, I. R., Rojo, T., ... & Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in biotechnology*, 30(10), 499-511.

Homann, C., Krukewitt, L., Frenzel, F., Grauel, B., Würth, C., Resch-Genger, U., & Haase, M. (2018). NaYF₄: Yb, Er/NaYF₄ core/shell nanocrystals with high upconversion luminescence quantum yield. *Angewandte Chemie International Edition*, 57(28), 8765-8769.

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:52013DC0149&from=ES>

Kamm, B., Gerhardt, M., & Dautzenberg, G. (2013). Chapter 5 – Catalytic Processes of Lignocellulosic Feedstock Conversion for Production of Furfural, Levulinic Acid, and Formic Acid-Based Fuel Components.

Kang, C., Huang, Y., Yang, H., Yan, X. F., & Chen, Z. P. (2020). A review of carbon dots produced from biomass wastes. *Nanomaterials*, 10(11), 2316.

Kang, C., Huang, Y., Yang, H., Yan, X. F., & Chen, Z. P. (2020). A review of carbon dots produced from biomass wastes. *Nanomaterials*, 10(11), 2316.

- Kang, C., Huang, Y., Yang, H., Yan, X. F., & Chen, Z. P. (2020). A Review of Carbon Dots Produced from Biomass Wastes. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 10(11), 2316. <https://doi.org/10.3390/nano10112316>
- Khairrol Anuar, N. K., Tan, H. L., Lim, Y. P., So'aib, M. S., & Abu Bakar, N. F. (2021). A review on multifunctional carbon-dots synthesized from biomass waste: Design/fabrication, characterization and applications. *Frontiers in Energy Research*, 9, 626549.
- Kim, K., Chokradjaroen, C., & Saito, N. (2020). Solution plasma: New synthesis method of N-doped carbon dots as ultra-sensitive fluorescence detector for 2, 4, 6-trinitrophenol. *Nano Express*, 1(2), 020043.
- Krysmann, M. J., Kelarakis, A., Dallas, P., & Giannelis, E. P. (2012). Formation mechanism of carbogenic nanoparticles with dual photoluminescence emission. *Journal of the American Chemical Society*, 134(2), 747-750.
- Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Introdução à Espectroscopia, 4ª ed., Cengage Learning: São Paulo, 2010.
- Leitão, G. S. F. (2014). Desenvolvimento de um polímero impresso molecularmente para análise de galaxolide em matrizes ambientais.
- Leitão, G. S. F. (2014). Desenvolvimento de um polímero impresso molecularmente para análise de galaxolide em matrizes ambientais. Tese de dissertação de Mestrado. Consultado a 17 de Março de 2022. <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/84710/2/27556.pdf>
- Lengowski, E. C., de Muniz, G. I. B., Nisgoski, S., & Magalhães, W. L. E. (2013). Cellulose acquirement evaluation methods with different degrees of crystallinity. *Scientia Forestalis*, 41(98), 185-194.
- Lima, M. T. (2017). Desenvolvimento de químicos intermediários de base renovável: os casos do ácido levulínico e itacônico. Tese de dissertação de Mestrado. Consultado a 15 de abril de 2023 através de <https://pantheon.ufrj.br/bitstream/11422/5772/1/Marcelo%20Tavares%20Lima.pdf>
- Lin, X., Xiong, M., Zhang, J., He, C., Ma, X., Zhang, H., ... & Huang, Q. (2021). Carbon dots based on natural resources: Synthesis and applications in sensors. *Microchemical Journal*, 160, 105604.
- Liu, X., Li, T., Hou, Y., Wu, Q., Yi, J., & Zhang, G. (2016). Microwave synthesis of carbon dots with multi-response using denatured proteins as carbon source. *RSC advances*, 6(14), 11711-11718.
- Lv, P., Xie, D., & Zhang, Z. (2018). Magnetic carbon dots based molecularly imprinted polymers for fluorescent detection of bovine hemoglobin. *Talanta*, 188, 145-151.
- Meng, W., Bai, X., Wang, B., Liu, Z., Lu, S., & Yang, B. (2019). Biomass-derived carbon dots and their applications. *Energy & Environmental Materials*, 2(3), 172-192.
- Meschede, D. K., Velini, E. D., Carbonari, C. A., & Moraes, C. P. (2012). Teores de lignina e celulose em plantas de cana-de-açúcar em função da aplicação de maturadores. *Planta Daninha*, 30, 121-127.
- Moreira, V. A. (2017). Síntese e caracterização de carbon dots funcionalizados com cuprizona e sua aplicação na determinação de Cu (II) em águas pela atenuação da intensidade fluorescente. Tese de dissertação de Mestrado. Consultado a 10 de outubro de 2022.
- Morone, A., Apte, M., & Pandey, R. A. (2015). Levulinic acid production from renewable waste resources: Bottlenecks, potential remedies, advancements and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51, 548-565.

Nações Unidas (ONU), 2012. Sustainable Development Goals. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/sustainable-development-goals/>. Acessado 10 de outubro de 2022

Naidjonoka, P., Hernandez, M. A., Pálsson, G. K., Heinrich, F., Stålbrand, H., & Nylander, T. (2020). On the interaction of softwood hemicellulose with cellulose surfaces in relation to molecular structure and physicochemical properties of hemicellulose. *Soft Matter*, *16*(30), 7063-7076.

Nairobi. Programa das Nações Unidas para o Ambiente (2021). Food Waste Index Report 2021 (Relatório do Índice de Desperdício Alimentar 2021). Consultada a 2 de fevereiro de 2022 através <https://www.unep.org/resources/report/unep-food-waste-index-report-2021>.

Ng, H. M., Lim, G. K., & Leo, C. P. (2021). Comparison between hydrothermal and microwave-assisted synthesis of carbon dots from biowaste and chemical for heavy metal detection: A review. *Microchemical Journal*, *165*, 106116.

Ojha, S., Bußler, S., & Schlüter, O. K. (2020). Food waste valorization and circular economy concepts in insect production and processing. *Waste Management*, *118*, 600-609. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.09.010>

Pileidis, F. D., & Titirici, M. M. (2016). Levulinic acid biorefineries: new challenges for efficient utilization of biomass. *ChemSusChem*, *9*(6), 562-582.

Pooja, D., Singh, L., Thakur, A., & Kumar, P. (2019). Green synthesis of glowing carbon dots from Carica papaya waste pulp and their application as a label-free chemo probe for chromium detection in water. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *283*, 363-372.

Rackemann, D. W., & Doherty, W. O. (2011). The conversion of lignocellulosics to levulinic acid. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *5*(2), 198-214.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, *26*(9-10), 1231-1237.

Santana Júnior, C. C. (2020). Utilização de biomassas lignocelulósicas da Amazônia Legal para produção de bioprodutos em um contexto econômico e socioambiental. Tese de dissertação de Mestrado. Consultado a 3 de Dezembro de 2021. <https://repositorio.uft.edu.br/handle/11612/2347>

Santos, F. A., Queiróz, J. H. D., Colodette, J. L., Fernandes, S. A., Guimarães, V. M., & Rezende, S. T. (2012). Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química nova*, *35*(5), 1004-1010.

Sarswat, P. K., & Free, M. L. (2015). Light emitting diodes based on carbon dots derived from food, beverage, and combustion wastes. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *17*(41), 27642-27652.

Sellergren, B. (Ed.). (2000). *Molecularly imprinted polymers: man-made mimics of antibodies and their application in analytical chemistry*. Elsevier.

Sendão, R. M. S. (2019). Study of the reactivity and properties of fluorescent carbon dots.

Sheehan, J., Cruickshank, P., & Boshart, G. (1961). A Convenient Synthesis of Water-Soluble Carbodiimides. *The Journal of Organic Chemistry*, *26*(7), 2525-2528.

Sigma Aldrich, 2023. Preço de 5-HMF. Consultado 1 de junho de 2023 através <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/product/aldrich/w501808?gclid=Cj0KCQjwkqSIBhDaARIsAFJ>

[ANkh3QgOcHy56Bjg6fcPuCRUb9aOBpwKvXylM8cJuLHKvzll0MEW61dgaAoqdEALw_wcB&gclid=aw.ds](https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/product/sigald/34851)

Sigma Aldrich, 2023. Preço de acetonitrile para cromatografia líquida de alto desempenho. Consultado 1 de junho de 2023 através <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/product/sigald/34851>

Sigma Aldrich, 2023. Preço de ácido levulínico. Consultado 1 de junho de 2023 através https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/product/aldrich/l2009?Lang=en®ion=IN&gclid=Cj0KCCQjw_kqS1BhDaARIsAFJANkgJmFZM02hDVB-3gEIr9FIASJNV-TA4_oHIP6kb-RnKWya1kNw_xBEaAjMiEALw_wcB&gclid=aw.ds

Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A., & Caracelli, I. (2002). *Princípios de análise instrumental*. 43

Sun, X., & Lei, Y. (2017). Fluorescent carbon dots and their sensing applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 89, 163-180.

Tarabanko, V. E., Chernyak, M. Y., Aralova, S. V., & Kuznetsov, B. N. (2002). Kinetics of levulinic acid formation from carbohydrates at moderate temperatures. *Reaction kinetics and catalysis letters*, 75(1), 117-126.

Vaz, R., Vieira, K. O., Machado, C. E., Ferrari, J. L., & Schiavon, M. A. (2015). Preparação de pontos de carbono e sua caracterização óptica: um experimento para introduzir nanociência na graduação. *Química Nova*, 38, 1366-1373.

Wang, M. L., Lin, H. J., Lee, M. H., & Choong, Y. M. (1999). A rapid method for direct determination of levulinic acid in soy sauce. *Journal of Food and Drug Analysis*, 7, 143-152.

Wareing, T. C., Gentile, P., & Phan, A. N. (2021). Biomass-based carbon dots: current development and future perspectives. *ACS nano*, 15(10), 15471-15501.

Waters. Preço de uma coluna C18 para cromatografia líquida de alto desempenho. Consultado 1 de junho de 2023 através <https://www.waters.com/nextgen/pt/pt/shop/columns/wat200632-symmetry-c18-column-100a-35--m-46-mm-x-150-mm-1-pk.html>

Wunderlich, S. M., & Martinez, N. M. (2018). Conserving natural resources through food loss reduction: Production and consumption stages of the food supply chain. *International Soil and Water Conservation Research*, 6(4), 331-339.

Young, R. J., & Lovell, P. A. (2011). *Introduction to polymers*. CRC press. Galletti, A. M. R., Antonetti, C., De Luise, V., Licursi, D., & Nassi, N. (2012). Levulinic acid production from waste biomass. *BioResources*, 7(2), 1824-1835.

Yuan, F., Wang, Z., Li, X., Li, Y., Tan, Z. A., Fan, L., & Yang, S. (2017). Bright multicolor bandgap fluorescent carbon quantum dots for electroluminescent light-Emitting diodes. *Advanced materials*, 29(3), 1604436.

Zhang, L., Yang, K., Mi, J., Lu, L., Zhao, L., Wang, L., ... & Zeng, H. (2015). Solid Electrolytes: Na₃PSe₄: A Novel Chalcogenide Solid Electrolyte with High Ionic Conductivity (Adv. Energy Mater. 24/2015). *Advanced Energy Materials*, 5(24).

Zhang, Y., & Yao, X. (2014). Preparation of molecularly imprinted polymer for vanillin via seed swelling and suspension polymerization. *Polymer Science Series B*, 56(4), 538-545.