



Evelyn Leal de Carvalho

**Potencialidade do uso de sonda
fotoluminescente baseada em pontos quânticos
funcionalizados com tiouréia para determinação
de aminas biogênicas**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da PUC-Rio.

Orientador: Prof. Ricardo Queiroz Aucélio

Coorientadora: Dra. Marlin Pedrozo Peñafiel

Rio de Janeiro
Março 2024



Evelyn Leal de Carvalho

**Potencialidade do uso de sonda
fotoluminescente baseada em pontos quânticos
funcionalizados com tiouréia para determinação
de aminas biogênicas**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo.

Prof. Ricardo Queiroz Aucélio

Orientador

Departamento de Química - PUC-Rio

Dra. Marlin Pedrozo

Coorientadora

Departamento de Química - PUC-Rio

Prof. Arnaldo Cardoso

UNESP – Araraquara

Prof^a. Adriana Gioda

Departamento de Química – PUC-Rio

Prof. Renan Farias

Departamento de Química – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 25 de março de 2024

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

Evelyn Leal de Carvalho

Mestranda do Programa de Pós-Graduação pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio). Licenciada em Química pelo Instituto Federal do Rio de Janeiro (2021).

Ficha Catalográfica

Carvalho, Evelyn Leal de

Potencialidade do uso de sonda fotoluminescente baseada em pontos quânticos funcionalizados com tiouréia para determinação de aminas biogênicas / Evelyn Leal de Carvalho ; orientador: Ricardo Queiroz Aucélio ; coorientadora: Marlin Pedrozo Peñafiel. – 2024.

93 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2024.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Pontos quânticos de grafeno. 3. Fotoluminescência. 4. Aminas biogênicas. 5. Análise por injeção em fluxo. I. Aucélio, Ricardo Queiroz. II. Pedrozo Peñafiel, Marlin Jeannette. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. IV. Título.

CDD: 540

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, cujo amor, apoio inabalável e encorajamento constante foram a base que sustentou toda a minha jornada acadêmica

Ao meu orientador prof Ricardo, sou imensamente grato por sua orientação, paciência e incentivo durante todo o processo de pesquisa. Seu apoio foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha coorientadora Marlin, sou grata pela sua orientação cuidadosa, sugestões valiosas e pela sua presença constante, que contribuíram imensamente para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também aos meus amigos e colegas de laboratório, cujo apoio, colaboração e troca de ideias enriqueceram esta experiência e tornaram os desafios mais gerenciáveis. O apoio mútuo, discussões produtivas e momentos de descontração que tornaram esta jornada mais leve e significativa.

Gostaria de estender meu agradecimento à PUC-Rio e ao departamento de Química por fornecerem o ambiente acadêmico estimulante, recursos e infraestrutura necessários para a realização desta pesquisa.

Expresso minha gratidão às instituições de fomento CNPq, CAPES e FAPERJ, cujo suporte financeiro foi essencial para a condução desta pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Por fim, agradeço a todos os que de alguma forma contribuíram para este trabalho, seja através de discussões construtivas, feedback valioso ou simplesmente pelo seu apoio moral.

Resumo

Carvalho, Evelyn Leal; Aucélio, Ricardo Queiroz (Orientador); Pedrozo Peñafiel, Marlin (Coorientadora). **Potencialidade do uso de sonda fotoluminescente baseada em pontos quânticos funcionalizados com tiouréia para determinação de aminas biogênicas.** Rio de Janeiro, 2024. 93p. Dissertação de mestrado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Uma sonda fotoluminescente do tipo “turn-on” foi avaliada para a detecção de putrescina usando pontos quânticos de grafeno (GQDs). Diferentes nanopartículas de carbono fotoluminescentes foram preparadas usando a abordagem “bottom-up”, usando ácido cítrico como precursor, sozinho ou misturado com outros compostos contendo heteroátomos (N e/ou S) visando funcionalização da nanoestrutura. Observou-se que as nanopartículas preparadas com ácido cítrico e tioureia (GQDs-TU) apresentaram melhor perfil de aumento da fotoluminescência (resposta analítica) na presença dessa amina biogênica. As condições experimentais foram ajustadas para o melhor perfil de resposta e para obter os parâmetros analíticos de mérito. No ensaio em batelada, a curva analítica normalizada (concentração $L-L_0$ versus PUT) foi linear ($R^2 = 0,9498$) até 90 mg L^{-1} . O limite de quantificação (LOQ) foi de $15,1 \text{ mg L}^{-1}$ e o limite de detecção (LOD) foi de $4,5 \text{ mg L}^{-1}$. Além disso, a estratégia proposta para a determinação indireta de putrescina foi adaptada para um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) a fim de aumentar a frequência analítica, diminuir os resíduos e automatizar a quantificação do analito. Após a otimização do ensaio, com a faixa linear cobrindo o intervalo até 50 mg L^{-1} ($R^2 = 0,9980$), os valores de LOD e LOQ foram $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $9,9 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

Palavras-chave

Pontos quânticos de grafeno; Fotoluminescência; Aminas biogênicas; Análise por injeção em fluxo.

Abstract

Carvalho, Evelyn Leal; Aucélio, Ricardo Queiroz (Orientador); Pedrozo Peñafiel, Marlin (Coorientadora). **Potential use of a photoluminescent probe based on thiourea-functionalized quantum dots for the determination of biogenic amines.** Rio de Janeiro, 2024. 93p. Dissertação de mestrado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A photoluminescent “turn-on” probe was evaluated for putrescine detection using graphene quantum dots (GQDs). Different photoluminescent carbon nanoparticles were prepared using a “bottom-up” approach, employing citric acid as a precursor, either alone or mixed with other compounds containing heteroatoms (N and/or S) for nanostructure functionalization. It was observed that the nanoparticles prepared with citric acid and thiourea (GQDs-TU) exhibited a more pronounced increase in photoluminescence (analytical response) when exposed to this biogenic amine. Experimental conditions were fine-tuned to optimize the response profile and obtain the analytical parameters of merit. In the batch assay, the normalized analytical curve ($L-L_0$ concentration versus PUT) was linear ($R^2 = 0,9498$) up to 90 mg L^{-1} . The limit of quantification (LOQ) was $15,1 \text{ mg L}^{-1}$ and the limit of detection (LOD) was $4,5 \text{ g L}^{-1}$. Furthermore, the proposed strategy for the indirect determination of putrescine was adapted for a flow injection analysis (FIA) system to increase the analytical frequency, reduce waste, and automate analyte quantification. After optimization of the assay, with the linear range covering the range up to 50 mg L^{-1} ($R^2 = 0,9980$), the LOD and LOQ values were $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $9,93 \text{ mg L}^{-1}$, respectively.

Keywords

Graphene quantum dots; Photoluminescence; Biogenic Amines; Flow Injection Analysis.

Sumário

1	Introdução	17
1.1	Contextualização do trabalho	17
1.2	Estrutura da dissertação	19
1.3	Objetivo deste trabalho	19
1.3.1	Objetivo geral	19
1.3.2	Objetivos específicos	20
2	Fundamentação teórica	21
2.1	Aminas biogênicas	21
2.2	Aminas biogênicas em produtos alimentícios e produção cervejeira	23
2.3	Nanomateriais	24
2.4	Nanomateriais de carbono	29
2.5	Flow injection analysis (FIA)	31
3	Materiais, Instrumentos e Procedimentos	35
3.1	Materiais e reagentes	35
3.2	Instrumentos	35
3.3	Procedimentos	36
3.3.1	Preparo das dispersões de GQDs	36
3.3.2	Preparo de soluções e dispersões de trabalho	37
3.3.3	Medições de fotoluminescência	38
3.3.4	Medições de absorção no UV-vis	39
3.3.5	Rendimentos quântico de fotoluminescência	39
3.3.6	Raman, DLS e Potencial Zeta	40
3.3.7	Flow injection analysis (FIA)	41
4	Resultados e discussão	43

4.1 Avaliação preliminar das dispersões de pontos quânticos de grafeno	43
4.2 Características ópticas do GQD-TU e da putrescina (no UV-Vis)	47
4.3 Estudo da influência das condições experimentais de preparo nas características do GQD-TU	48
4.3.1 Influência da proporção de massas da mistura de tiouréia e ácido cítrico na sensibilidade da sonda	48
4.3.2 Influência da diluição da dispersão na sensibilidade da sonda	50
4.3.3 Influência do método de purificação da dispersão na sensibilidade da sonda	52
4.3.4 Influência do pH da dispersão na sensibilidade da sonda	53
4.4 Estabilidade do sinal de fotoluminescência em função do tempo	57
4.5 Estudo do efeito da temperatura	61
4.6 Caracterização da sonda GQDs-TU	62
4.7 Características analíticas com medições em batelada	63
4.7.1. A resposta analítica de GQDs-TU na presença de PUT	63
4.7.2. Estudo de potenciais interferentes	66
4.7.3 Outros potenciais interferentes	71
4.8 Adaptação do método em regime de análise de injeção em fluxo	74
4.8.1. Otimização dos parâmetros na análise de injeção de fluxo	74
4.8.2 Parâmetros analíticos de mérito no FIA.	77
5 Conclusão	79
6 Trabalhos futuros	81
7 Referências	82

Lista de figuras

Figura 1: Estrutura molecular da amina biogênica denominada putrescina	21
Figura 2: Esquema simplificado das rotas de formação de putrescina e outras aminas sucessoras	22
Figura 3: Esquema simplificado dos componentes presentes nos sistemas analíticos FIA	32
Figura 4: Metodologia de síntese dos GQDs	37
Figura 5: Esquema dos componentes presentes na análise realizada por FIA nesse trabalho	42
Figura 6: Espectros fotoluminescentes das sondas de GQDs e GQDs-modificados e seus comprimentos de onda máximos de emissão (λ_{em}) e comprimentos de onda máximos de excitação (λ_{ex}), com filtro 10% de transmitância: A) GQDs; B) GQDs-U; GQDs-TU; D) GQDs-TA; E) GQD-GSH	45
Figura 7: Espectros fotoluminescentes das sondas de GQDs e GQDs-modificados com adição de putrescina: A) GQDs; B) GQDs-U; C) GQDs-TU; D) GQDs-TA; E) GQD-GSH, com filtro 10% de transmitancia	46
Figura 8: Espectro de extinção da dispersão original de GQDs-TU e da solução estoque de putrescina	47
Figura 9: A) Fotoluminescência da sonda GQD-TU sintetizada em diferentes proporções de massa de precursor e modificador químico, com uso de filtro com 1% de transmitância. B) Curva normalizada para GQDs-TU na presença de concentrações crescentes de putrescina para as sínteses nas proporções de ácido cítrico e tiouréia sendo respectivamente: A) 0,5 g/ 0,5 g; B) 0,5 g/ 0,25 g; C) 0,5 g/ 0,166 g e D) 0,5 g/ 0,125 g	50
Figura 10: A) Fotoluminescência da sonda GQD-TU em diferentes proporções de diluição da dispersão, com uso de filtro com 10% de transmitância. B) Curva normalizada para GQDs-TU na presença de concentrações crescentes de putrescina para TU em diferentes proporções de diluição da dispersão	51

Figura 11: A) Resposta fotoluminescente da dispersão da sonda GQDs-TU dialisado na presença de concentrações crescentes de putrescina, com uso de filtro com 10% de transmitância. (B) Curva analítica normalizada para a fotoluminescência de GQDs-TU dialisados na presença de putrescina: $y = (1,2) C_{putrescina} + (90,7)$ ($R^2 = 0,650$). 53

Figura 12: A) Perfis espectrais em diferentes valores de pH, com uso de filtro com 10% de transmitância e B) Influência do pH na intensidade da fotoluminescência da dispersão GQDs-TU. 54

Figura 13: Curva normalizada para GQDs-TU na presença de concentrações crescentes de putrescina para TU em diferentes valores de pH de sonda. 55

Figura 14: Variação do potencial zeta do GQD-TU em função do pH (Faixa de 2 a 12). 56

Figura 15: A) Fotoluminescência da sonda GQD-TU mensurada ao longo de 120 minutos, com uso de filtro com 10% de transmitância. B) Fotoluminescência da sonda GQD-TU, após a adição de 50 mg L⁻¹ de putrescina, mensurada ao longo de 120 minutos, com uso de filtro com 10% de transmitância 57

Figura 16: A) Fotoluminescência da sonda GQD-TU mensurada ao longo de 21 dias, com uso de filtro com 10% de transmitância. B) Fotoluminescência da sonda GQD-TU, após a adição de putrescina preparada no dia da medição. C) Fotoluminescência da sonda GQD-TU, após a adição de putrescina preparada no mesmo dia da síntese do GQDs-TU. 60

Figura 17: A) Curva normalizada para o efeito da temperatura na fotoluminescência da sonda GQDs-TU. B) Fotoluminescência da sonda GQD-TU na presença de concentrações crescentes de PUT em diferentes temperaturas com uso de filtro com 10% de transmitância. 61

Figura 18: Espectro Raman da amostra de GQDs modificados com tiouréia 63

Figura 19: A) Espectro fotoluminescente mostrando as respostas analíticas da curva analítica para PUT usando GQDs-TU como sonda fotoluminescente com concentrações de soluções padrão de PUT em a) 0;

b) 5; c) 15; e) 30; e) 50; f) 70; g) 90 mg L⁻¹; B) Curva analítica normalizada para a fotoluminescência de GQDs-TU na presença de PUT usando batelada: $y = (1,5 \pm 0,2) C_{putrescina} + (-8,3 \pm 5,2)$. ($R^2 = 0,9498$); C) Gráfico com a distribuição de resíduos

64

Figura 20: Efeitos produzidos na sonda GQDs-TU na presença de íons que podem ser encontrados em cervejas com uso filtro de 10% de transmitância: A) Ba²⁺ : 0,001; 0,01 e 0,1 mg L⁻¹; B) Fe³⁺ : 0,02; 0,2 e 2 mg L⁻¹; C) Ca²⁺ : 5, 50 e 150 mg L⁻¹; D) Mg²⁺: 20, 40 e 80 mg L⁻¹ E) Na⁺: 50, 100 e 200 mg L⁻¹. F) K⁺: 150, 300 e 600 mg L⁻¹, G) Cl⁻: 80, 160 e 320 mg L⁻¹ H) PO₄³⁻: 40, 80 e 160 mg L⁻¹.

68

Figura 21: Efeitos produzidos na sonda GQDs-TU, com adição de 50 mg L⁻¹ de PUT, na presença de íons que podem ser encontrados em cervejas: A) Ba²⁺ : 0,001; 0,01 e 0,1 mg L⁻¹; B) Fe³⁺ : 0,02; 0,2 e 2 mg L⁻¹; C) Ca²⁺ : 5, 50 e 150 mg L⁻¹; D) Mg²⁺: 20, 40 e 80 mg L⁻¹ E) Na⁺: 50, 100 e 200 mg L⁻¹. F) K⁺: 150, 300 e 600 mg L⁻¹, G) Cl⁻: 80, 160 e 320 mg L⁻¹ H) PO₄³⁻: 40, 80 e 160 mg L⁻¹.

70

Figura 22: Estrutura molecular das aminas biogênicas cadaverina e histamina

71

Figura 23: A) Resposta fotoluminescente da dispersão da sonda GQDs-TU na presença de concentrações crescentes de CAD, com uso filtro de 10% de transmitância; (B) Curva analítica normalizada para a fotoluminescência de GQDs-TU na presença de CAD: $y = (6,5) C_{cadaverina} + (-74,8)$ ($R^2 = 0,990$); C) Resposta fotoluminescente da dispersão da sonda GQDs-TU na presença de concentrações crescentes de HIS, com uso filtro de 10% de transmitância e (D) Curva analítica normalizada para a fotoluminescência de GQDs-TU na presença de HIS: $y = 4,8 C_{histamina} + (-62,2)$ ($R^2 = 0,960$).

73

Figura 24: Efeitos produzidos na sonda GQDs-TU, com adição de 20 mg L⁻¹ de PUT, CAD e HIS.

73

Figura 25: Diagramas mostrando as respostas analíticas da curva analítica para putrescina usando GQDs-TU como sonda fotoluminescente com concentrações crescentes do analito nas diluições: A) 100; B) 40 e C) 20 vezes

76

Figura 26: A) Diagrama mostrando as respostas analíticas da curva analítica para PUT usando GQDs-TU como sonda fotoluminescente com concentrações de soluções padrão de PUT em a) 0; b) 5; c) 15; e) 25; e) 50 mg L⁻¹; (B) Curva analítica normalizada para a fotoluminescência de GQDs-TU na presença de PUT usando FIA: $y = (444,1 \pm 12,2) C_{putrescina} + (-1682,2 \pm 426,6)$ ($R^2 = 0,9980$); C) Gráfico com a distribuição de resíduos

Lista de tabelas

Tabela 1: Nanomateriais para identificação de aminas biogênicas em amostra de alimentos	27
Tabela 2: Utilização de FIA para identificação de aminas biogênicas em amostra de alimentos	33
Tabela 3: Comprimentos de onda de excitação e de emissão utilizados para medir fotoluminescência das diferentes dispersões de pontos quânticos	38
Tabela 4: Parâmetros operacionais empregados no sistema FIA	41
Tabela 5: Parâmetros experimentais de preparo das dispersões de GQDs	44
Tabela 6: Proporções das massas de ácido cítrico e tiouréia para o preparo das dispersões	49
Tabela 7: Parâmetros operacionais para a sonda GQDs-TU na batelada	66
Tabela 8: Concentração de íons presentes em cervejas brasileiras de acordo com a literatura	67
Tabela 9: Parâmetros operacionais otimizados empregados no sistema FIA	77
Tabela 10: Parâmetros de mérito para a sonda GQDs-TU no FIA	77

Lista de siglas

AB – Aminas biogênicas
ADC – Arginina descarboxilase
AGM – Agmatina
CAD – Cadaverina
CQDs – Pontos quânticos de carbono
DAO – Diamina oxidase
dcSAM – Adenosilmetionina descarboxilase
DLS – Espalhamento dinâmico de luz
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
FIA – Análise de injeção em fluxo
GQDs – Graphene quantum dots
GSH – Glutathione
HIS – Histamina
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
LAB – Bactérias do ácido láctico
LOD – Limite de detecção
LOQ – Limite de quantificação
ODC – Ornitina descarboxilase
PAOX – Acetilpoliamina oxidase
PUT – Putrescina
QDs – Pontos quânticos
SMO – Espermina oxidase
SMS – Espermina sintases
SPD – Spermidina
SPM – Spermina
SRM – Spermidina sintases
SSAT - Spermidina/espermina N¹-acetiltransferase

TA – Tioacetamida

TRY – Triptamina

TU – Tiouréia

TYR -- Tiramina

U – Uréia

UV-vis – Ultravioleta visível

ZIF-8 – Imidazolato zeolítico-8

And I really wish that you could help

But my head is like a carousel

And I'm going 'round in circles, I'm going 'round in circles

Bring Me The Horizon – Happy Song

1

Introdução

1.1 Contextualização do trabalho

As aminas biogênicas (AB) são bases orgânicas nitrogenadas encontradas no corpo humano, animais, plantas e microrganismos, geradas a partir da descarboxilação enzimática ou microbiana de aminoácidos (precursor correspondente) e da transaminação de aldeídos e cetonas que são formadas e degradadas como resultado de atividades metabólicas normais em células vivas. De acordo com a estrutura podem ser classificados em três categorias diferentes: as alifáticas (como putrescina, cadaverina, espermina e espermidina), as aromáticas (como tiramina e feniletilamina) e as heterocíclicas (como histamina e triptamina), cada uma contribuindo para diversas funções fisiológicas essenciais, como regulação do crescimento, estabilização da membrana celular e síntese de hormônios (Erdag et al., 2018).

Geralmente, as AB oriundas dos alimentos são eliminadas pelo intestino através da atividade das enzimas mono e diamina oxidase. Porém, a ingestão dessas aminas pode desencadear diversos efeitos adversos, como náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, erupção cutânea, coceira, cefaléia, taquicardia, hipo ou hipertensão e distúrbios nos sistemas nervoso, respiratório e cardiovascular. Além disso, as AB estão sob investigação devido à sua capacidade de atuarem como precursores mutagênicos, uma vez que podem contribuir para a formação de nitrosaminas, substâncias conhecidas por seu caráter carcinogênico (Shalaby, 1996). A putrescina está associada a odores provenientes de tecidos em estágio de decomposição, sendo detectada por um marcador químico presente no sistema olfativo que induz repulsa em seres humanos e indica a presença de contaminação bacteriana (Hussain et al., 2013).

O controle da concentração de AB tem sido proposto como um indicador de qualidade e frescor de alimentos. Esses compostos estão correlacionados com o

tempo de armazenamento, processamento e deterioração, especialmente em produtos alimentícios resultantes de fermentação ou sujeitos à contaminação microbiana. (Papageorgiou et al, 2018). A presença de AB em cerveja são considerados constituintes naturais que podem ser originadas das matérias-primas (mosto, malte, lúpulo), como é o caso da agmatina, espermidina, 2-feniletilamina e espermina ou pela ação de microrganismos positivos para descarboxilases, como acontece para histamina, tiramina e cadaverina (Poveda, 2019; Kalac; Krízek, 2003). A putrescina pode originar a partir de ambos os processos. A fase de fermentação é responsável pela maior parte da formação de AB, porém o armazenamento prolongado também pode favorecer o aumento da concentração dessas AB (Lorencová et al, 2020).

Apesar disso, não existe uma legislação específica sobre cada AB nos diversos tipos de produtos alimentícios. No Brasil, apenas a histamina em pescados frescos e seus derivados possuem uma legislação regulamentadora, onde se determina 100 ppm (mg kg⁻¹) como a concentração máxima permitida (Brasil, 1997). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelece a cromatografia líquida de alta eficiência – em inglês, *High performance liquid chromatography* (HPLC) – como o método oficial de análise de histamina (Brasil, 2017). Apesar disso, o HPLC apresenta um alto custo de instrumentação, de manuseio e maior tempo requerido para realizar as análises.

O uso de nanomateriais em química analítica vêm se tornando uma alternativa promissora às técnicas tradicionais em procedimentos de detecção química e biológica de diversos analitos devido às suas propriedades ópticas, redox e catalíticas únicas que podem promover vantagens em termos de sensibilidade e seletividade. Recentemente, os nanomateriais de carbono estão sendo pesquisados em uma ampla gama de aplicações na área de análise de alimentos para detectar aditivos alimentares, bactérias, resíduos de inseticidas, antibióticos e alguns componentes nutricionais de interesse (Ngafwan et al., 2021) Esta dissertação tem como objetivo apresentar uma pesquisa no campo da química analítica baseada no uso de pontos quânticos de grafeno como sondas fotoluminescentes para a detecção e quantificação da amina biogênica putrescina em amostra de cerveja.

1.2 Estrutura da dissertação

A presente dissertação está estruturada em 6 capítulos. No Capítulo 1 é apresentada uma breve contextualização do trabalho e seus objetivos. No Capítulo 2 é apresentado o referencial teórico com o objetivo de fornecer a compreensão básica de teorias e conceitos relevantes ao tema da pesquisa. Ali são apresentados conceitos sobre nanomateriais fotoluminescentes. Além disso, esta seção traz uma breve revisão sobre GQDs, abordando sua produção, propriedades físicas e químicas e aplicações em métodos analíticos para detecção de diversos analitos. O Capítulo 3 contém informações detalhadas sobre materiais, instrumentos e reagentes empregados, procedimentos empregados para preparar soluções, amostras e os procedimentos relativos aos métodos analíticos. No Capítulo 4 são apresentados os resultados e discussão do estudo realizado sobre a produção dos pontos quânticos de grafeno. Esse capítulo inclui: i) estudo da interação de diversas sondas baseadas em pontos quânticos de grafeno com a putrescina; ii) estudo da influência das condições de preparo da sonda na sensibilidade; iii) interação do GQDs-TU com a putrescina e outras aminas biogênicas; iv) caracterização da sonda GQDs-TU; v) desenvolvimento do método de quantificação de putrescina; vi) adaptação do método em um sistema de injeção em fluxo; vii) comparação de parâmetros de desempenho analítico da abordagem em batelada com a de fluxo. Finalmente, os Capítulo 5 e Capítulo 6 são dedicados, respectivamente, a conclusão do trabalho e orientações para trabalhos futuros.

1.3 Objetivo deste trabalho

1.3.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como propósito avaliar a viabilidade do emprego de diversos pontos quânticos de grafeno como sondas fotoluminescentes para a detecção de putrescina em amostras de cerveja.

1.3.2 Objetivos específicos

- Produzir diferentes GQDs, caracterizando os mais responsivos à putrescina utilizando diferentes análises ópticas e morfológicas;
- Avaliação da resposta de fotoluminescência de GQDs-TU na presença de diferentes concentrações de putrescina;
- Ajuste de parâmetros experimentais (concentração de pontos quânticos, pH de dispersão, estabilidade, e temperatura, etc.) para sondagem de putrescina;
- Estudo da seletividade em termos de possíveis substâncias interferentes que possam existir em amostras de interesse;
- Adaptação do método para análise de injeção em fluxo (FIA).

2

Fundamentação teórica

2.1 Aminas biogênicas

As aminas biogênicas são uma classe de compostos orgânicos que são encontradas naturalmente em todos os organismos vivos. As primeiras aminas biogênicas cujas estruturas químicas foram registradas são a putrescina e a cadaverina. Em 1885, Ludwig Brieger, um médico e químico alemão, isolou e identificou essas substâncias (Law, 2019) após extração dessas aminas do processo de decomposição de proteínas em matéria orgânica em estágio avançado de decomposição.

A putrescina (1,4-diaminobutano ou butanodiamina) é uma poliamina que pode ser sintetizada a partir da L-arginina por meio de duas rotas distintas: a via da L-ornitina e a via da agmatina. Na rota da L-ornitina, a putrescina é gerada pela ação da enzima ornitina descarboxilase (ODC). Já na rota da agmatina, a enzima arginina descarboxilase (ADC) desempenha um papel fundamental, convertendo a L-arginina em agmatina, que, por sua vez, é transformada em putrescina por meio da via da N-carbamoylputrescina (Zdrojewicz; Lachowski, 2014). A estrutura molecular da putrescina é indicada na Figura 1.

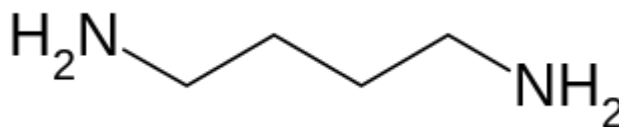


Figura 1: Estrutura molecular da amina biogênica denominada putrescina

Ainda na rota de síntese, a putrescina é precursora de duas outras aminas biogênicas: espermidina (SPD) e a espermina (SPM). Grupos aminopropílicos derivados da S-adenosilmetionina descarboxilase (dcSAM), formada a partir do

aminoácido essencial L-metionina, são inseridos de forma sequencial na amina primária da putrescina formando espermidina quem em seguida forma a espermina, conforme simplificado na Figura 2. A mediação ocorre por espermidina e espermina sintases (SRM e SMS, respectivamente) (Murray-Stewart *et al.*, 2018). O processo pode ser revertido por dois mecanismos que envolvem uma série catabólica de oxidações: (I) a espermina é oxidada especificamente pela espermina oxidase (SMO) produzindo espermidina e as espécies reativas de oxigênio H_2O_2 e o aldeído 3-aminopropanal (Cervelli *et al.*, 2012) e (II) a espermidina/espermina N^1 -acetiltransferase (SSAT) promove a acetilação na extremidade aminopropílica da espermidina e espermina, seguida de oxidação pela acetilpoliamina oxidase (PAOX). Este último mecanismo pode ocorrer em duas etapas convertendo a espermidina de volta em putrescina (Murray-Stewart; Casero, 2017).

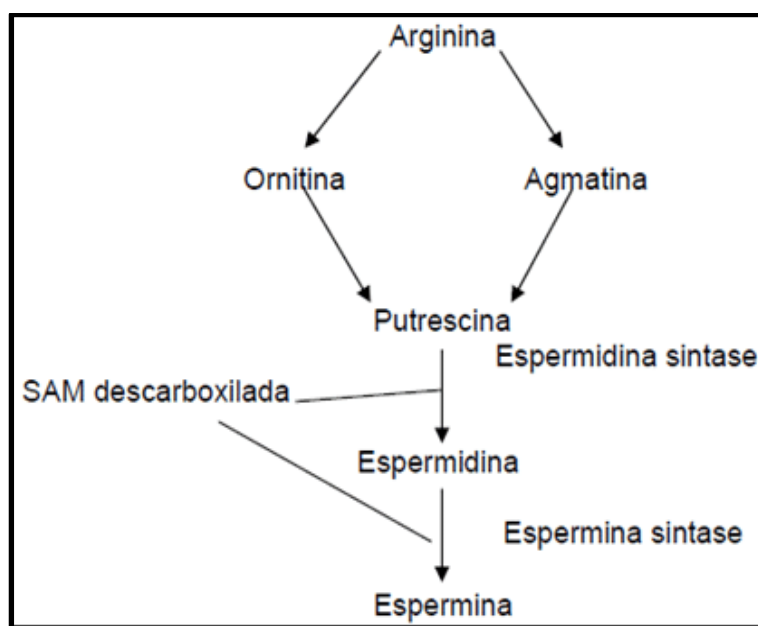


Figura 2: Esquema simplificado das rotas de formação de putrescina e outras aminas sucessoras

Apesar de comumente ser relacionada apenas com a deterioração da matéria orgânica, para os organismos vivos, a putrescina desempenha um papel muito importante nos processos metabólicos, como o ciclo celular, estabilização da estrutura do DNA e ainda participa do funcionamento das membranas celulares. Estudos apontam a relevância clínica da putrescina na infertilidade,

desenvolvimento embrionário, hirsutismo, epilepsia, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, prevenção de metástases e hemostasia (Bachrach, 2010).

2.2 Aminas biogênicas em produtos alimentícios e produção cervejeira

A detecção da formação de aminas biogênicas não apenas sugere indícios de deterioração dos alimentos, mas também destaca a importância fundamental de se avaliar sua concentração ao longo dos processos de produção dos produtos alimentícios, limitando a presença no produto final. Tal medida, permite assim identificar possíveis riscos à saúde e assegurar que medidas preventivas e corretivas possam ser implementadas, garantindo padrões de segurança e qualidade alimentar. A quantidade e variedade de AB formados nos alimentos são fortemente influenciadas pela composição da matéria prima, presença de microrganismos com atividade da descarboxilase e as condições de processamento e armazenamento. Esses múltiplos fatores atuam simultaneamente explicando a diferença de concentração observadas para produtos frescos e fermentados, assim como para produtos de origem animal e vegetal (Ruiz-Capillas; Herrero, 2019).

Na indústria cervejeira, as bactérias do ácido láctico (LAB) são amplamente utilizadas nos processos de fabricação. Os gêneros *Enterococcus*, *Lactobacilli*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, and *Leuconostoc* são associados com a formação de AB e em consequência a degradação da cerveja (Ovalle-Marmolejo *et al*, 2023). Diferentemente das cervejarias em grande escala, a cerveja artesanal é mais propensa à deterioração devido à ausência geralmente de processos como pasteurização ou filtração estéril. A presença de uma microbiota associada às matérias-primas orgânicas e ingredientes não convencionais, para aromatização e saborização, aumentam significativamente o risco de deterioração (Rodríguez-Saavedra *et al.*, 2020). Além de alterar a qualidade das cervejas, outro problema torna a detecção de AB crucial, pois o etanol pode ser um inibidor da monoamina oxidase (MAO) e da diamina oxidase (DAO), as enzimas responsáveis pela desintoxicação no organismo humano (Visciano; Schirone, 2022).

Em amostras de alimentos, os métodos tradicionais para quantificação de AB são cromatografia gasosa-espectrometria de massa, cromatografia de troca iônica, eletroforese capilar, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia de camada delgada (Kong *et al*, 2022; Ahangari *et al*, 2021). De modo a tentar aumentar a frequência analítica, diminuir os custos e simplificar os processos de análise alguns métodos vêm sendo desenvolvidos como métodos espectrométricos (fluorimetria, quimioluminescência, métodos colorimétricos e cromatografia iônica), métodos enzimáticos, análise de injeção de fluxo com biossensores amperométricos (Vasconcelos *et al*, 2021).

Apesar de estudos apontarem a importância de se estabelecer a concentração de aminas biogênicas em alimentos, ainda não existe nenhum limite legal estabelecido havendo também poucos dados de pesquisas em termos de dose-resposta em humanos. O levantamento mais recente, realizado em 2011, pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), propôs uma avaliação qualitativa - utilizando dados da literatura científica, bem como de inquéritos, relatórios e dados de consumo - dos riscos relativos de diversas AB em alimentos fermentados na União Europeia, porém para putrescina e cadaverina não foi possível indicar concentrações que poderiam induzir efeitos adversos nos consumidores pelas informações disponíveis serem insuficientes.

Em um dos estudos na área, Del Rio *et al* (2019) mostram que a putrescina é citotóxica para culturas de células intestinais em concentrações que podem ser facilmente alcançadas em diversos tipos de alimentos. O valor para a maior concentração de AB que não causou nenhum efeito adverso detectável nas células-alvo e correspondeu a 440,75 mg kg⁻¹. A menor concentração de AB que produziu um efeito adverso detectável foi mensurada em 881,5 mg kg⁻¹.

2.3 Nanomateriais

Os nanomateriais - naturais ou sintéticos - possuem uma ou mais dimensões em escala nanométrica, na faixa de 1 nm a ~ 100 nm. Eles podem ser produzidos por vários tipos de procedimentos, usando diversos precursores como metais, estrutura metal-orgânica (MOF), precursores orgânicos, material polimérico, etc.

Também podem ser funcionalizados/modificados de acordo com os requisitos para quaisquer aplicações desejadas. Devido ao tamanho, as propriedades de reatividade, espectroscópicas, elétricas e magnéticas, de transporte através de membranas, etc., são geralmente diferentes daquelas dos similares materiais massivos (Armarego, 2022). Além disso, exibem efeitos quânticos, maior área de superfície, maior resistência, estabilidade, reatividade química ou condutividade e biocompatibilidade (Adil *et al.*, 2022).

As propriedades ópticas dos nanomateriais permitem que sejam empregados como sondas analíticas ópticas. No caso das sondas fotoluminescentes, esses nanomateriais substituem os sensores que empregam fluoróforos orgânicos e inorgânicos e podem operar com três possíveis mecanismos de detecção ao identificar um analito: (i) supressão da intensidade de fluorescência, conhecido como *quenching* ou *turn-off*, (ii) aumento da intensidade de fluorescência, referido como *turn-on* ou ativação, e (iii) a alteração do espectro de emissão para um comprimento de onda diferente (Bui The Huy *et al.*, 2022).

Os pontos quânticos (em inglês *Quantum dots*) ou QDs, são uma espécie de nanomateriais semicondutores de tamanho ultra pequenos, normalmente na faixa entre 1 e 10,0 nm. Os QDs têm se tornado objetos de estudos no meio científico devido às suas propriedades únicas, incluindo maior fotoestabilidade, espectros de excitação amplos, picos de emissão ajustáveis, longos tempos de vida de fluorescência, dentre outras (Barroso, 2011). Tais propriedades são devido ao fenômeno denominado confinamento quântico que se refere à restrição do movimento aleatório dos elétrons nos QDs, induzindo à criação de níveis de energia quantizados nas bandas de valência e condução. Ao reduzir as dimensões das partículas até ficar abaixo do raio de Bohr, os níveis de energia tornam-se discretos, resultando também em um aumento no *bandgap* – barreira energética onde nenhum elétron de valência pode transitar – que é a diferença de energia entre a banda de valência e a banda de condução, no caso dos QDs entre os níveis discreto mais elevado da banda de valência e o nível mais baixo da banda de condução (Singh *et al.*, 2020).

Quando os QDs passam por algum processo, como radiação incidente, onde recebem energia superior ao *bandgap*, os elétrons da banda de valência são promovidos a banda de condução gerando a formação de uma vacância (um buraco virtual na camada de valência) de carga idêntica, porém com sinal oposto. O par elétron-buraco denominado éxciton, que são unidos por interações coulombianas, apresenta tempo de vida curto (na ordem de nanossegundos) e o recaimento energético é chamado de recombinação excitônica. A dissipação dessa energia através de emissão de fótons com energia inferior ao da radiação incidente (decaimento radiativo) é o que possibilita que os QDs apresentem o fenômeno de fluorescência (Schmid, 2004).

Na indústria alimentícia, os nanomateriais podem ser empregados em setores como processamento, embalagem, segurança e qualidade e armazenamento. A aplicação de nanosensores para detectar qualquer patógeno ou contaminantes em alimentos fornece ensaios de diagnóstico rápidos, sensíveis e de baixo custo para a detecção (Nile *et al.*, 2020). Os nanomateriais vem sendo estudados para detecção de amins biogênicas em diversos tipos de amostras de alimentos, alguns exemplos podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1: Nanomateriais para identificação de aminas biogênicas em amostra de alimentos

Amostra	Amina	Nanomaterial	Técnica	Faixa Linear	LOD	Referências
Peixe	PUT, CAD	Fe, Co-CDs	Colorimétrica	0,25–10 mg kg ⁻¹	0,06 mg kg ⁻¹	(Li <i>et al.</i> , 2021)
Salmão, frango, carne e porco	PUT, CAD	Au@ZIF-8	Espectroscopia Raman	0–10 ⁻⁴ (v/v)	76,99 ppb (PUT) 115,88 ppb (CAD)	(Kim <i>et al.</i> , 2021)
Carne de porco	PUT, CAD	Filme polilactida com CaCO ₃ -NPs Óxido de Grafeno	Colorimétrica e Espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser	2,0–10,0 mg L ⁻¹ (PUT)	0,07 pmol L ⁻¹ (PUT)	(Siripongpreda <i>et al.</i> , 2020)
				0,1–6,0 mg L ⁻¹ (CAD)	0,02 pmol L ⁻¹ (CAD)	
Queijo	TYR	Nanopartículas de platina	Amperometria	5,3 × 10 ⁻⁷ até 7,2 × 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ (DAOx)	Não informado (DAOx)	(Dalkiran <i>et al.</i> , 2020)
				3,9 × 10 ⁻⁷ até 7,6 × 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ (MAOx)	2,1 × 10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ (MAOx)	
Vinho	HIS	Nanopartículas de ouro	Colorimétrica	0,2–0,4 µmol L ⁻¹	0,2 µmol L ⁻¹	(Lapenna <i>et al.</i> , 2020)

Iogurte e queijo	TYR	Nanopartículas de ouro	Eletroquímica	0,8–80 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,04 $\mu\text{mol L}^{-1}$	(Silva <i>et al.</i> , 2019a)
Iogurte e queijo	TYR	Nanopartículas de ouro	Eletroquímica	10–120 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,71 $\mu\text{mol L}^{-1}$	(Silva <i>et al.</i> , 2019b)
Peixe	HIS	Nanopartículas de ouro	Colorimétrica e espectrométrica	0,1–2,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1,81 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 38 nmol L^{-1}	(Huang <i>et al.</i> , 2017)
Cerveja e vinho	HIS	Nanotubos de carbono de parede simples	Eletroquímica	4,5–720 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1.26 $\mu\text{mol L}^{-1}$	(Stojanović <i>et al.</i> , 2016)
Camarão	PUT	CeO ₂ -NPs	Amperometria	-	10 nmol L^{-1}	(Gumpu <i>et al.</i> , 2016)
Peixe	TYR	Nanotubos de carbono de parede simples	Eletroquímica	5–180 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,62 $\mu\text{mol L}^{-1}$	(Apetrei; Apetrei, 2015)
Peixe	HIS	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas	Eletroquímica	0,1- 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	76 nmol L^{-1}	(Geto <i>et al.</i> , 2014)

Histamina (HIS), Octopamina (OCT), Triptamina (TRY), Espermidina (SPD), Espermina (SPM), Tiramina (TYR), Putrescina (PUT), Cadaverina (CAD) e Agmatina (AGM).

2.4 Nanomateriais de carbono

Os nanomateriais de carbono têm se tornado uma alternativa promissora para a detecção de diversos analitos de interesse da indústria alimentícia ao serem utilizados na criação de dispositivos de detecção de alto desempenho para uma inspeção de segurança alimentar. (Rajendrachari *et al.*, 2022; Sonali J *et al.*, 2022). Devido às suas propriedades físicas e químicas únicas, esses nanomateriais possibilitam o desenvolvimento de sensores sensíveis e seletivos para aminas biogênicas (Danchuk, *et al.*, 2013).

Dentre esses nanomateriais de carbono podemos destacar os pontos quânticos de carbono – do inglês, *carbon quantum dots* (CQDs) – e os pontos quânticos de grafeno – do inglês, *graphene quantum dots* (GQDs). Apresentam como características serem nanocristais de dimensão zero (0D), semicondutores que exibem propriedades como fotoluminescência passível de ajustes, biocompatibilidade, compatibilidade ambiental, baixa toxicidade, possibilidade de funcionalização da superfície e baixo custo (Sikiru *et al.*, 2023). Os CQDs são estruturas esféricas ou quase-esféricas compostas por carbono hibridizado sp^2 e sp^3 , enquanto os GQDs são fragmentos de grafeno que possuem núcleos grafíticos hibridizados sp^2 com funcionalizações de borda carboniladas (Korkut *et al.*, 2023).

Os GQDs foram fabricados inicialmente por Ponomarenko *et al.* (2004) com base no trabalho anterior sobre pontos de carbono (CDs) de Xu e colaboradores, em 2004. Na literatura são descritos vários métodos de preparação de GQDs, como hidrotérmico, hidrotérmico assistido por microondas, hidroesfoliação, catalisado por metal, método de litografia por feixe de elétrons, etc. A partir do material precursor, estes métodos podem ser classificados em duas categorias, denominadas *top-down* e *bottom-up* (Tian *et al.*, 2018).

No procedimento *top-down*, materiais de carbono, como por exemplo, nanotubos de carbono de paredes múltiplas, óxido de grafeno, grafeno, grafite, etc. são empregados como precursores de carbono são subsequentemente esfoliados e fatiados nos GQDs usando processos químicos, térmicos ou físicos. Enquanto que o método *bottom-up* consiste na fusão de pequenas moléculas precursoras - como 1,3,6-trinitropireno, glicose, ácido cítrico e outras - em estruturas maiores para criar GQDs (Ghazali *et al.*, 2023).

Os GQDs podem ser funcionalizados com heteroátomos (N, S, P e B), onde o grupo funcional é inserido na estrutura, permitindo alterar propriedades mecânicas, de absorção, ópticas ou químicas para um melhor desempenho. A modificação das propriedades dos GQDs por meio de funcionalização foi investigada pela primeira vez por Zhao *et al* (2012) envolvendo o uso de nitrogênio como modificador químico. Em 2015, o grupo de Qu *et al.* (2015) fabricaram GQDs-TU utilizando tioureia e ácido cítrico, respectivamente, como modificador químico e precursor, através de uma rota sintética solvotérmica. A tioureia fornece átomos de S e N, enquanto o ácido cítrico foi utilizado como fonte de carbono.

Apesar de na literatura não constarem relatos de GQDs aplicados na identificação de putrescina, alguns trabalhos demonstraram aplicabilidade para outras AB. Toloza *et al* (2017) investigaram dispersões aquosas de pontos de grafeno amino-funcionalizados - obtidos a partir de ácido cítrico e glutatona - como sondas fotoluminescentes para detecção e quantificação de histamina. Eles também estudaram os efeitos da mediação por diversos íons metálicos para o aprimoramento da sonda. O estudo revelou que a presença de Fe^{3+} aumentava significativamente a capacidade de reconhecimento da superfície dos GQDs em até 10 vezes, apresentando uma interação mais intensa na presença de histamina. A resposta linear desses GQDs ligados ao Fe^{3+} variou de $0,43 \mu\text{mol L}^{-1}$ (limite de detecção) a $32 \mu\text{mol L}^{-1}$. A aplicação do método foi em amostras de atum após extração catiônica em fase sólida.

Ainda para histamina, Mahnashi *et al.* (2021) desenvolveram eletrodos quimicamente modificados denominado MIP-Au@Fe-BDC/ N, S-GQDs. Essa modificação se baseou em polímeros molecularmente impressos (MIP) eletropolimerizado sobre a superfície de Fe-BDC (oriundo de FeCl_3 e ácido benzenodicarboxílico), AuNPs (nanopartículas de ouro) e GQDs funcionalizados com nitrogênio-enxofre (N,S-GQDs). Os N,S-GQDs foram obtidos pelo método hidrotermal a partir de ácido cítrico e metionina. A faixa linear abrangeu de $0,078$ – 250 nmol L^{-1} com um limite de detecção de $0,026 \text{ nmol L}^{-1}$. O método foi testado em atum enlatado e sangue humano.

Os N,S-GQDs também já foram estudados para a detecção de octopamina. Guo *et al* (2022) elaboraram um nanosensor luminescente composto por um MIP, enxofre decorado com estrutura de imidazolato zeolítico-8 (ZIF-8) e N,S-GQDs.

Na síntese foram utilizados ácido cítrico e tiouréia adicionados em N, N-Dimetilformamida para aplicação da rota solvotermal. Como escolha de amostras fermentadas foram selecionados vinho e vinagre branco. O limite de detecção foi mensurado em $0,062 \text{ mg L}^{-1}$ relação linear favorável na faixa de $0,1\text{--}10 \text{ mg L}^{-1}$.

2.5 Flow injection analysis (FIA)

Os métodos de análise em fluxo compreendem todos os métodos analíticos que são baseados na introdução e processamento de amostras em fluxos. Zagatto *et al* (2002) classificam as técnicas analíticas baseadas em fluxo em quatro categorias: segmentado por ar, fluxo contínuo não segmentado, e análise por injeção sequencial. A análise por injeção de fluxo, do inglês FIA (flow injection analysis), foi desenvolvida em 1975 por Růžička e Hansen quebrando o paradigma estabelecido pela análise de fluxo contínuo segmentada por bolhas de ar de Skeggs (Růžička; Hansen, 1980). Os primeiros sistemas FIA empregavam uma seringa hipodérmica para a introdução de amostra, daí derivando-se o termo "injeção" no nome (Reis, 1996).

A FIA é um método que envolve a injeção da amostra em um fluxo contínuo (não segmentado) de uma solução de transporte (carreadora) por meio de uma válvula. O fluxo contínuo de solução carreadora é mantido geralmente por uma bomba peristáltica. Após a introdução da amostra, a zona da amostra é levada até uma bobina de reação onde se obtém uma melhor mistura e reação entre componentes da zona da amostra com reagentes na solução carreadora ou os reagentes introduzidos simultaneamente com a amostra, a partir de uma outra válvula de injeção. A bobina de reação ajuda na mistura de componentes (homogeneização dos componentes de reação) que seguem em direção a um detector compatível (Costa *et al.*, 2017).

Um esquema simplificado aos sistemas analíticos FIA é mostrado na Figura 3 indicando alguns dos componentes comuns que são usados para as diversas operações unitárias no processo analítico baseado em fluxo, ou seja, propulsão, injeção, reação/mistura/modificação, detecção e análise de dados. O conjunto de

válvulas de bombas, tubos de fluxo e detector, organizados e encadeados de forma adequada, origina o sistema FIA.

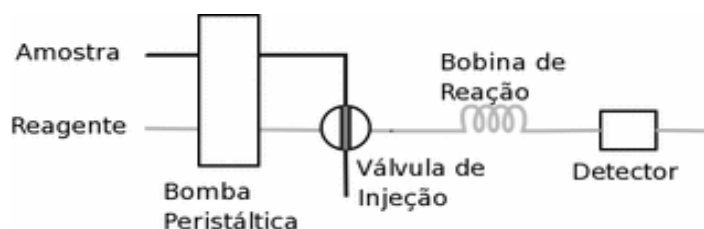


Figura 3: Esquema simplificado dos componentes presentes nos sistemas analíticos FIA

Os princípios desta técnica se baseiam na dispersão controlada de um pequeno volume fixo da amostra líquida sendo injetado, formando uma zona, no fluxo transportador através de um tubo ou condutor de diâmetro estreito. O analito ou produto resultante de reação, com reagentes concomitantemente introduzidos ou presentes na solução carreadora, é transportado para detector que registra continuamente o sinal transitório (qualquer parâmetro físico medido) para em seguida ser descartado. Cada injeção produz um único pico cuja altura, área ou largura é proporcional à concentração do analito (MacLaurin *et al.*, 1995). Para atender aos requisitos da análise, é possível controlar e ajustar a dispersão ou diluição da zona de amostra, otimizando vários fatores. Isso inclui o volume de amostra injetado, a taxa de fluxo do transportador e das correntes de reagente, o comprimento da bobina de reação e o diâmetro interno da tubulação (Arruda; Collins, 2005).

Em comparação aos métodos de análise em batelada, análise em fluxo oferece muitas vantagens como: economia, flexibilidade, simplicidade, seletividade, reprodutibilidade, maior taxa de amostragem, tempo de inicialização e desligamento rápidos (Ghous, 1999). Devido à facilidade de associação com vários tipos de detectores, o sistema FIA é amplamente aplicado em diversas análises como ambiental, farmacêutica, análises clínicas, dentre outras. Nas pesquisas na área de qualidade alimentar, o FIA vem sendo empregada na detecção de aminas biogênicas em diversos tipos de amostras, alguns exemplos podem ser vistos na Tabela 2.

Tabela 2: Utilização de FIA para identificação de aminas biogênicas em amostra de alimentos

Amostra	Amina	Técnica	Range	LOD	Referências
Vinho	HIS, OCT, TRY, SPD, SPM, TYR, PUT, CAD, AGM	Espectrometria de Massas em Tandem	-	-	(Mir-Cerdà <i>et al.</i> , 2022)
Camarão	PUT	Espectrofotometria	$4,0 \times 10^{-8}$ até 4×10^{-6} g mL^{-1}	$1,76 \times 10^{-8} \text{ g mL}^{-1}$	(Chen <i>et al.</i> , 2016)
Vinho	HIS	Uv-Vis	-	-	(Hernández-Cassou; Saurina, 2013)
Cerveja	PUT	Amperometria	$0,01\text{--}0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$	$5 \mu\text{mol L}^{-1}$	(Bóka <i>et al.</i> , 2012)
Frango	CAD, PUT e TYR	Amperometria	$5,0 - 100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CAD e PUT)	$2,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CAD)	(Telsnig <i>et al.</i> , 2012)
			$25,0 - 1000,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (TYR)	$1,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (PUT) $6,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (TYR)	
Peixe	HIS	Eletroquímica e imunoquímica	$2\text{--}280 \text{ mg kg}^{-1}$	2 mg kg^{-1}	(Akbari-Adergani, 2012)

Vinho e Cidra	HIS	Fluorimétrica	Até 2,0 mg L ⁻¹	30 µg L ⁻¹	(Del Campo <i>et al.</i> , 2006)
Peixes	PUT	Amperometria	5 a 75 µmol L ⁻¹	5 µmol L ⁻¹	(Saby <i>et al.</i> , 2004)

Histamina (HIS), Octopamina (OCT), Triptamina (TRY), Espermidina (SPD), Espermina (SPM), Tiramina (TYR), Putrescina (PUT), Cadaverina (CAD) e Agmatina (AGM).

3

Materiais, Instrumentos e Procedimentos

3.1 Materiais e reagentes

As soluções e dispersões aquosas foram preparadas utilizando água ultrapura (resistividade mínima de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida de um purificador de água Milli-Q A10 Gradiente da Millipore (EUA). O ácido cítrico e a uréia foram obtidos na Merck (Brasil). A glutatona reduzida, histamina, putrescina, cadaverina e a tioacetamida da Sigma-Aldrich (EUA). Tiouréia, cloreto de cálcio, cloreto de ferro(III), cloreto de sódio e o hidróxido de sódio foram da Vetec (Brasil). O ácido clorídrico foi obtido da ISOFAR (Brasil) e o cloreto de amônio da Labsynth (Brasil). O cloreto de potássio foi da Carlo Elba (Brasil). O sulfato de magnésio da Proquímicos (Brasil). O cloreto de bário foi obtido da Quimibrás (Brasil). O sulfato de quinina foi adquirido da Fluka (Alemanha). A membrana de diálise (tamanho do poro 3.5 kDa) foi da marca Spectrum Laboratories Inc. (EUA). Soluções tampão de pH 4,00, 7,00, e 9,00, da Dinâmica (Brasil), foram usadas para calibrar o pHmetro.

3.2 Instrumentos

Um espectrômetro de fotoluminescência, modelo LS-55 da Perkin-Elmer (Reino Unido), foi utilizado para obter os espectros de luminescência e para medições de intensidade luminescente em estado estacionário ($\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ fixos). Cubetas de quartzo foram usadas para acondicionar as soluções/dispersões para medição de luminescência. Quando foi necessário manter a temperatura da cubeta constante durante a medição, utilizou-se um banho termostático (PTP-1 de sistema Peltier e PCB1500Water, Perkin-Elmer). Os espectros eletrônicos de absorção no UV-Vis foram obtidos com um espectrofotômetro, da Agilent (EUA), Cary Varian 100 Conc com duplo feixe. O analisador DLS SZ-100 Nanopartica (Horiba, Japão), equipado com um laser de 10 mW de 532 nm, foi usado para medição de

espalhamento dinâmico de luz e de potencial zeta. Na espectroscopia Raman foi utilizado um espectrômetro microRaman modelo Xplore da Horiba (Japan) equipado com um detector de dispositivo de carga acoplada e um laser de estado sólido. As medições de teor de carbono foram feitas em um Analisador de Carbono modelo TOC-VCPN (Shimadzu, Japão). Para a análise de injeção em fluxo foi utilizado um sistema FIALab 2000 (FIALab Instruments, EUA) acoplado ao espectrofluorímetro FluoroMax®-4 (Horiba, Japão). Na preparação do nanomaterial utilizou-se chapa de aquecimento modelo 509 da Fisatom (Brasil) e uma chapa com agitação modelo 751 da Fisatom (Brasil). As medições de massa foram realizadas numa balança analítica modelo msu da Cubis® (Alemanha), calibrada pelo laboratório Peso Exato Automação (Rio de Janeiro). As medições de pH foram realizadas em um pHmetro modelo 827 da Metrohm (Brasil). O eletrodo utilizado foi do tipo de membrana de vidro, selado e conjugado com eletrodo de referência de Ag|AgCl(KCl_(sat)).

3.3 Procedimentos

3.3.1 Preparo das dispersões de GQDs

Os GQDs foram preparados utilizando a hidro-esfoliação dos precursores orgânicos fundidos, que consistia em ácido cítrico e de um modificador químico: ureia (U), tiouréia (TU), tioacetamida (TA) ou glutatona (GSH), adaptando o método de Liu *et al.* (2013). Para permitir uma comparação, os GQDs também foram preparados utilizando apenas ácido cítrico. A metodologia de síntese dos GQDs pode ser vista na Figura 4.

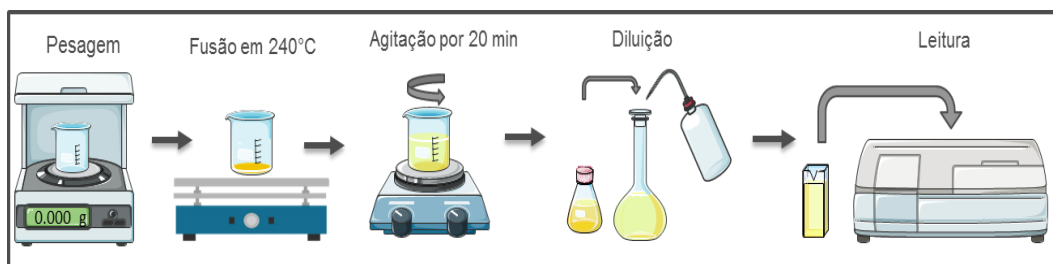


Figura 4: Metodologia de síntese dos GQDs

A mistura sólida com as massas de precursores foi aquecida em um copo béquer, a cerca de 240 °C, até que o material fundido atingisse uma cor marrom clara. Em seguida, a massa pirolisada foi despejada em um béquer contendo 100 mL de água ultrapura, em temperatura ambiente, formando uma mistura amarelo pálido rica nos chamados pontos quânticos de grafeno (essas misturas foram chamadas de dispersões originais), que ficaram sob agitação por 20 minutos. A dispersão obtida passou por uma diluição para se adequar aos parâmetros do equipamento e de otimização experimental.

Para o GQD-TU, após se definir como a sonda de trabalho, a mistura sólida com as massas de 0,5g de ácido cítrico e 0,166g de tiouréia foi fundida e vertida para um béquer contendo 50 mL de água ultrapura, conforme o procedimento já relatado anteriormente. Durante o estudo dos efeitos da purificação através da diálise, a mistura foi dialisada durante 24 h utilizando uma membrana de diálise (3,5 kDa) com uma troca de água após 8 h de experimento.

3.3.2 Preparo de soluções e dispersões de trabalho

As dispersões aquosas de GQDs-TU foram preparadas diluindo 2 mL da dispersão original de síntese com água ultra pura em um balão volumétrico de 100 mL. Soluções estoque padrão de 1000 mg L⁻¹ das aminas biogênicas foram preparadas dissolvendo quantidades apropriadas de putrescina, cadaverina e histamina em água ultrapura. Os sais NH₄Cl, BaCl₂.2H₂O, Na₂HPO₄.7H₂O, MgSO₄.7H₂O, NaCl, CaCl₂.2H₂O, KCl, FeCl₃.H₂O foram utilizados como solução

estoque para o estudo de interferentes dissolvendo quantidades apropriadas em água ultrapura. As soluções estoques continham 10 mg L⁻¹ de Ba²⁺ e Fe³⁺ e 500 mg L⁻¹ de Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ e PO₄³⁻ que eram os íons de interesse.

3.3.3 Medições de fotoluminescência

A fotoluminescência dos GQDs foi medida após as dispersões originais terem sido diluídas em água ultrapura e transferidas para uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm e de quatro faces transparentes. Após se obter os espectros de excitação e de emissão - com bandas espectrais passantes de 10 nm e velocidade de varredura de 1200 nm min⁻¹ - o par de comprimentos de onda de excitação e emissão máximos ($\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$) foram selecionados para realizar medições de sinal no estado estacionário, conforme indicado na Tabela 3. As bandas espectrais passantes foram de 10 nm (excitação e emissão).

Tabela 3: Comprimentos de onda de excitação e de emissão utilizados para medir fotoluminescência das diferentes dispersões de pontos quânticos

Dispersão	Faixa de emissão analisada (nm)	Comprimento de onda emissão (nm)	Faixa de excitação analisada (nm)	Comprimento de onda excitação (nm)
GQDs	400-600	470	220-450	380
GQDs-U	365-600	439	200-400	349
GQDs-TU	365-600	432	250-400	345
GQDs-TA	365-600	433	200-420	332
GQDs-GSH	365-600	430	200-400	349

A fotoluminescência medida a partir de dispersões contendo putrescina ou outras AB (L) foi normalizada pelos seus respectivos sinais em branco (L_0) a fim de estabelecer uma relação crescente entre o sinal normalizado ($L-L_0$) e a concentração de aminas. O L_0 é o sinal obtido da dispersão na ausência de AB.

3.3.4 Medições de absorção no UV-vis

Os espectros de extinção (no UV- vis) foram obtidos por espectrofotometria de absorção (ajustadas pela lei de Lambert-Beer) usando pequenas quantidades da dispersão original de GQDs-TU e de putrescina diluídas em água. Estas foram colocadas em cubetas com duas faces transparentes de quartzo, com caminho óptico de 1 cm. A velocidade de varredura foi de 1000 nm min^{-1} e a banda espectral passante foi de 10 nm. A faixa de comprimento de onda varrido foi de 200 a 800 nm.

3.3.5 Rendimentos quântico de fotoluminescência

O rendimento quântico de fotoluminescência (Φ) do GQDs-TU foi obtido comparando a intensidade do espectro de fotoluminescência integrado com a fluorescência de uma solução padrão de referência (QY = 54%) de sulfato de quinina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), conforme metodologia de Melhuish (1961), preparado em ácido sulfúrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). As medições foram realizadas usando excitação tanto de GQDs quanto de sulfato de quinino em 348 nm. A intensidade de fotoluminescência integrada foi calculada medindo toda a área sob o espectro de emissão. A absorvância/extinção da solução/dispersão medida foi mantida em 0,10. O QY foi então calculado conforme a Equação 1:

$$\Phi_x = \Phi_{ST} \left(\frac{\text{Grad}_x}{\text{Grad}_{ST}} \right) \left(\frac{n_x^2}{n_{ST}^2} \right) \quad (\text{Equação 1})$$

Onde Φ , Grad e η representam respectivamente o rendimento quântico de luminescência, a inclinação do gráfico integrado de intensidade de fotoluminescência versus absorvância e o índice de refração do solvente usado para preparar a dispersão de pontos quânticos e a solução padrão. Os subíndices X e ST referem-se respectivamente aos GQDs e ao padrão de referência. Neste experimento, os GQDs diluídos foram dispersos em água deionizada ($n_i = 1,33$) e a solução diluída de sulfato de quinino foi dissolvida em ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹ ($n_s = 1,33$).

3.3.6 Raman, DLS e Potencial Zeta

Para as análises usando a técnica Raman foram depositados 100 μ L da dispersão de GQD-TU dialisada em um vidro e deixados secar ao ar durante 24 horas para permitir a evaporação da água. A espectroscopia Raman foi realizada utilizando um microscópio Raman confocal (HORIBA Scientific). As medições Raman foram obtidas utilizando uma fonte de laser de 532 nm, um monocromador com uma grade de 600 linhas/mm e uma potência de radiação a laser de 1mW.

As medições de espalhamento dinâmico de luz – do inglês, *Dynamics light scattering* (DLS) – foram realizadas para a obtenção das distribuições de diâmetro hidrodinâmico e do potencial zeta de GQDs-TU. As análises do potencial zeta foram conduzidas em uma faixa de pH entre 2 e 12, sendo os ajustes de pH realizados por meio de soluções de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ e hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹. A determinação do diâmetro hidrodinâmico foi determinada usando uma quantidade de 500 μ L de cada amostra contendo o material (GQDs-TU) foi alocada em uma cubeta de poliestireno com quatro lados opticamente transparentes, com um caminho óptico de 1 cm, previamente lavada várias vezes com água recém-obtida do sistema Milli-Q®. A amostra foi diluída até atingir o volume de 2,0 mL, e as cubetas foram cobertas para evitar contaminação por poeira. As análises foram realizadas utilizando o equipamento SZ-100 Nanoparticle, da Horiba, equipado com um laser de 10 mW com comprimento de onda de 532 nm. Todas as medições

foram realizadas em triplicata, com um tempo de exposição de 120 s, a uma temperatura de 25 °C e em ângulos de 90 ou 173°. As funções de autocorrelação obtidas foram ajustadas utilizando o software HORIBA NextGen Project SZ-100 para Windows, a fim de fornecer distribuições e valores médios do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas.

3.3.7 Flow injection analysis (FIA)

O controle da bomba e da válvula de injeção foi executado através do software FIALab para Windows 5.0, desenvolvido pela FIALab Instruments. Uma célula de fluxo de quartzo de 80 µL (Hellma, Alemanha) com comprimento de caminho óptico de 10 mm foi empregada para a detecção de fotoluminescência no espectrofluorímetro FluoroMax®-4 que desempenhou o papel de detector. Os parâmetros escolhidos para análise de fluxo são dados na Tabela 4:

Tabela 4: Parâmetros operacionais empregados no sistema FIA

Parâmetros	Condições
Diâmetro interno da tubulação	0,8 mm
Comprimento da bobina de mistura	2 m
Tempo de integração	0.2 s
Comprimento de onda de excitação	350 nm
Comprimento de onda de emissão	450 nm

Para a condução do estudo em questão, optou-se por empregar como solução transportadora o branco analítico ou as soluções de putrescina enquanto que na alça de amostragem se colocou a dispersão de trabalho GQDs-TU (sonda).

Isso foi feito para que os picos do fiagrama aparecessem na escola positiva do fiagrama. Estudos realizados na ordem inversa não produziram sinal adequado. O esquema dos componentes presentes na análise realizada por FIA nesse trabalho pode ser visto na Figura 5:

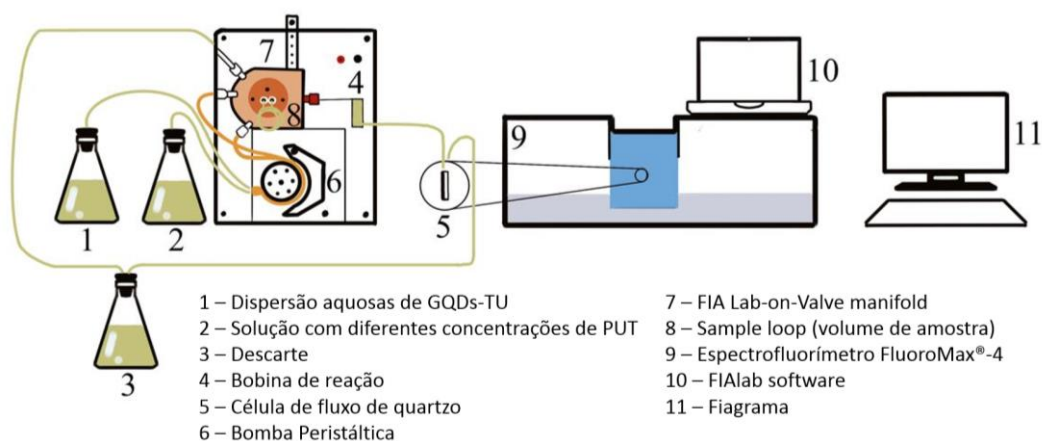


Figura 5: Esquema dos componentes presentes na análise realizada por FIA nesse trabalho

4

Resultados e discussão

4.1 Avaliação preliminar das dispersões de pontos quânticos de grafeno

A primeira etapa do trabalho foi explorar diferentes tipos de GQDs em termos de interação com a putrescina, buscando aquele que produziria algum distúrbio na fotoluminescência que fosse útil do ponto de vista analítico. Para tal, cinco dispersões aquosas coloidais de GQDs, produzidas por fusão e hidro-esfoliação em água ultrapura, foram preparadas a partir do ácido cítrico como único precursor ou misturado com outros compostos contendo heteroátomos (N e/ou S) visando funcionalização da nanoestrutura, no caso a tiouréia (TU), a uréia (U), a tioacetamida (TA) e a glutatona reduzida (GSH). A fotoluminescência foi medida após as dispersões de trabalho originais de GQDs terem sido diluídas em água ultrapura a fim de se adequar a intensidade da fotoluminescência para a escala de medição adequada, em função da saturação do detector do equipamento. Diferentes fatores de diluição foram usados para cada tipo de GQDs, pois a fotoluminescência é afetada conforme a natureza do modificador químico. Os parâmetros experimentais de todas as dispersões estão descritos nas Tabela 5 em que as massas foram escolhidas com base em trabalhos prévios do grupo de pesquisa quando se avaliou a influência das massas relativas dos precursores ácido cítrico e glutatona na luminescência e estabilidade das dispersões (Hertel, 2021).

Os espectros de fotoluminescência obtidos das dispersões podem ser observados na Figura 6. Todos os espectros de emissão dos nanomateriais obtidos com uso de algum modificador químico foram deslocados para o azul quando comparados àquele obtidos apenas com ácido cítrico (GQDs). Eles apresentaram espectros de emissão simétricos (com exceção dos GQDs-TA, que apresentou um ombro mais deslocado para o vermelho) e com máximos únicos que variaram de 430 nm (GQDs-GSH) a 452 nm (GQDs-TU) e seus deslocamentos de Stokes ($\lambda_{em} - \lambda_{ex}$) foram de 81 nm para GQDs-GSH, 94 nm para GQDs-U, 101 nm para GQDs-TA e 101 nm para GQDs-TU, todos com valores próximos aos GQDs de referência (90 nm).

Tabela 5: Parâmetros experimentais de preparo das dispersões de GQDs

Dispersão	Massa Ácido Cítrico (g)	Massa modificador químico (g)	Volume de água ultra pura para hidro esfoliação (mL)	Fator de diluição das dispersões originais
GQDs		-		10
GQDs-U		0,3		100
GQDs-TU	1,0	0,3	100	50
GQDs-TA		0,3		100
GQDs-GSH		0,3		50000

Em seguida, com o objetivo de investigar a variação de fotoluminescência dos GQDs na presença de putrescina foram empregadas concentrações de 5, 15, 30, 50, 70 e 90 mg L⁻¹ desse AB (concentração final de AB na sonda) cobrindo uma faixa de concentração que serviria a construção de curvas analíticas.

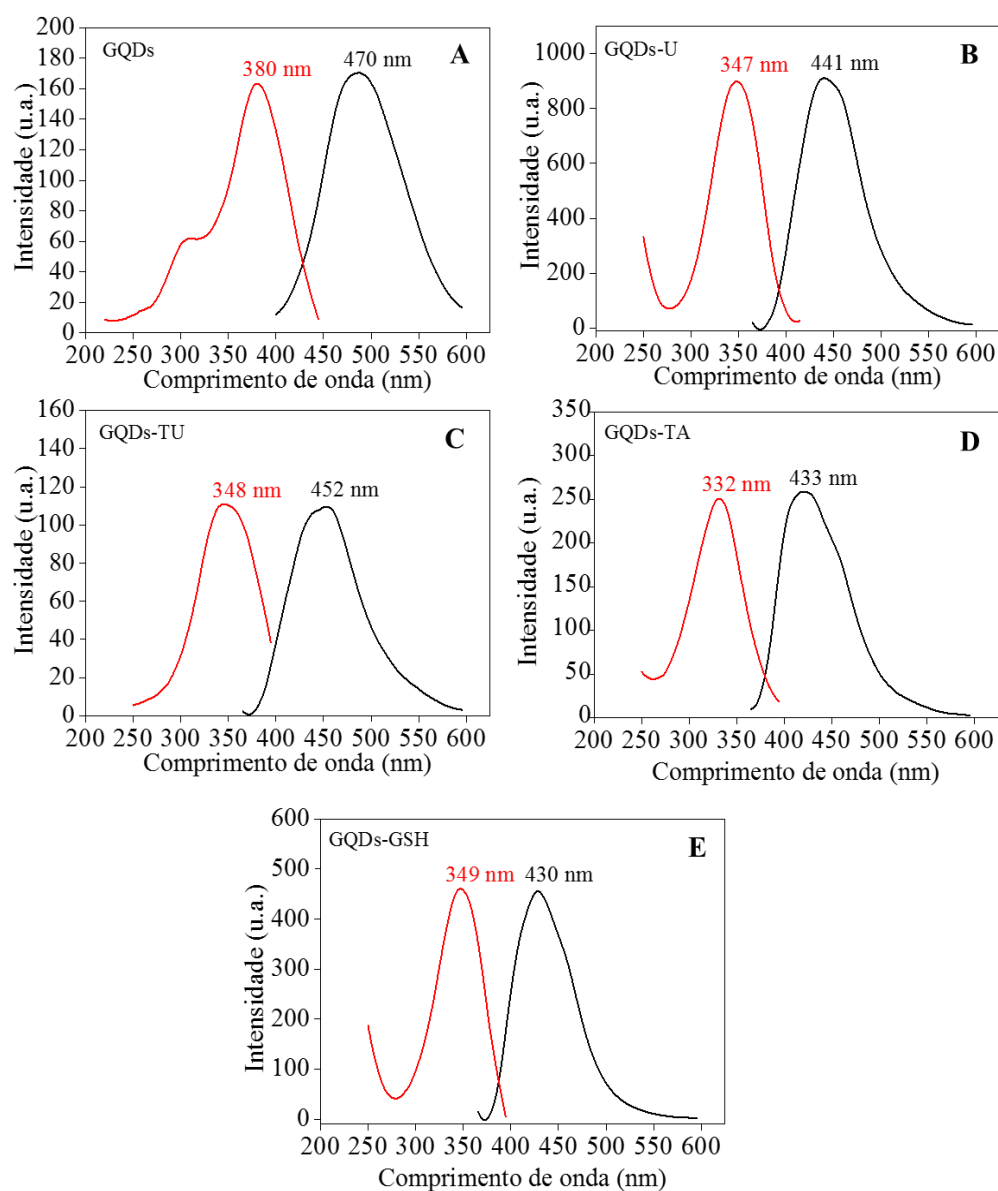


Figura 6: Espectros fotoluminescentes das sondas de GQDs e GQDs-modificados e seus comprimentos de onda máximos de emissão (λ_{em}) e comprimentos de onda máximos de excitação (λ_{ex}), com filtro 10% de transmitância: A) GQDs; B) GQDs-U; GQDs-TU; D) GQDs-TA; E) GQD-GSH

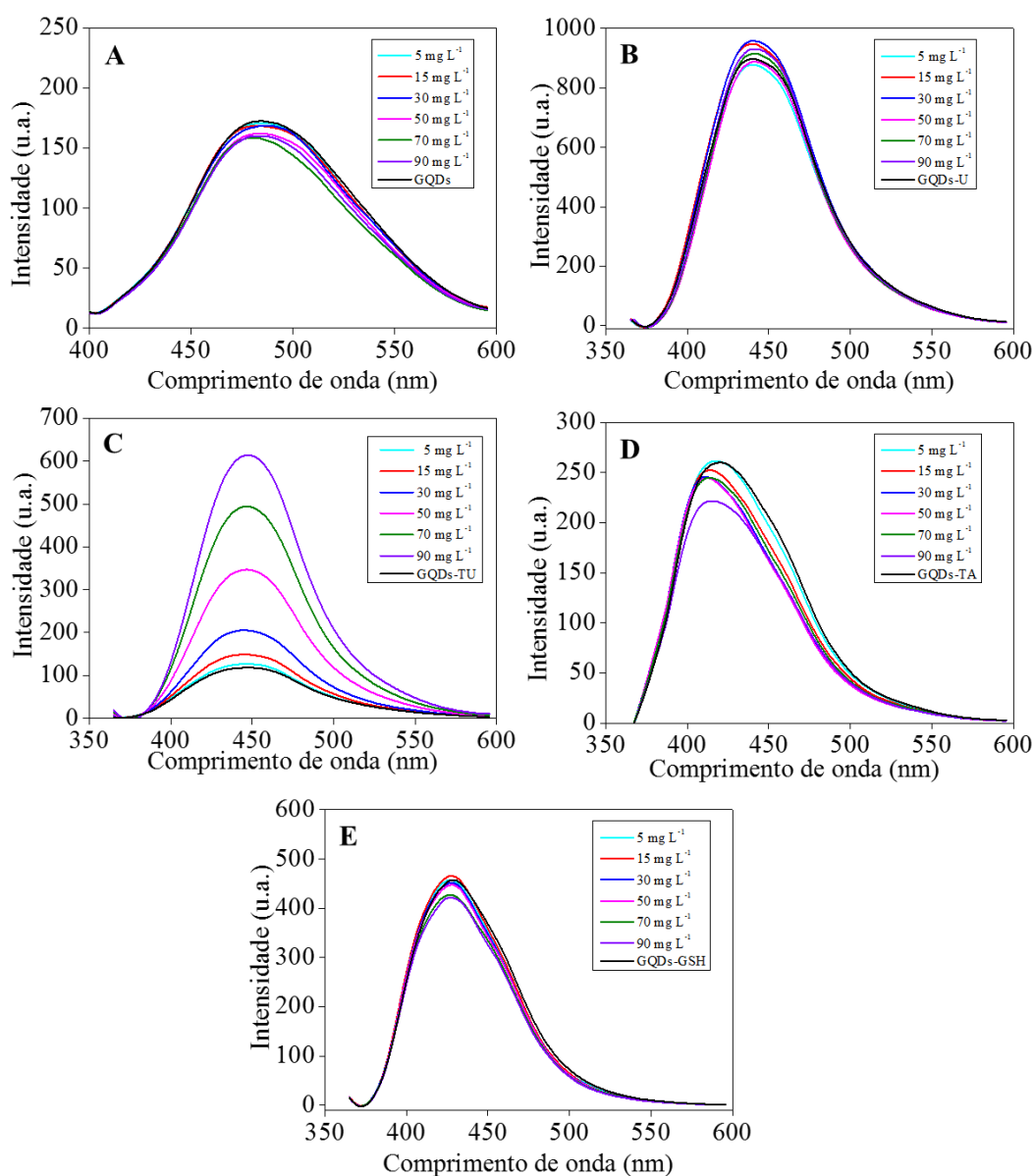


Figura 7: Espectros fotoluminescentes das sondas de GQDs e GQDs-modificados com adição de putrescina: A) GQDs; B) GQDs-U; C) GQDs-TU; D) GQDs-TA; E) GQD-GSH, com filtro 10% de transmitância

Como pode ser observado na Figura 7, a dispersão de GQD-TU foi a que apresentou resposta mais sensível e proporcional em função da presença de putrescina. Para os outros GQDs houve pequena variação de supressão de sinal ou até mesmo variação aleatória de sinal em função da quantidade de putrescina. Ademais, a sonda fotoluminescente GQD-TU é do tipo *turn-on*, ou seja, de ativação, com aumento da fotoluminescência proporcional ao aumento da concentração de putrescina. Provavelmente, funcionalizações advindas do uso da

tiourea (no GQDs-TU) interagem com o par de elétrons não ligantes dos grupos NH_2 da putrescina, favorecendo a transferência eletrônica, aumentando a taxa de recombinação excitônica do nanomaterial (responsável pela fotoluminescência medida).

Em função desses resultados, os estudos prosseguiram apenas com as dispersões de GQDs-TU.

4.2 Características ópticas do GQD-TU e da putrescina (no UV-Vis)

Os GQDs-TU apresentaram um amplo espectro de extinção, onde se pode notar duas bandas (Figura 8), sendo um mais intenso entre 210 e 225 nm atribuído à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ de $\text{C} = \text{C}$ e outro de menor intensidade em 320 e 340 nm para transição $n \rightarrow \pi^*$ de $\text{C} = \text{O}$, como relatado anteriormente para nanomateriais baseados em pontos quânticos de grafeno dopados com N-S (JLASSI et al., 2021). A putrescina não apresentou bandas de absorção na faixa espectral do UV-Visível por não ter grupos que absorvem nessa região.

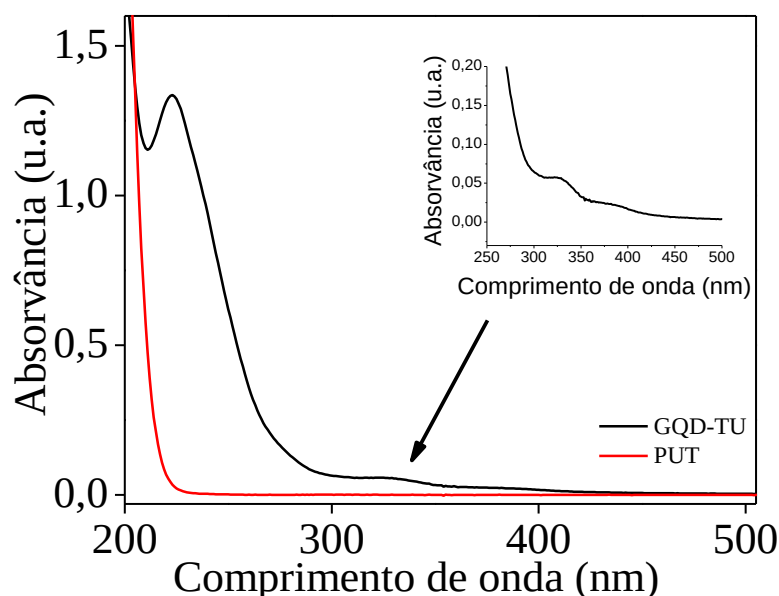


Figura 8: Espectro de extinção da dispersão original de GQDs-TU e da solução estoque de putrescina

Em termos de rendimento quântico fotoluminescente (QY), a diferença para os valores descritos previamente na literatura foi bastante significativa – foram encontrados 3,3% de rendimento. Para o mesmo precursor e modificador químico, usando método hidrotérmico (com refluxo), QU *et al* (2013) e ANH *et al* (2017) encontraram 71% e 41,9%, respectivamente de QY para as dispersões obtidas. Os pares de comprimentos de onda de excitação e emissão máximos ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$) utilizados por esses autores foram 350 nm/442 nm e 340 nm/450 nm, respectivamente, com valores concordantes com esse estudo. Isso indica que o método de produção influencia o efeito doador/receptor de elétrons da funcionalização. Porém a preparação dos GQDs-TU por essa via hidrotérmica de síntese demanda mais etapas, custos operacionais e tempo.

4.3 Estudo da influência das condições experimentais de preparo nas características do GQD-TU

4.3.1 Influência da proporção de massas da mistura de tiouréia e ácido cítrico na sensibilidade da sonda

Com o objetivo de estabelecer a condição para a quantificação de putrescina com a sonda de GQD-TU, avaliou-se primeiramente a produção das dispersões usando diferentes proporções entre as concentrações de precursor e modificador químico em fusão para 50 mL de água ultrapura para a etapa de hidro-esfoliação. A massa de ácido cítrico foi fixada em 0,50 g e a proporção com a tioureia variou conforme a Tabela 6 e usando o mesmo fator de diluição das dispersões originais para medição de fotoluminescência (2:100 v/v em água ultrapura).

Em termos de sinal relativo, a dispersão de GQD-TU obtido com 0,50 g de ácido cítrico e 0,50 g de tiouréia foi a que produziu maior sinal fotoluminescente, que foi aproximadamente 5 vezes maior que o observado para a dispersão obtida com 0,50 g de ácido cítrico e 0,25 g de tiouréia (a que produziu a segunda mais intensa emissão luminescente), como mostrado na Figura 9A. O aumento da massa de tiouréia foi proporcional ao aumento da fotoluminescência medida visto que

mais grupos N e S são disponibilizados durante o processo de produção das dispersões.

Tabela 6: Proporções das massas de ácido cítrico e tiouréia para o preparo das dispersões

Proporção	Massas (g)	
	Ácido Cítrico	Tiouréia
A	0,50	0,50
B		0,25
C		0,166
D		0,125

Observou-se também que não houve modificação significativa no máximo de emissão em função da alteração da proporção de precursores. Porém, intensidade não é o fator mais importante, pois esta pode ser modulada em função do fator de diluição da dispersão original na condição de sonda. O mais importante é como a putrescina altera a luminescência dessas sondas (dispersões de GQDs-TU).

Assim, testes foram realizados com adição de três diferentes concentrações de putrescina (5, 50 e 90 mg L⁻¹). Como se pode observar na Figura 9B, a dispersão com maior quantidade de tiouréia produziu aumento brusco de sinal que saturou nas duas maiores concentrações. Para as outras três dispersões, houve um comportamento muito similar com a dispersão feita com 0,50 g de ácido cítrico e 0,166 g de tiouréia produzindo um aumento de sinal mais harmônico como indicado pelo melhor ajuste linear entre os três pontos testados ($R^2 = 0,987$). Com base nos resultados, optou-se pela dispersão preparada com 0.166 g de tiouréia (proporção C) para a preparação da sonda analítica.

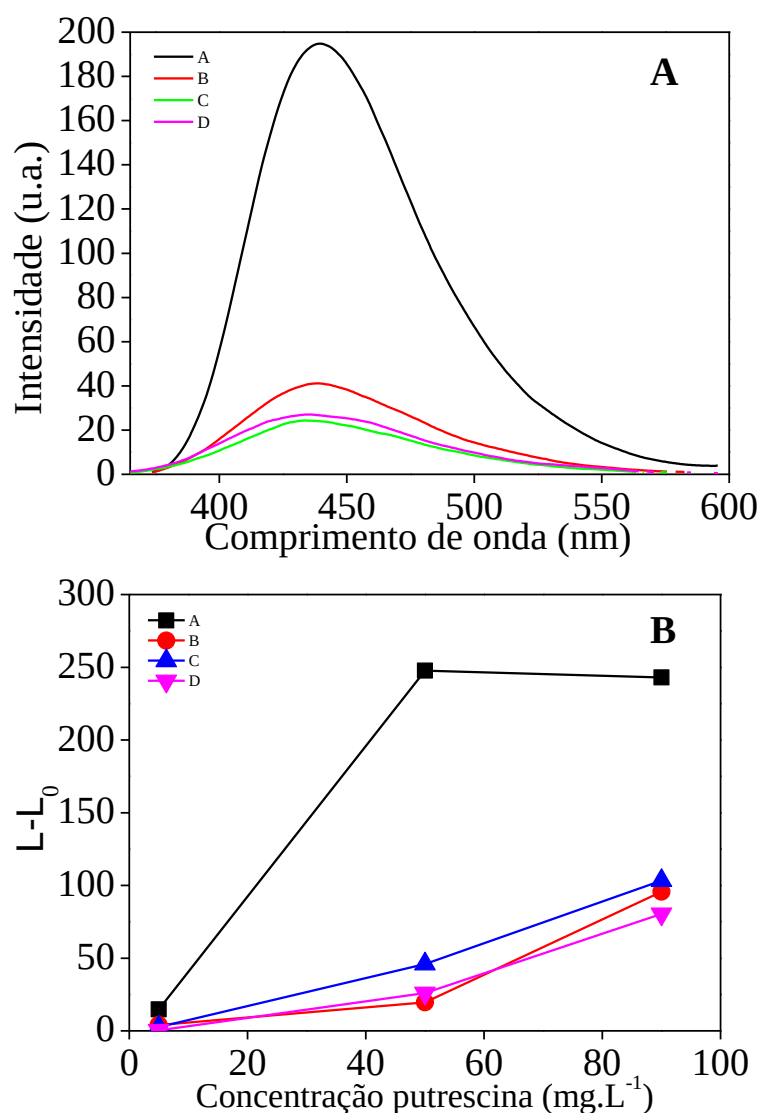


Figura 9: A) Fotoluminescência da sonda GQD-TU sintetizada em diferentes proporções de massa de precursor e modificador químico, com uso de filtro com 1% de transmitância. B) Curva normalizada para GQDs-TU na presença de concentrações crescentes de putrescina para as sínteses nas proporções de ácido cítrico e tiouréia sendo respectivamente: A) 0,5 g/ 0,5 g; B) 0,5 g/ 0,25 g; C) 0,5 g/ 0,166 g e D) 0,5 g/ 0,125 g

4.3.2 Influência da diluição da dispersão na sensibilidade da sonda

Após se escolher a proporção de massa entre precursor e modificador químico em relação ao volume de água usada na hidro-esfoliação, se prosseguiu com a avaliação da proporção de diluição da dispersão de GQD-TU. A diluição

determina o número relativo de nanopartículas na sonda o que implica no nível de sinal do branco da sonda e na relação analito-nanopartícula, lembrando que um único GQD pode ter mais de um sítio de interação.

As proporções v/v estudadas de diluição da dispersão dialisada foram 1:100; 2:100; 4:100 e 6:100 em água ultrapura. As concentrações de putrescina utilizadas foram mantidas em 5, 50 e 90 mg L⁻¹ como no experimento citado anteriormente.

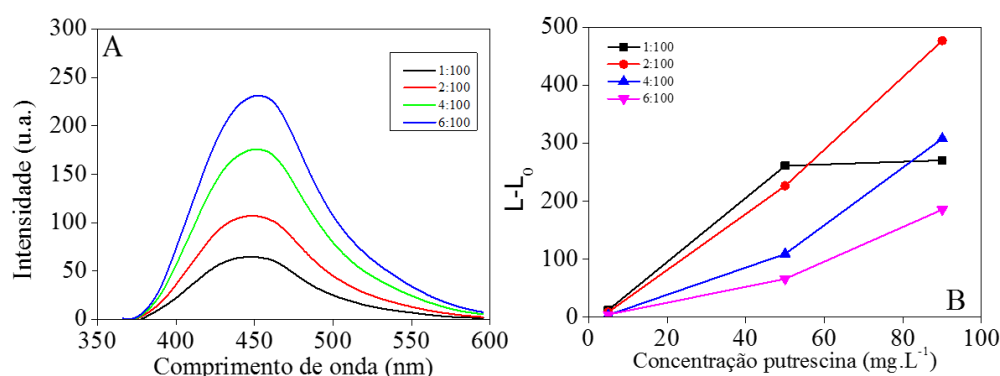


Figura 10: A) Fotoluminescência da sonda GQD-TU em diferentes proporções de diluição da dispersão, com uso de filtro com 10% de transmitância. B) Curva normalizada para GQDs-TU na presença de concentrações crescentes de putrescina para TU em diferentes proporções de diluição da dispersão

Na Figura 10A se observa os sinais originais das sondas que aumentam proporcionalmente na medida que o fator de diluição diminui sem ocorrência de saturação de sinal, nessa escala de diluição. Como a escala do instrumento satura em 1000 unidades arbitrárias, em todos os casos existe espaço na escala para crescimento de sinal por conta da interação com um analito que atua aumentando a eficiência da recombinação do excitônico, como é o caso da putrescina. Ao se adicionar concentrações crescentes de putrescina (Figura 10B) se observou aumento de fotoluminescência das sondas porém, com a diluição 2:100 foi possível obter uma boa ativação da sonda de GQDs-TU, com incrementos de sinal mais harmônicos produzindo crescimento linear, como pode ser constatado pelo coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9944. Essa sonda foi ainda a que apresentou melhor diferenciação entre as concentrações de analito, principalmente para maiores concentrações de putrescina. No caso da sonda com menor fator de

diluição observou-se saturação de sinal emitido enquanto que para as que tiveram maiores fatores de diluição (4:100 e 6:100) as sensibilidades foram menores que a da sonda 1:200 e também linearidade degradada por conta de um súbito aumento de sinal para a concentração de 90 mg L⁻¹ de AB.

4.3.3 Influência do método de purificação da dispersão na sensibilidade da sonda

Na produção de GQDs, alguns trabalhos propõem a inclusão de uma etapa de diálise após a etapa de preparação (LIU *et al*, 2021; ZHU *et al*, 2022). Esse procedimento se mostra eficaz na remoção de impurezas ou resíduos de precursores que podem se originar durante a produção do nanomaterial, garantindo assim que os GQDs estejam altamente purificados. Ademais, a diálise oferece a vantagem de controlar o tamanho dos GQDs, tornando o material disperso mais homogêneo. Ao escolher membranas de diálise com poros de tamanho apropriado, torna-se possível reter no interior da membrana os GQDs do tamanho desejado, permitindo a separação de GQDs menores conforme as necessidades da aplicação, já que as propriedades fotofísicas podem variar de acordo com o tamanho do nanomaterial. Para compreender como essa etapa de purificação afeta a sensibilidade da sonda (GQDS-TU), se preparou uma curva analítica com a dispersão dialisada diluída em água ultrapura na proporção 2:100 e adição de putrescina nas concentrações de 5, 15, 30, 50, 70 e 90 mg L⁻¹.

A partir dos dados organizados na Figura 11 é possível concluir que a purificação usando membrana de diálise reduz consideravelmente a intensidade fotoluminescente da sonda visto que a quantidade de carbono também foi reduzida. Ao se mensurar o teor de carbono total nas dispersões originais e na dispersão dialisada variou de 3,60 mg L⁻¹ para 0,59 mg L⁻¹, respectivamente. A sonda com dispersão dialisada apresenta um crescimento intenso de sinal quando a concentração de putrescina é variada de 5 para 15 mg L⁻¹, porém o sinal para de crescer para maiores concentrações, talvez indicando que o conjunto de

nanopartículas já interagiu com o máximo de moléculas de analito em seus sítios de interação. Sendo assim, a etapa de purificação foi descartada.

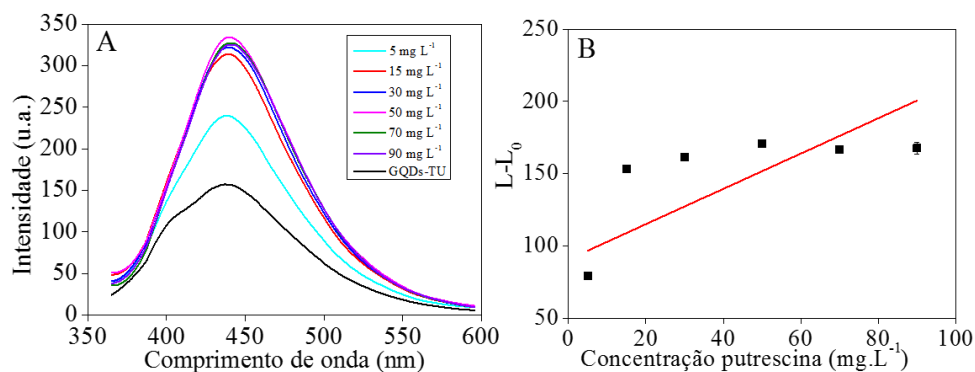


Figura 11: A) Resposta fotoluminescente da dispersão da sonda GQDs-TU dialisado na presença de concentrações crescentes de putrescina, com uso de filtro com 10% de transmitância. (B) Curva analítica normalizada para a fotoluminescência de GQDs-TU dialisados na presença de putrescina: $y = (1,2) C_{\text{putrescina}} + (90,7)$ ($R^2 = 0,650$).

4.3.4 Influência do pH da dispersão na sensibilidade da sonda

No passo seguinte para o ajuste de condição de sonda foi realizado um estudo para avaliar o perfil de fotoluminescência medida para as dispersões de GQDs-TU em função do pH - na faixa de 2,0 a 12,0 - tentando encontrar uma correlação com a carga superficial das nanopartículas. Os valores finais de pH foram ajustados pela adição de pequenas alíquotas de soluções de HCl ou NaOH (0,1 mol L⁻¹). O pH da dispersão original de GQDs-TU diluída em água foi 3,3, sendo essa utilizada para representar o pH 3 do experimento.

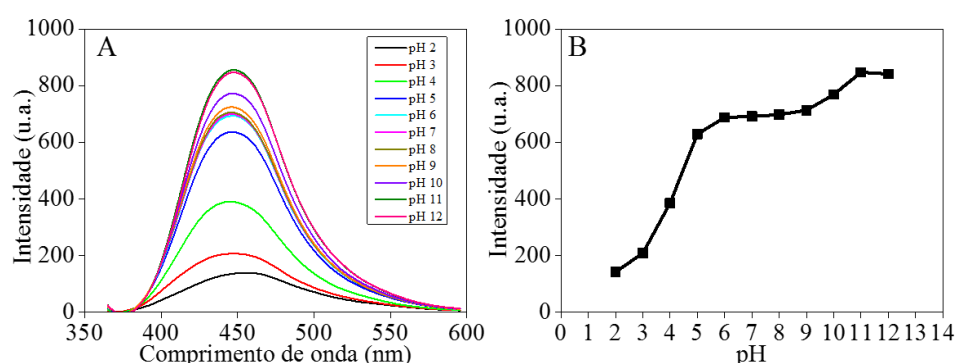


Figura 12: A) Perfis espectrais em diferentes valores de pH, com uso de filtro com 10% de transmitância e B) Influência do pH na intensidade da fotoluminescência da dispersão GQDs-TU.

Observou-se que à medida que o pH da dispersão aumentava, (conforme evidenciado na Figura 12) a fotoluminescência também aumentava, acompanhada por um ligeiro deslocamento espectral em direção à região azul quando o pH do meio transitava de condição mais ácida para uma condição menos ácida (em pH acima de 4,0). Na faixa de pH de 2 a 3, apenas um leve incremento na fotoluminescência medida foi encontrado. No entanto, na faixa entre pH 4 e 5, foi notado um aumento significativo, aproximadamente 166% mais intenso em torno de pH 5 em comparação com pH 3. À medida que o pH variava de 6 a aproximadamente 9, notou-se um incremento modesto, seguida por um acentuado aumento que se estabilizou ao atingir o pH 11.

Em seguida, se realizou a adição de putrescina, para mensurar os efeitos da variação de pH na resposta da sonda na presença do analito. As concentrações utilizadas foram: 30, 50 e 90 mg L⁻¹ e o sinal foi medido como L-L₀, ou seja, a variação de sinal na presença de putrescina em relação ao sinal original da sonda no respectivo pH (Figura 13).

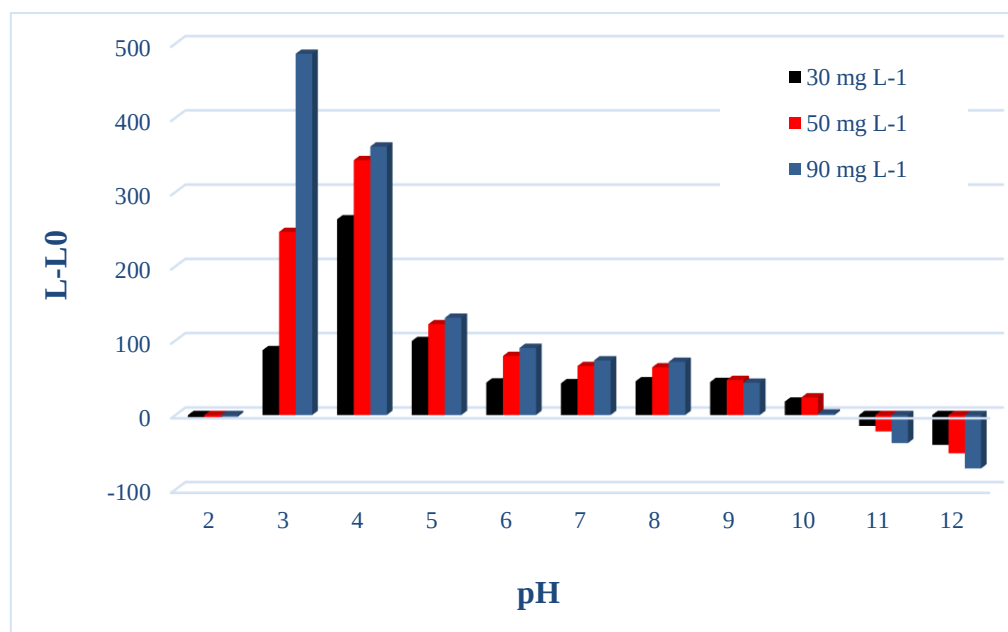


Figura 13: Curva normalizada para GQDs-TU na presença de concentrações crescentes de putrescina para TU em diferentes valores de pH de sonda.

Apesar do pH 4 ter apresentado uma intensidade de resposta melhor para a concentração de 30 e 50 mg L⁻¹ utilizada, o mesmo não se repetiu para a concentração de 90 mg L⁻¹, encurtando a faixa de trabalho que se poderia usar. O pH original da dispersão (pH 3,3), apresentou melhor harmonia na distribuição dos dados das concentrações de putrescina testadas. Para as sondas na faixa de pH 5 a 8, houve crescimento de sinal proporcional à concentração de putrescina, mas com significativa diminuição de sensibilidade da sonda. Já para os valores de pH 9 e 10, não se observou proporcionalidade direta de aumento de sinal com o incremento da quantidade de analito. Para as sondas nos valores de pH 11 e 12 houve um desligamento da sonda à medida que se incrementava a concentração de PUT. Além disso, não foi observada uma diferença significativa na intensidade, mesmo com o aumento da concentração.

Para compreender esse comportamento, foram realizadas medições do potencial zeta ao longo da mudança de pH. Os resultados revelaram um incremento na carga superficial, mostrando valores mais negativos à medida que o pH aumenta. Este fenômeno está associado à desprotonação dos grupos de ácidos carboxílicos presentes na superfície do GQDs-TU diminuindo o grau de agregação do nanomaterial à medida que o pH aumenta. A agregação reduz o confinamento

quântico, impactando a fotoluminescência ao comprometer a recombinação de elétrons entre a banda de condução e a banda de valência, o que explica as luminescências relativamente menores medidas em pH 3 e 5 do que nas observadas nas faixas de 6 a 13. O aumento da carga superficial favorece a diminuição do tamanho hidrodinâmico do GQD-TU, devido à intensificação da repulsão entre partículas. Este comportamento, caracterizado pelo aumento da carga superficial em direção a valores mais negativos, está em concordância com as descobertas reportadas por Franco *et.al* (2023). Os valores do potencial zeta são apresentados na Figura 14.

A putrescina (referência de $pK_a = 10,5$ em água pura) sendo uma amina biogênica tende a se protonar em meio com valores de pH menores, ficando com carga positiva, o que a torna apta a ser atraída eletrostaticamente pela nanopartícula de carga levemente negativa. Essa interação permite transferência de carga que produz o aumento de sinal da sonda. Na medida em que os valores de pH aumentam, a putrescina perde a carga positiva e a interação com o nanomaterial, de carga cada vez mais negativa, diminui.

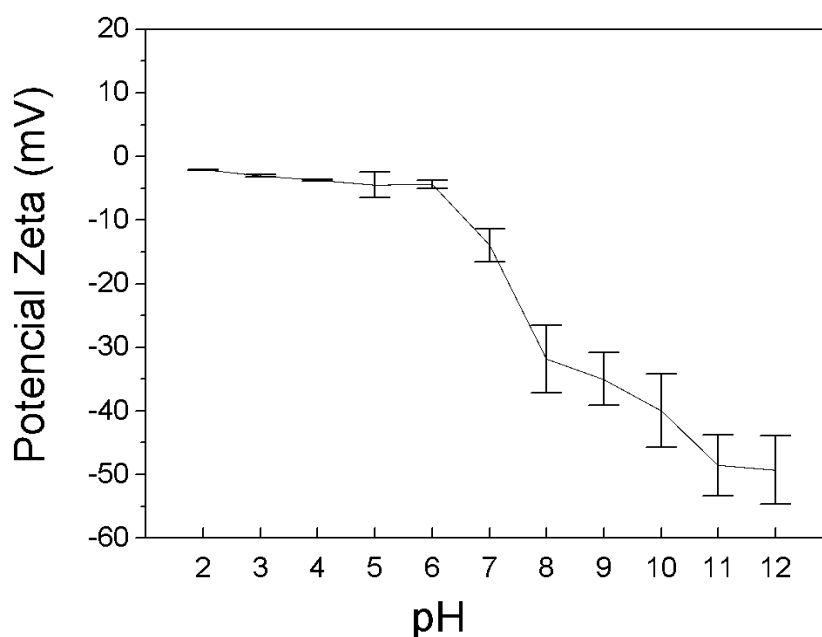


Figura 14: Variação do potencial zeta do GQD-TU em função do pH (Faixa de 2 a 12).

4.4 Estabilidade do sinal de fotoluminescência em função do tempo

A intensidade de fotoluminescência da dispersão de GQDs-TU, previamente diluída na proporção de 2:100 em água ultrapura, foi medida ao longo de um período de 120 minutos, com o objetivo de avaliar sua estabilidade ao longo do tempo, Figura 15A. Em seguida, se adicionou na mesma dispersão uma alíquota de putrescina para a concentração final da putrescina na solução na cubeta ser de 50 mg L^{-1} . Foram realizadas medições por mais 120 min com medições a cada 5 min, Figura 15B.

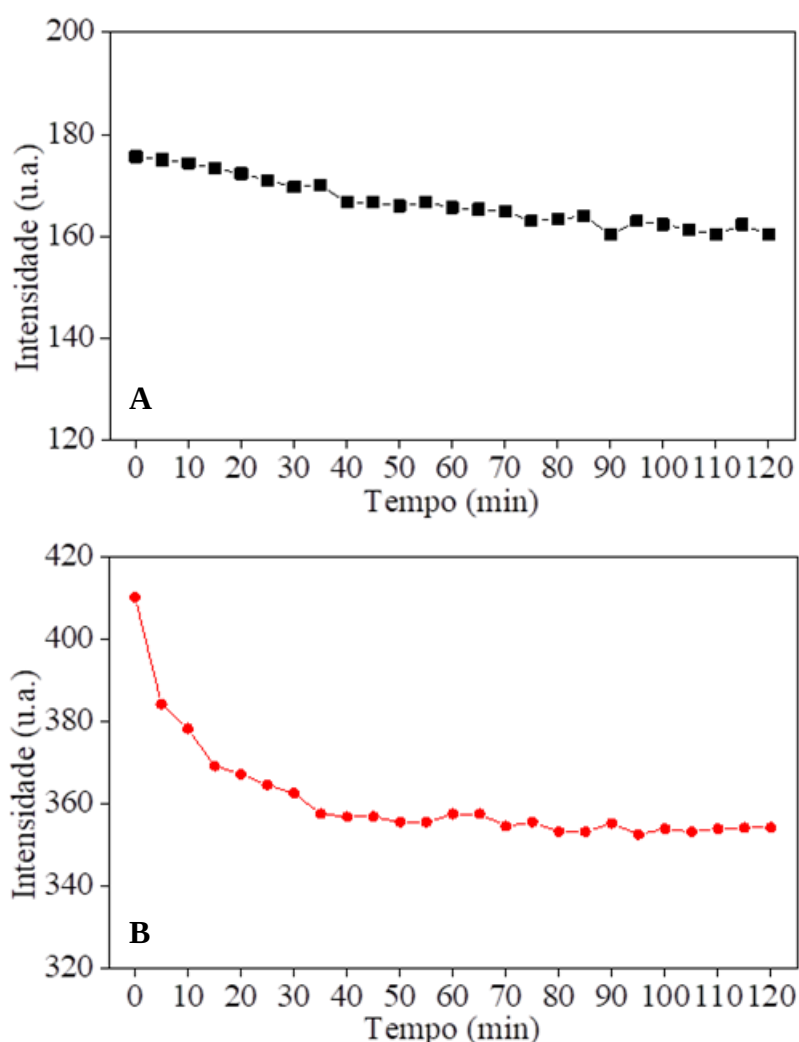


Figura 15: A) Fotoluminescência da sonda GQD-TU mensurada ao longo de 120 minutos, com uso de filtro com 10% de transmitância. B) Fotoluminescência da sonda GQD-TU, após a adição de 50 mg L^{-1} de putrescina, mensurada ao longo de 120 minutos, com uso de filtro com 10% de transmitância

A sonda apresenta razoável estabilidade na intensidade de sinal medido após 40 minutos. A variação entre a maior intensidade (minuto 0) e menor intensidade (minutos 90 e 120) foi de aproximadamente 9%, porém, considerando os sinais medidos em 40 min e 90 min, a variação foi bem menor (3,8 %). Para o sinal da sonda após adição de putrescina, a estabilidade ocorre após 35 minutos, a partir de quando o sinal oscilou aleatoriamente da ordem de 0,79 % (coeficiente de variação). A variação entre a maior intensidade (minuto 0) e menor intensidade (95 minutos) foi de aproximadamente 14%. O tempo para a interação é um fator importante para a estabilização do sinal fotoluminescente. Os resultados indicam que a sonda deve ser preparada previamente e misturada com a putrescina, deixando um tempo adequado para a interação ocorrer antes de se efetuar as medições. Porém, o resultado advindo da interação com a putrescina, com maior sinal nos primeiros minutos da mistura, pode vir a ser vantajoso no caso do uso de método de análise em fluxo, em que não se precisa necessariamente esperar o sistema entrar em equilíbrio (adquirindo estabilidade) para medição de sinal. Nesse caso é apenas necessário que as medições sejam feitas sistematicamente no mesmo tempo, no caso entre a injeção de amostra e a detecção ao final do fluxo.

Ainda para tentar compreender a estabilidade do nanomaterial se procedeu a um estudo de 21 dias medindo o sinal da sonda antes e depois da adição de putrescina. Também se analisou a estabilidade da solução estoque de putrescina se utilizando de duas soluções-sonda: uma preparada a partir de dispersão original produzida no dia da medição e outra preparada com a dispersão original de GQDs-TU obtida no início dos estudos dessa dissertação. As medições foram realizadas após 2 h do preparado das dispersões-sonda (diluição 2:100 v/v com água).

Ao longo dos 21 dias de análise, a fotoluminescência da sonda GQD-TU apresentou comportamento consistente estável, apesar de ter sido observada uma pequena flutuação na intensidade ao longo do tempo, com o menor valor registrado no quinto dia (Figura 16A), que pode ser explicada como uma variação do próprio equipamento de medição. Com isso, é possível apontar que o nanomaterial é estável, uma vez que os valores medidos no primeiro e no último dia foram

comparáveis. No entanto, durante o período de investigação, observou-se uma diminuição na capacidade fotoluminescente da sonda para quantificação de PUT, sendo esta redução proporcional ao aumento da concentração da substância. No ponto mais alto da curva, correspondente a uma concentração de 90 mg L^{-1} , a variação na curva normalizada indicou uma redução de aproximadamente 35% na intensidade de fotoluminescência (Figura 16B e 16C). Esse padrão de comportamento foi consistente independentemente do momento em que a solução estoque de putrescina foi preparada, sugerindo que isso não se deu por conta de eventual degradação do AB. Esse comportamento pode ser explicado por uma modificação gradativa do nanomaterial, possivelmente uma agregação ou uma perda de funcionalidades ativas nas bordas no nanomaterial.

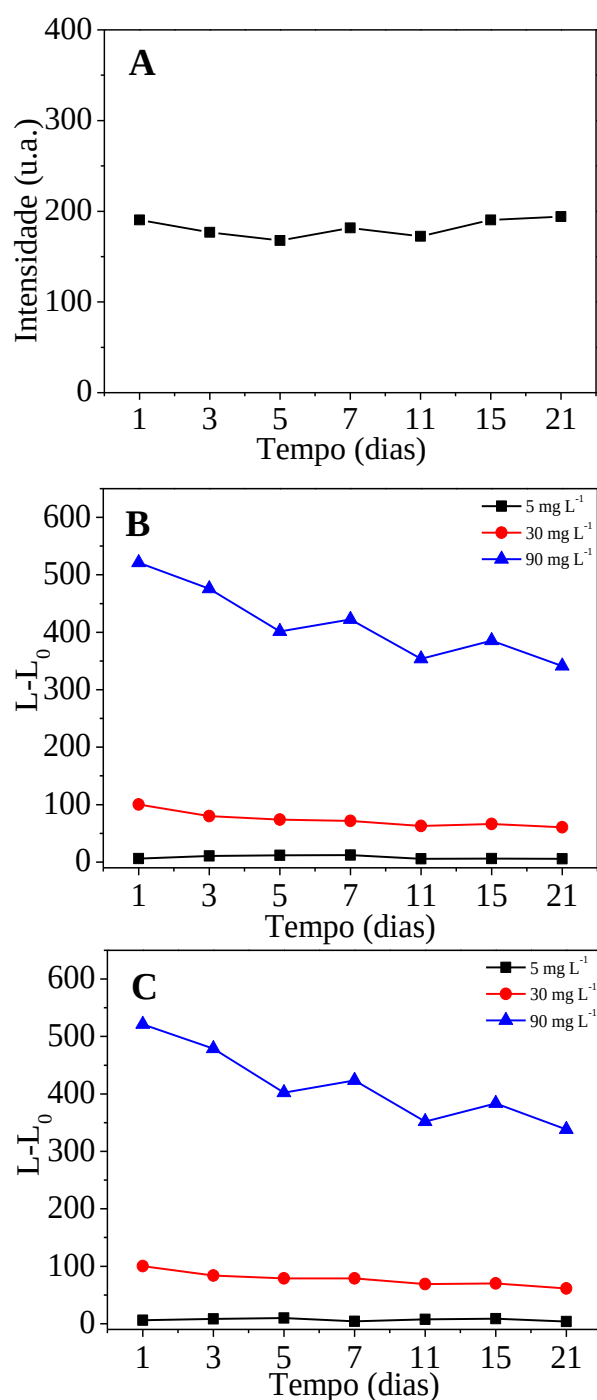


Figura 16: A) Fotoluminescência da sonda GQD-TU mensurada ao longo de 21 dias, com uso de filtro com 10% de transmitância. B) Fotoluminescência da sonda GQD-TU, após a adição de putrescina preparada no dia da medição. C) Fotoluminescência da sonda GQD-TU, após a adição de putrescina preparada no mesmo dia da síntese do GQDs-TU.

4.5 Estudo do efeito da temperatura

Os processos fotoluminescentes são afetados pela temperatura pois o calor adicionado ou retirado do sistema influencia as interações derivadas de colisão e troca de energia, e aquelas que ocorrem em função de uma interação mais longa entre uma espécie química e os sítios da nanopartícula. Para obter mais informações sobre o mecanismo que atua na interação entre os GQDs-TU e a putrescina, se conduziu um monitoramento da ativação da fotoluminescência em relação à concentração crescente de PUT (de 30 a 90 mg L⁻¹) em quatro diferentes temperaturas, variando de 20 a 35°C (resultados na Figura 17).

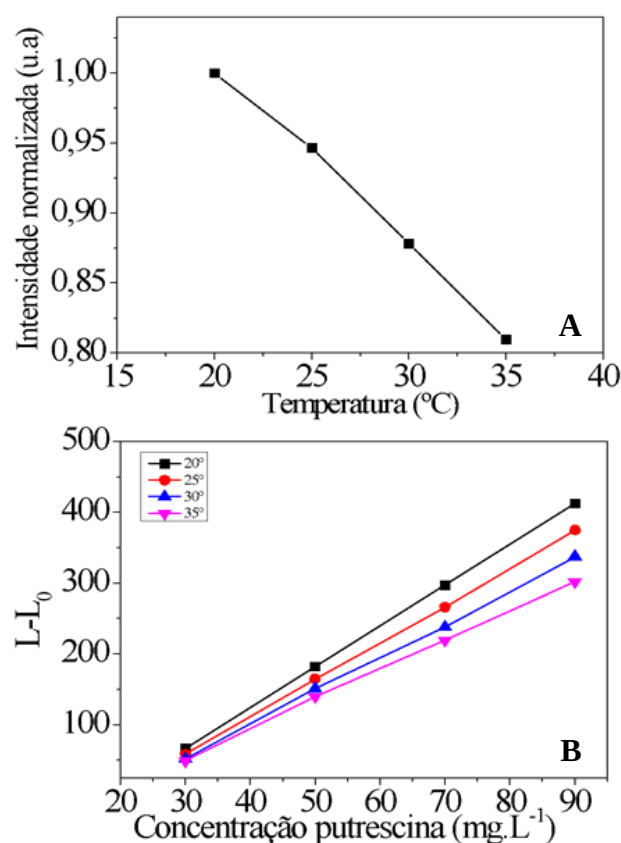


Figura 17: A) Curva normalizada para o efeito da temperatura na fotoluminescência da sonda GQDs-TU. B) Fotoluminescência da sonda GQD-TU na presença de concentrações crescentes de PUT em diferentes temperaturas com uso de filtro com 10% de transmitância.

Os resultados apontaram para uma relação inversa entre a intensidade do sinal da sonda e a temperatura, com uma diminuição de 20% na faixa de temperatura, sem alterações significativas nos comprimentos de onda máximos do espectro (Figura 17A). A ativação da sonda GQDs-TU na presença da putrescina mostrou-se mais eficaz a 20°C, especialmente à medida que a concentração de putrescina aumenta (Figura 17B) como pode ser observado pelo aumento da sensibilidade das curvas analíticas na medida em que a temperatura é menor. Esse comportamento sugere que existe a formação de uma interação de longo prazo responsável pela transferência eletrônica que aumenta a fotoluminescência. A diminuição da fotoluminescência quando o calor do sistema aumenta é provavelmente resultante da ruptura da interação entre GQDs-TU e putrescina ou da dificuldade em se estabelecer tal interação por conta do aumento da convecção no sistema. Sem a interação, ocorre a diminuição da disponibilidade do complexo GQDs-TU e putrescina. Em estudo semelhante, Nemati *et al* (2018) analisaram os efeitos da temperatura para compreenderem o mecanismo da sonda de ativação GQDs-TU e o pesticida etion – na presença de mercúrio – em amostras de alimentos.

4.6 Caracterização da sonda GQDs-TU

Os espectros Raman dos GQDs-TU são apresentados na Figura 18, evidenciando as distintivas bandas D e G do grafeno localizadas a 1349 cm^{-1} e 1607 cm^{-1} , respectivamente. A presença dessas marcantes características Raman (bandas D e G) fornece indícios consistentes da predominância do carbono sp^2 nas nanoestruturas gráficas em análise. Estes resultados corroboram com as observações previamente relatadas por Pedrozo-Penafiel *et. al* (2020). Ademais, o deslocamento para energias menores da banda G indica que ocorre algum grau de empilhamento das nanoestruturas.

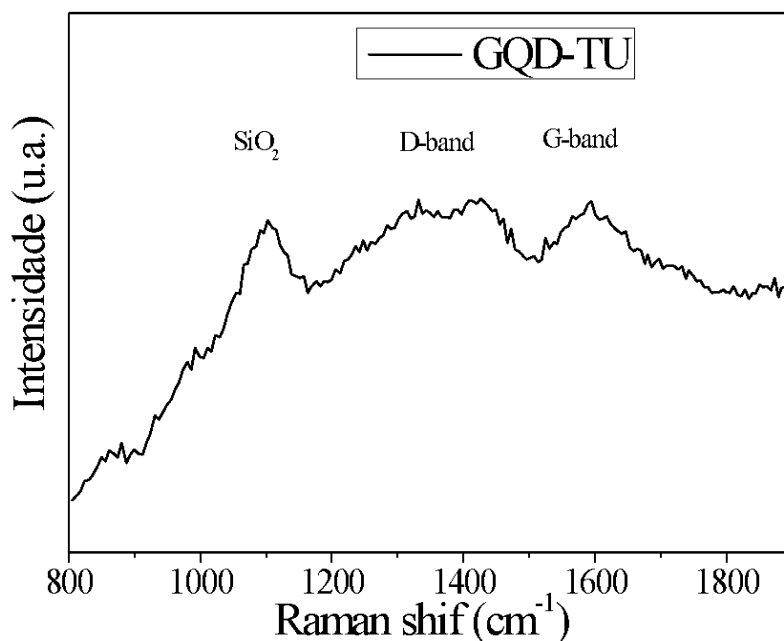


Figura 18: Espectro Raman da amostra de GQDs modificados com tiouréia

Os resultados da determinação do diâmetro hidrodinâmico para os GQDs-TU, em condições de sonda, apresentaram um tamanho médio de 10,5 nm, com variação de 0,8 para ensaio com três replicatas. Este tamanho encontra-se em consonância com os resultados previamente reportados por Franco *et. al* (2023). A manutenção desse tamanho é propiciada pela carga superficial dos materiais, que atua como um impedimento à agregação, favorecendo, assim, o confinamento quântico.

4.7 Características analíticas com medições em batelada

4.7.1. A resposta analítica de GQDs-TU na presença de PUT

pós a definição das melhores condições para a quantificação de putrescina com a sonda GQDs-TU, resumidas na Tabela 8, foram feitas curvas analíticas utilizando as dispersões de trabalho medindo a fotoluminescência da dispersão da sonda antes e após a adição e mistura de volumes crescentes de putrescina, como

visto na série dos espectros da Figura 19A. O intervalo de concentração de solução padrão de putrescina foi de 5 a 90 mg L⁻¹.

O gráfico normalizado mostra uma razoável linearidade em função da concentração do analito ao longo da faixa de concentração testada com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9498, conforme visto na Figura 19B. A equação da curva é dada por $y = (1,5 \pm 0,2) C_{\text{putrescina}} + (-8,3 \pm 5,2)$. O termo $C_{\text{putrescina}}$ é a concentração do analito em mg L⁻¹. Porém, o gráfico de resíduos, 19C, aponta viés em diferentes pontos ao longo da curva ao invés de aleatoriedade, indicado que o modelo de regressão precisa ser ajustado para explicar a tendência dos dados

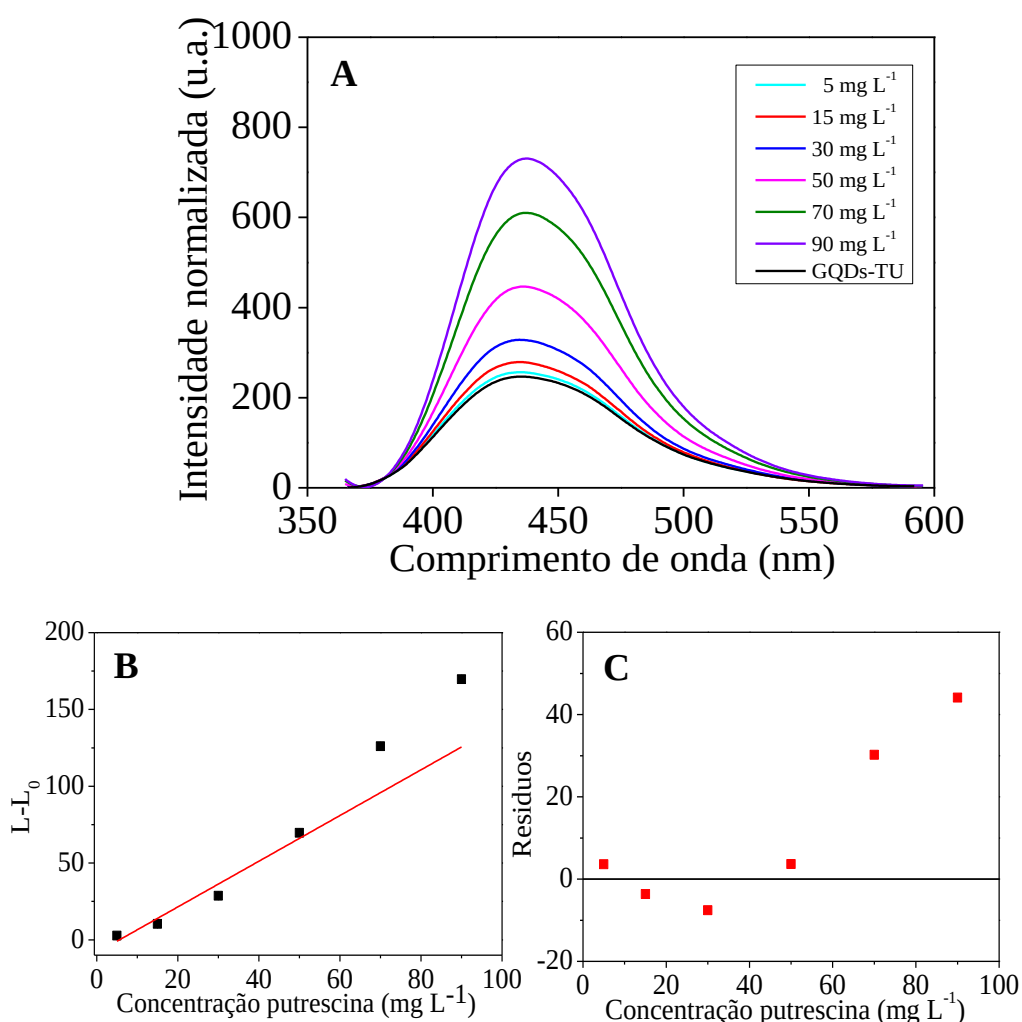


Figura 19: A) Espectro fotoluminescente mostrando as respostas analíticas da curva analítica para PUT usando GQDs-TU como sonda fotoluminescente com concentrações de soluções padrão de PUT em a) 0; b) 5; c) 15; e) 30; e) 50; f) 70; g) 90 mg L⁻¹; B) Curva analítica normalizada para a fotoluminescência de GQDs-TU na presença de PUT usando batelada: $y = (1,5 \pm 0,2) C_{\text{putrescina}} + (-8,3 \pm 5,2)$. ($R^2 = 0,9498$); C) Gráfico com a distribuição de resíduos

Apesar disso, é importante apontar que a regressão linear não deve ser totalmente descartada. Há diversas estratégias que podem ser adotadas para melhorar sua adequação aos dados para a interação da sonda GQDs-TU com a PUT. Por exemplo, ajustes na faixa de trabalho ou na metodologia de normalização do sinal mensurado podem ser implementados para reduzir as distorções. Além disso, os modelos não-lineares tendem a ser mais complexos e de interpretação menos direta dos coeficientes, aumentando o tempo necessário para a análise e obtenção de resultados conclusivos.

Os valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram calculados com base respectivamente em $3s_b/m$ e $10s_b/m$ com s_b com base em dez medições em branco. LOD e LOQ juntamente com os parâmetros da curva analítica são apresentados na Tabela 7. O LOQ foi de $15,1 \text{ mg L}^{-1}$ e foi calculado como uma concentração de putrescina capaz de aumentar a fotoluminescência da sonda por um valor de sinal equivalente a $10s_b$ (onde s_b é o desvio-padrão do sinal medido da dispersão original da sonda). O limite de detecção (LOD) foi de $4,5 \text{ mg L}^{-1}$ considerando o critério de sinal equivalente a $3s_b$.

Tabela 7: Parâmetros operacionais para a sonda GQDs-TU na batelada

Parâmetros	Condições
Massa ácido cítrico / tiouréia	0,5g/0,166g
Volume da dispersão GQDs-TU original/ Volume final da dispersão da sonda	2ml/100ml
Faixa de trabalho	5 – 90 mg L ⁻¹
pH (original)	3,3 – 3,6
Purificação	Nenhuma
Tempo mínimo de repouso	2 h
Temperatura	Ambiente (~22°C)
R ²	0,9498
LOQ	15,1 mg L ⁻¹
LOD	4,5 mg L ⁻¹
Equação da Curva	$y = (1,5 \pm 0,2) C_{\text{putrescina}} + (-8,3 \pm 5,2)$

4.7.2. Estudo de potenciais interferentes

A produção de cerveja envolve componentes naturais como água, cereais, cevada e leveduras que representam as principais fontes endógenas de metais na cerveja. Portanto, a composição mineral da cerveja reflete a composição dos ingredientes e os processos envolvidos em sua produção, variando de acordo com a qualidade dos substratos, o tipo de cerveja e o país de origem. Além disso, os metais na cerveja podem originar-se de substâncias adicionadas para controlar os processos de fermentação, bem como de possíveis contaminações durante o manuseio, armazenamento e transporte, incluindo equipamentos de cervejaria e recipientes – como barris, tonéis e latas – utilizados (Pohl, 2008).

Alguns metais alcalinos e alcalino-terrosos que podem estar presentes em amostras de cerveja brasileiras são Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ e Ba²⁺. Outros íons como Cl⁻, PO₄³⁻ e Fe³⁺ também podem ser encontrados. As concentrações desses íons presentes na literatura são exibidas na Tabela 8.

Tabela 8: Concentração de íons presentes em cervejas brasileiras de acordo com a literatura

Íons	Faixa Linear (mg L ⁻¹)	Referências
PO ₄ ³⁻	37,4 – 140,8	Gama <i>et. al</i> (2017);
Fe ³⁺	<LOQ – 1,6	
Cl ⁻	82,74 – 281,7	
Ca ²⁺	9,8 – 112,0	Pires <i>et. al</i> (2019)
Ba ²⁺	0,005 – 0,154	
Mg ²⁺	24,0 – 79,0	
K ⁺	183,8 – 548,0	
Na ⁺	51,0 – 171,0	

A partir disso, foi realizado um estudo para avaliar a influência desses íons na fotoluminescência medida pela sonda e na sua interação com a putrescina. Foram preparadas soluções padrão estoque de Ba²⁺ e Fe³⁺ (10 mg L⁻¹), de PO₄³⁻, Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ (500 mg L⁻¹) e de K⁺ (1.000 mg L⁻¹) em água ultra pura. As alíquotas foram adicionadas na dispersão GQDs-TU e em dispersões GQD-TU com concentração de putrescina fixada em 50 mg L⁻¹. Os dados de extinção ou incremento da fotoluminescência imposta por esses íons foram normalizados para 1 e podem ser vistos na Figura 20 e na Figura 21.

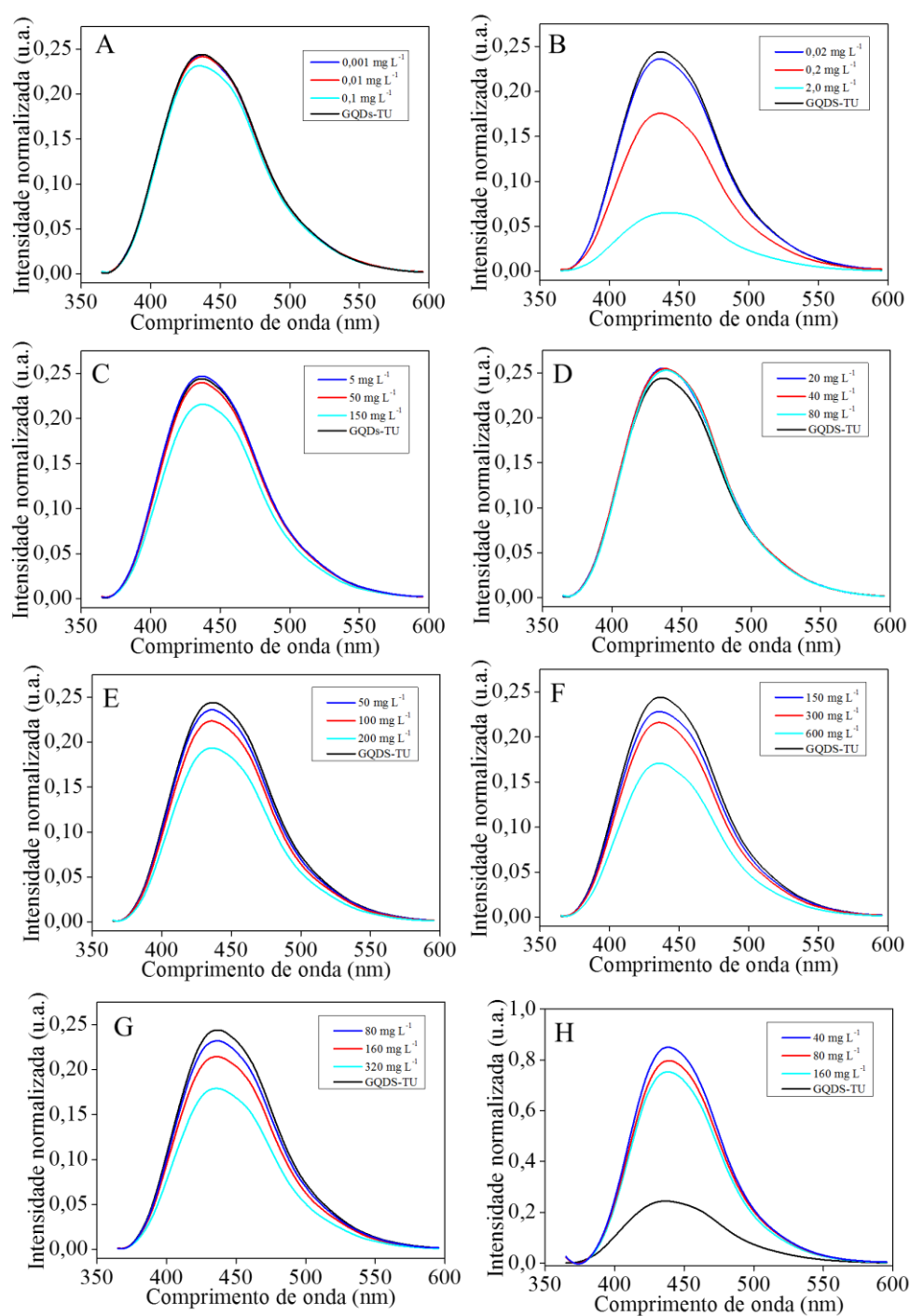


Figura 20: Efeitos produzidos na sonda GQDs-TU na presença de íons que podem ser encontrados em cervejas com uso filtro de 10% de transmitância: A) Ba^{2+} : 0,001; 0,01 e 0,1 mg L^{-1} ; B) Fe^{3+} : 0,02; 0,2 e 2 mg L^{-1} ; C) Ca^{2+} : 5, 50 e 150 mg L^{-1} ; D) Mg^{2+} : 20, 40 e 80 mg L^{-1} E) Na^{+} : 50, 100 e 200 mg L^{-1} . F) K^{+} : 150, 300 e 600 mg L^{-1} , G) Cl^{-} : 80, 160 e 320 mg L^{-1} H) PO_4^{3-} : 40, 80 e 160 mg L^{-1} .

Para Ba^{2+} e Ca^{2+} , a extinção foi quantitativamente significativa apenas na concentração máxima, respectivamente $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ e 150 mg L^{-1} (Figura 20A e Figura 20C). Os íons Fe^{3+} , Na^+ , K^+ , e Cl^- produziram uma diminuição do sinal original da sonda GQDs-TU em todas as concentrações adicionadas (Figura 20B, Figura 20E, Figura 20F e Figura 20G, respectivamente). O efeito máximo de supressão foi alcançado com cerca de 2, 200, 600 e 320 mg L^{-1} , respectivamente para os íons citados. Nessas concentrações, a supressão para Fe^{3+} , Na^+ , K^+ , e Cl^- foi respectivamente 73,36%, 20,70%, 30,05% e 26,64% do sinal original da sonda GQDs-TU. Outros íons como Mg^{2+} e PO_4^{3-} promoveram um acréscimo do sinal original da sonda GQDs-TU. O efeito máximo de incremento ocorreu já na menor concentração testada em ambos os casos e representaram um aumento de 5,40% e 248,19%, respectivamente (Figura 20D e Figura 20H).

Todos os íons, exceto PO_4^{3-} , promoveram uma diminuição da indução de sinal da sonda GQDs-TU após a adição de putrescina demonstrando a interferência na interação dos GQDs-TU com essa AB. Os íons Ba^{2+} , Ca^{2+} e Mg^{2+} produziram uma pequena diminuição do efeito da putrescina no sinal da sonda GQDs-TU em todas as concentrações com efeito máximo de diminuição de 5% (Figura 21A, Figura 21C e Figura 21D, respectivamente). Já Fe^{3+} , Na^+ , K^+ , e Cl^- causaram maiores diminuições do efeito da putrescina no sinal medido após interação com a sonda GQDs-TU com maior efeito máximo de desativação nas concentrações maiores, onde houve uma retração do sinal da sonda GQDs-TU de 88,38%, 9,24%, 17,47%, 26,64, 14,07%, respectivamente (Figura 21B, Figura 21E, Figura 21F e Figura 21G, respectivamente) tomando como referência o sinal medido na presença de putrescina mas na ausência dos interferentes. O PO_4^{3-} promoveu um acréscimo do sinal da sonda GQDs-TU na presença de putrescina, com o incremento o máximo correndo na menor concentração representando um aumento de 35,72% (Figura 21H).

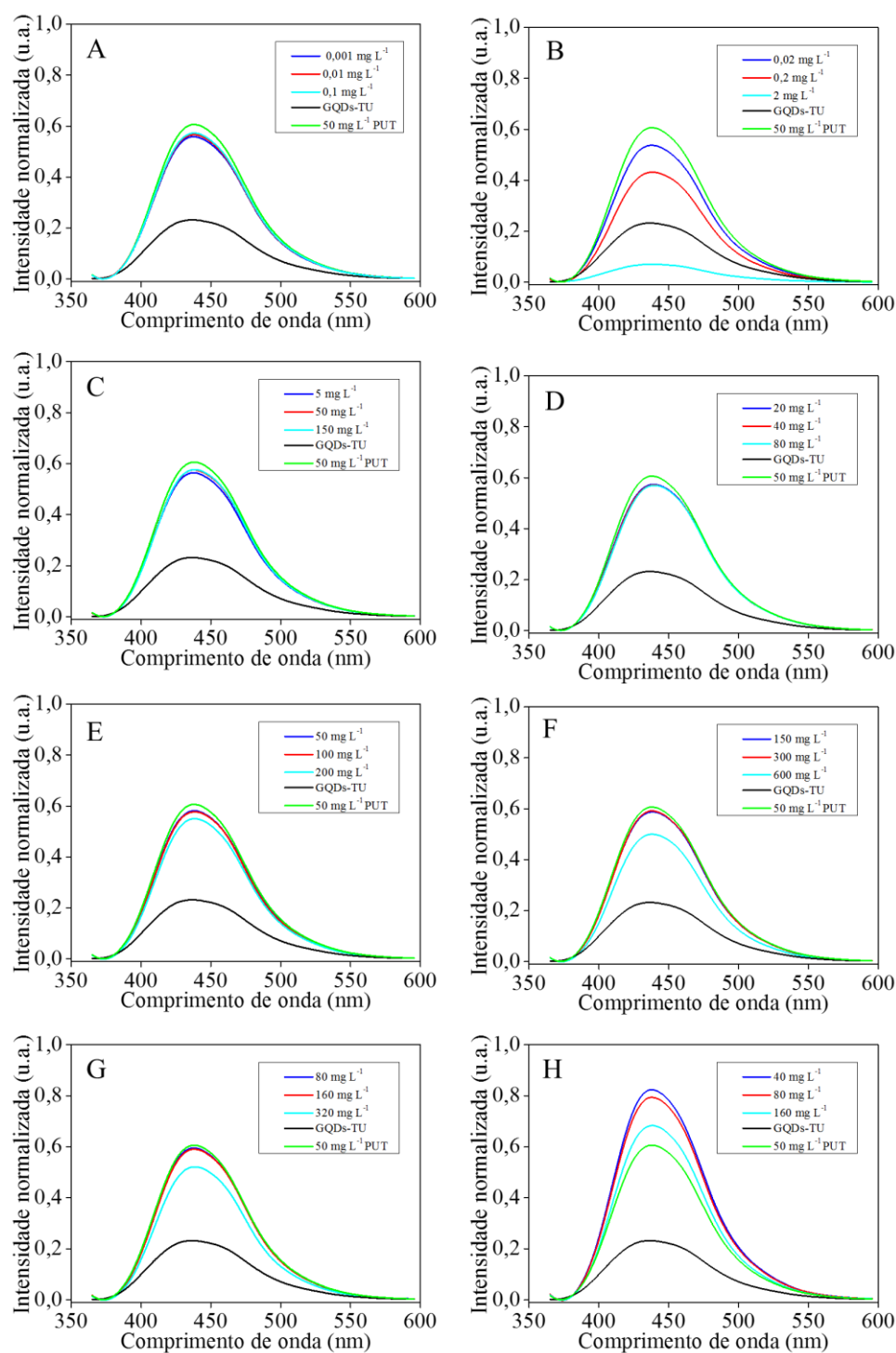


Figura 21: Efeitos produzidos na sonda GQDs-TU, com adição de 50 mg L⁻¹ de PUT, na presença de íons que podem ser encontrados em cervejas: A) Ba²⁺ : 0,001; 0,01 e 0,1 mg L⁻¹; B) Fe³⁺ : 0,02; 0,2 e 2 mg L⁻¹; C) Ca²⁺ : 5, 50 e 150 mg L⁻¹; D) Mg²⁺: 20, 40 e 80 mg L⁻¹ E) Na⁺: 50, 100 e 200 mg L⁻¹. F) K⁺: 150, 300 e 600 mg L⁻¹, G) Cl⁻: 80, 160 e 320 mg L⁻¹ H) PO₄³⁻: 40, 80 e 160 mg L⁻¹.

Os resultados indicam que a putrescina deveria ser separada de íons inorgânicos presentes na amostra, caso estas estejam nas faixas de concentração que impõem interferência. Uma das maneiras seria o ajuste de pH para neutralizar a carga da AB (evitar a protonação dos grupos -NH_2) e proceder uma extração ou micro-extração líquido-líquido com solvente orgânico adequado. Ademais, o uso de um cartucho C18 em extração em fase sólida poderia ser uma opção caso a bioamina esteja desprotonada.

4.7.3 Outros potenciais interferentes

Considerando que a matriz da amostra também pode apresentar outras AB, Figura X, se estudou o comportamento da cadaverina (1,5 diaminopentano) e histamina (2-(3H-imidazol-4-il)-etanamina) frente a sonda GQD-TU. A faixa de trabalho foi de 5 mg L^{-1} até 90 mg L^{-1} , para as duas aminas, seguindo as mesmas otimizações já estabelecidas para putrescina, apresentado na Figura 22.

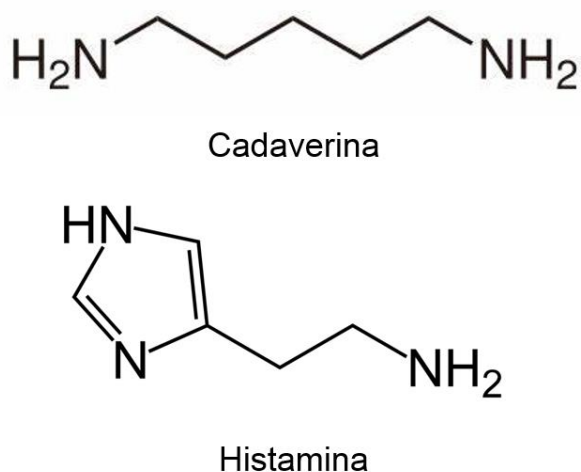


Figura 22: Estrutura molecular das aminas biogênicas cadaverina e histamina

O efeito observado no sinal da sonda na presença das duas AB citadas foi semelhante ao da putrescina na mesma faixa de trabalho. No caso da cadaverina, isso pode ser explicado pela similaridade molecular (com apenas uma diferença de

carbono na cadeia). No caso da histamina, existe um anel imidazol na extremidade da cadeia carbônica linear e apenas um grupamento terminal -NH_2 (ao contrário de dois grupos terminais -NH_2 na cadaverina e putrescina). Sendo assim, se buscou conhecer como a interação dessas aminas impactam na intensidade do sinal da sonda. Para tal, foi fixada a concentração de 20 mg L^{-1} de cada uma dessas aminas. A mistura com as três aminas apresentou um incremento na resposta da sonda superestimando a intensidade para tal concentração de putrescina, como aponta a Figura 23.

A combinação de putrescina e cadaverina revela uma intensidade superior àquela de putrescina e histamina, que, por sua vez, é menos marcante que a combinação de cadaverina e histamina. No entanto, a mistura das três aminas demonstra uma intensidade ainda mais acentuada do que a soma das intensidades individuais ou mesmo quando apenas duas aminas estão presentes na mistura. O resultado é ilustrado no gráfico de barras na Figura 24.

Devido ao aumento do sinal da putrescina devido à presença de outras aminas, como histamina e cadaverina, seria necessário implementar um procedimento de eliminação de interferentes. Em função dessas interferências impostas por outros AB, um procedimento de separação seria necessário para isolar a putrescina. Tal procedimento teria um grau de dificuldade maior em relação aos interferentes inorgânicos por conta da natureza molecular muito similar de várias AB em relação à putrescina.

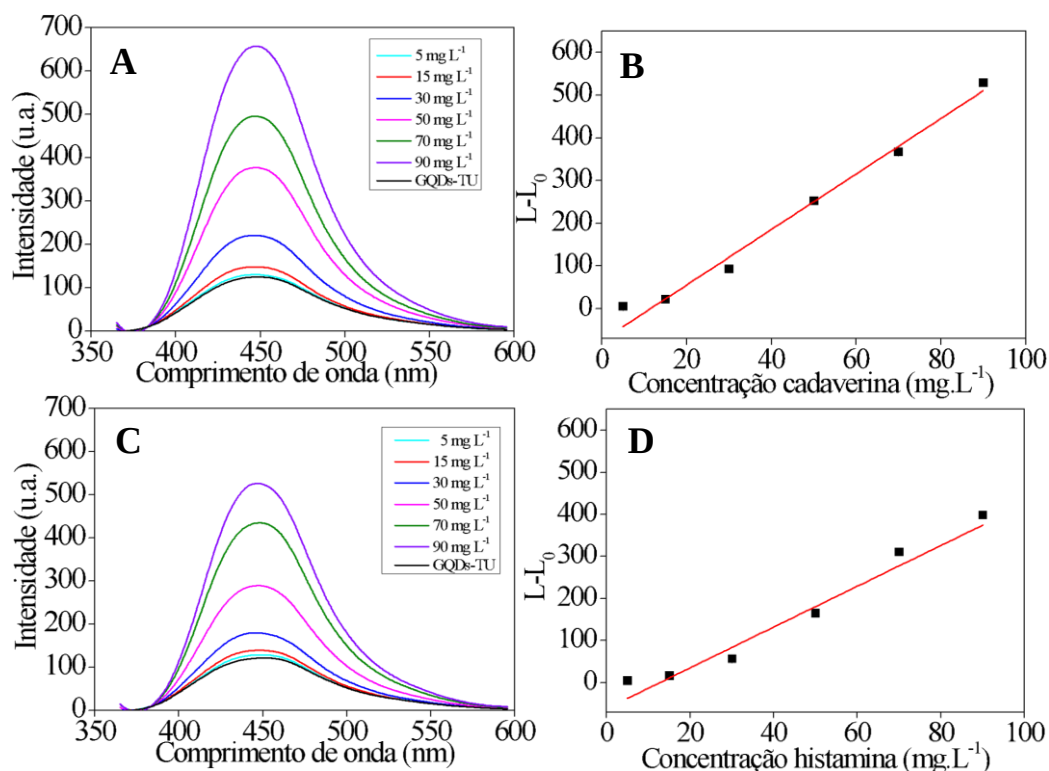


Figura 23: A) Resposta fotoluminescente da dispersão da sonda GQDs-TU na presença de concentrações crescentes de CAD, com uso filtro de 10% de transmitância; (B) Curva analítica normalizada para a fotoluminescência de GQDs-TU na presença de CAD: $y = (6,5) C_{cadaverina} + (-74,8)$ ($R^2 = 0,990$); C) Resposta fotoluminescente da dispersão da sonda GQDs-TU na presença de concentrações crescentes de HIS, com uso filtro de 10% de transmitância e (D) Curva analítica normalizada para a fotoluminescência de GQDs-TU na presença de HIS: $y = 4,8 C_{histamina} + (-62,2)$ ($R^2 = 0,960$).

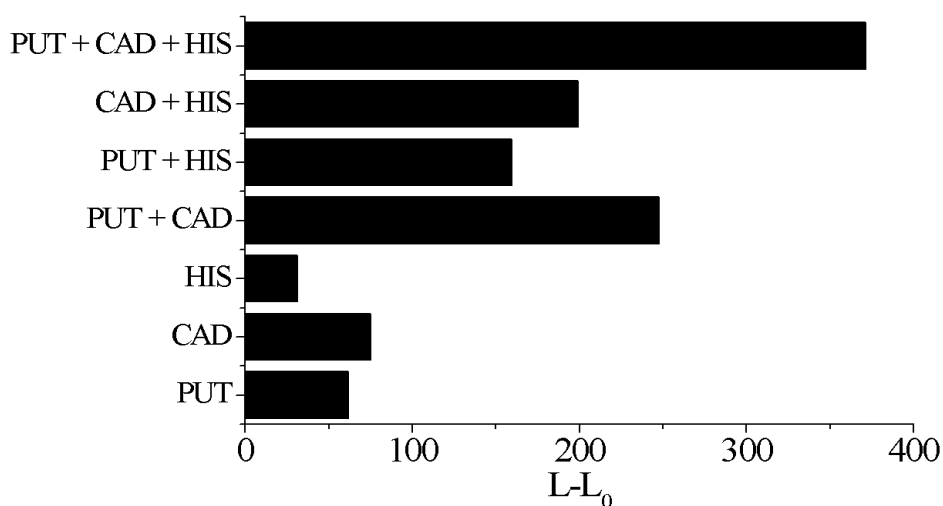


Figura 24: Efeitos produzidos na sonda GQDs-TU, com adição de 20 mg L⁻¹ de PUT, CAD e HIS.

4.8 Adaptação do método em regime de análise de injeção em fluxo

4.8.1. Otimização dos parâmetros na análise de injeção de fluxo

Após as condições de preparo e sensibilidade da sonda terem sido estabelecidas, no regime batelada, o método foi adaptado para análise de injeção em fluxo. Para essa abordagem, a solução de putrescina era a solução carreadora enquanto os GQDs eram introduzidos a partir da alça de amostragem. Tal abordagem foi utilizada para que o sinal do carreador fosse nulo. Inicialmente, três diferentes diluições das dispersões originais de GQDs-TU, com fatores de diluição de 20, 40 e 100 vezes, foram utilizadas para preparar as curvas de calibração. A fotoluminescência da sonda GQD-TU foi medida em água, funcionando como o fluxo carreador de referência, chamado de "branco". Em seguida, a água foi substituída por soluções padrão de putrescina, com concentrações variando de 5 a 100 mg L⁻¹. Para cada concentração do analito, permitiu-se que o carreador fluísse por cerca de 1 minuto para assegurar uma lavagem adequada da solução padrão anterior, antes da introdução da sonda. Nessa etapa, foi utilizada uma vazão de 40% da velocidade máxima da bomba. A banda espectral passante foi fixada em 3 nm. Os resultados desse experimento, que incluiu quatro réplicas de adição da sonda para cada concentração do analito, estão representados na Figura 25, com sinal máximo normalizado para 1,0.

A diluição com fator de 40 vezes foi a que apresentou melhor sensibilidade e a faixa de trabalho se estabeleceu entre 5 até 50 mg L⁻¹. Posteriormente, para otimizar as condições de detecção, procedeu-se à minuciosa otimização dos parâmetros operacionais, englobando o quociente de vazão da bomba, o volume de introdução da amostra e a largura da banda espectral passante.

Como a sonda é de ativação, ou seja, o aumento da intensidade do sinal com o aumento da concentração do analito, se buscou compreender os efeitos da banda espectral passante do instrumento usado como detector. Com o aumento da banda passante para 5 nm, a intensidade da fotoluminescência atinge o valor de saturação do detector do equipamento. Já com a diminuição da passagem do perfil espectral

para 2 nm, obteve-se uma distribuição dos dados melhor com melhor reprodutibilidade do sinal e a resolução adequada dos perfis de tempo de pico da sonda.

Também foram analisados o volume de amostragem (alíquota de GQDs-TU) e o quociente de vazão da solução carreadora. Para se estabelecer o volume de injeção, foram testadas três alças que forneciam volumes de solução introduzidas de 25, 110 e 325 μL . As injeções de 25 e 110 μL produziram picos mais nítidos, porém com menor intensidade, o que afetou a sensibilidade da determinação não permitindo detecção de concentrações maiores que 15 mg L^{-1} . O uso de 325 μL já possibilita boa resposta analítica e permaneceu como a escolha ideal, apesar dos picos não serem os mais bem definidos. O quociente de vazão foi estudado a fim de obter a taxa de amostragem máxima possível para injeção em intervalos estabelecidos. A velocidade máxima da bomba foi ajustada de 40 até 70% e as injeções sequenciais feitos a cada 35 s. A taxa de fluxo que apresentou melhor resolução do perfil de tempo de pico apresentou uma vazão de $2,5 \text{ mL min}^{-1}$, ou seja, 40% da velocidade da bomba. Em taxas de fluxo mais altas o perfil de pico não atingiu a linha de base antes da próxima injeção havendo sobreposição das amostragens. Em resumo, as condições avaliadas e otimizadas podem ser vistas na Tabela 9:

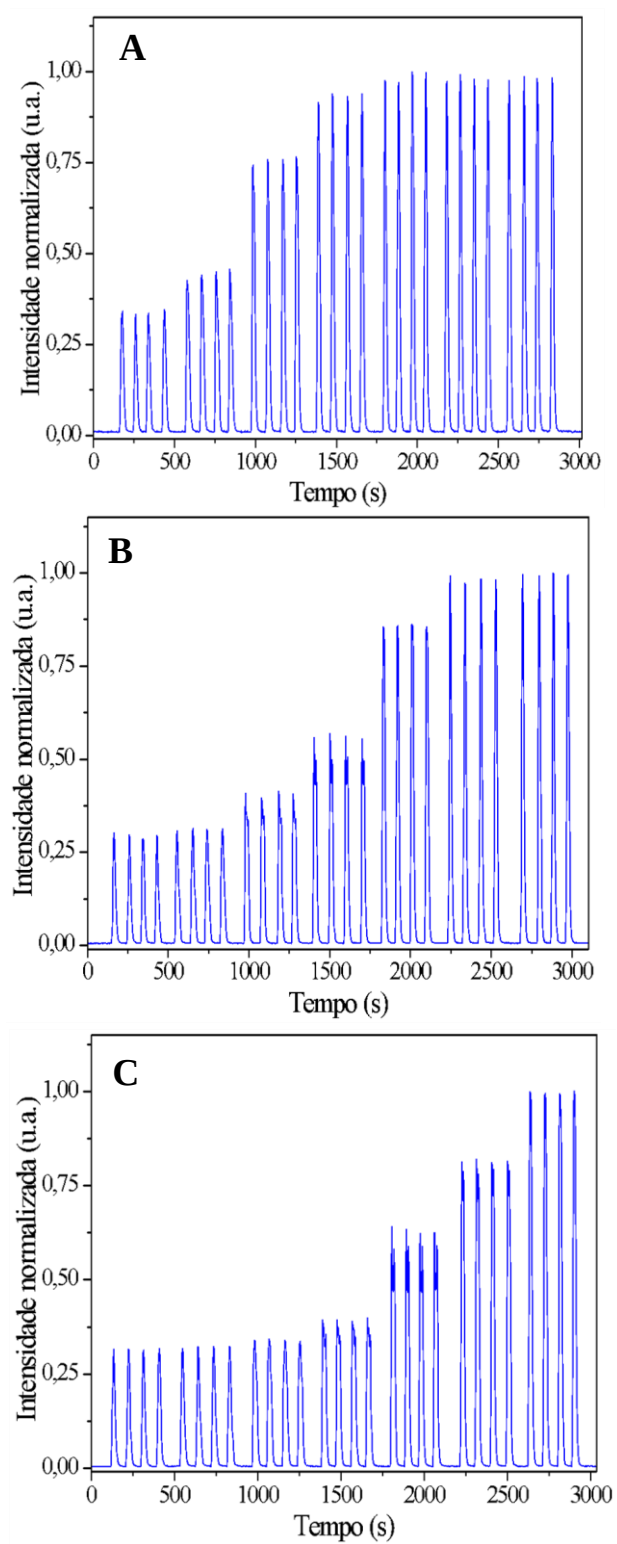


Figura 25: Diagramas mostrando as respostas analíticas da curva analítica para putrescina usando GQDs-TU como sonda fotoluminescente com concentrações crescentes do analito nas diluições: A) 100; B) 40 e C) 20 vezes

Tabela 9: Parâmetros operacionais otimizados empregados no sistema FIA

Parâmetros	Condições
Solução carreadora	PUT
Solução injetora	GQDs-TU
Diluição GQDs-TU	5:200
Faixa de trabalho	5 até 50 mg L ⁻¹
Tempo entre injeções	35 s
Volume de amostra	325 µL
Banda espectral passante	2 nm
Quociente de vazão	40%

4.8.2 Parâmetros analíticos de mérito no FIA.

Após os parâmetros serem ajustados, conforme as condições apresentadas na Tabela 9, foi estabelecida a curva analítica resultando no fiograma e na curva analítica normalizada mostrados na Figura 26A e 26B respectivamente. Em termos de linearidade, o FIA apresenta valores mais ajustados ao modelo, em comparação a batelada, explicando de modo simplificado a tendência dos dados em função da concentração do analito ao longo da faixa de concentração testada, visto que o gráfico de resíduos, Figura 26C, não apresenta viés nos erros e o coeficiente de determinação (R^2) encontrado foi de 0,9980. A equação da curva entrado foi $y = (444,1 \pm 12,2) C_{putrescina} + (-1682,2 \pm 426,6)$

Tabela 10: Parâmetros de mérito para a sonda GQDs-TU no FIA

Parâmetros	Condições
R^2	0,9980
LOD	3,0 mg L ⁻¹
LOQ	9,9 mg L ⁻¹
Equação da Curva	$y = (444,1 \pm 12,2) C_{putrescina} + (-1682,2 \pm 426,6)$

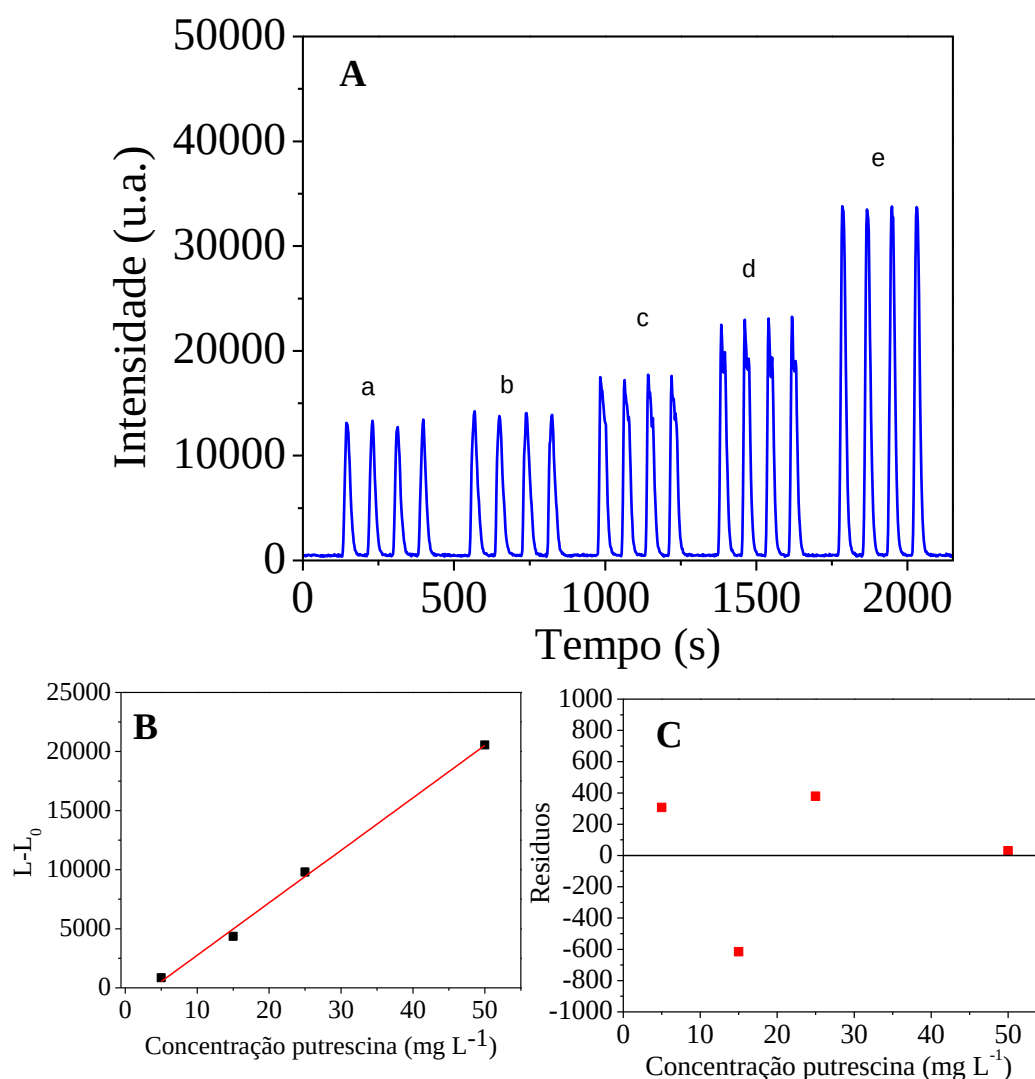


Figura 26: A) Diagrama mostrando as respostas analíticas da curva analítica para PUT usando GQDs-TU como sonda fotoluminescente com concentrações de soluções padrão de PUT em a) 0; b) 5; c) 15; e) 25; e) 50 mg L^{-1} ; (B) Curva analítica normalizada para a fotoluminescência de GQDs-TU na presença de PUT usando FIA: $y = (444,1 \pm 12,2) C_{\text{putrescina}} + (-1682,2 \pm 426,6)$ ($R^2 = 0,9980$); C) Gráfico com a distribuição de resíduos

Os valores de LOD e LOQ foram calculados com base respectivamente em $3s_b/m$ e $10s_b/m$ com s_b com base em dez medições em branco. LOD e LOQ juntamente com os parâmetros de mérito da curva analítica são apresentados na Tabela 10.

5

Conclusão

Este trabalho teve por finalidade a obtenção de pontos quânticos de grafeno, sintetizados pelo método fusão seguido de hidroesfoliação tendo como precursor o ácido cítrico e ainda misturado com outros compostos contendo heteroátomos (N e/ou S) para a obtenção de nanoestrutura funcionalizada. Para tal estudo, foi proposto o uso dos GQDs como sonda fotoluminescente para a detecção e quantificação de putrescina.

No primeiro momento foi realizada uma análise da espectroscopia de fluorescência com as diferentes dispersões de GQDs e observou-se que apenas a dispersão produzida com a tiouréia sendo um modificador químico apresentou resposta satisfatória como uma sonda do tipo *turn-on*. Sendo assim, foi estudada as condições de preparo dos GQDs-TU para ajustar os parâmetros experimentais e se obter a melhor resposta analítica. Em seguida, buscou-se compreender o comportamento da sonda para possíveis interferentes, incluindo outras aminas biogênicas, na amostra de interesse, que nesse caso é a cerveja devido a putrescina nessa bebida ter origem tanto da matéria-prima quanto da ação bacteriana.

A interação da sonda GQDs-TU com putrescina se mostrou dependente do pH e da temperatura, indicando que grupos químicos presentes na superfície e nas bordas do nanomaterial comprometem a recombinação de elétrons entre a banda de condução e a banda de valência. Além disso, por mais que a sonda tenha se mostrado estável sua capacidade para detectar putrescina foi decaindo ao longo dos dias, ou seja, o tempo de síntese também se mostrou um fator primordial para execução do estudo.

Por fim, para minimizar os problemas de estabilidade, a técnica foi adaptada para análise de injeção em fluxo (FIA) automatizando o método para se obter mais controle termos de reprodutibilidade da interação com o analito, dispersão da zona amostral do tempo de medição injeção após a injeção do analito no sistema até a passagem pelo sistema de detecção e resolução em resposta durante um ensaio.

Apesar do FIA apresentar limitações, como menor faixa de trabalho, o método apresentou dados mais ajustados ao modelo linear em comparação com a batelada.

Os pontos quânticos de grafeno são nanomateriais promissores para detecção e quantificação de amins biogênicas. A sonda GQDs-TU, que apresentou bons resultados na fotoluminescência, foi sintetizada por uma via prática, rápida e fácil de sintetizar. Os resultados obtidos ainda carecem de uma aplicação na amostra real contendo putrescina, porém, vale ressaltar que o uso de GQDs para amins biogênicas ainda é pouco explorado na literatura este trabalho apresentou o comportamento de uma sonda GQDS-TU do tipo *turn-on* tanto para batelada como para a FIA.

Apesar da cerveja não apresentar uma matriz tão complexa em comparação com outros produtos alimentícios, como por exemplo peixe, a separação e quantificação de PUT precisa ser aprimorado visto que se encontra em baixa concentração e ainda outras amins biogênicas também estão presentes. O método de extração também precisa eliminar possíveis impurezas que possam interagir com a sonda GQDs-TU que se mostrou sensível para alguns elementos, como os íons inorgânicos.

6

Trabalhos futuros

Pontos importantes podem ser apontados para complementar este trabalho. Existe a pretensão de aplicar o material preparado em amostras de cerveja artesanal adquiridas do comércio local, após um estudo de eliminação de interferentes usando extração em fase sólida. A complexidade da separação e quantificação dessas aminas se revelou desafiadora, devido à sua natureza polar, à baixa concentração, matrizes complexas e à ausência de marcadores distintivos em relação a outras aminas biogênicas comumente encontradas em alimentos. Além desses desafios, a interação da sonda GQDs-TU com coextrativos e compostos interferentes adicionou uma camada de complexidade adicional ao processo analítico, dificultando ainda mais a obtenção de resultados confiáveis. Assim, a busca por um método de extração eficaz e preciso para a detecção de PUT em amostras como cervejas permanece como uma área de pesquisa crucial, exigindo abordagens inovadoras e estratégias analíticas mais refinadas. A validação de quantificação da abordagem proposta se espera ser realizada usando a técnica tradicional de HPLC para comparação.

Em termos da produção de nanomateriais, um estudo sistemático sobre a preparação dos GQDs-TU variando parâmetros de síntese como temperatura de fusão, ponto final de queima do material, solvente de hidroesfoliação, tempo de agitação, dentre outros. Também pode-se explorar outras funcionalizações com modificadores químicos para desenvolver sondas que sejam sensíveis e seletivas para outras aminas biogênicas. A partir disso, poderão ser realizadas mais análises de caracterização para compreender os efeitos da variação dos parâmetros de síntese e das diferentes funcionalizações produzidas nas dispersões ao usar diferentes substâncias químicas como materiais de partida.

ADIL, L. R. et al. Chapter 7 - Nanomaterials for sensors: Synthesis and applications. In: DAVE, S.; DAS, J.; GHOSH, S. (Eds.). **Advanced Nanomaterials for Point of Care Diagnosis and Therapy**. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 121–168.

AHANGARI, H. et al. Latest trends for biogenic amines detection in foods: Enzymatic biosensors and nanozymes applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 112, p. 75–87, jun. 2021.

AKBARI-ADERGANI, B. et al. A Competitive Histamine Evaluation of Canned Tuna Fish Samples by Electrochemical and Immunochemical Methods for Post Market Surveillance. **International Journal of Food Properties**, v. 15, n. 6, p. 1336–1344, nov. 2012.

AKBARI-ADERGANI, B. et al. Ultrasensitive flow-injection electrochemical method for determination of histamine in tuna fish samples. **Food Research International**, v. 43, n. 4, p. 1116–1122, 1 maio 2010.

ANH, N. T. N.; CHOWDHURY, A. D.; DOONG, R. Highly sensitive and selective detection of mercury ions using N, S-codoped graphene quantum dots and its paper strip based sensing application in wastewater. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 252, p. 1169–1178, nov. 2017.

APETREI, I. M.; APETREI, C. The biocomposite screen-printed biosensor based on immobilization of tyrosinase onto the carboxyl functionalised carbon nanotube for assaying tyramine in fish products. **Journal of Food Engineering**, v. 149, p. 1–8, mar. 2015.

- ARMAREGO, W. L. F. Chapter 5 - Nanomaterials. In: **Purification of Laboratory Chemicals Part 2 Inorganic Chemicals, Catalysts, Biochemicals, Physiologically Active Chemicals, Nanomaterials**. [s.l.] Butterworth-Heinemann, 2022. p. 586–630.
- ARRUDA, M. A. Z.; COLLINS, C. H. Informações essenciais para a caracterização de um sistema de análise em fluxo. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 739–742, ago. 2005.
- BACHRACH, U. The early history of polyamine research. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 7, p. 490–495, 1 jul. 2010.
- BARROSO, M. M. Quantum Dots in Cell Biology. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 59, n. 3, p. 237–251, mar. 2011.
- BÓKA, B. et al. Putrescine biosensor based on putrescine oxidase from *Kocuria rosea*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 5, p. 258–262, out. 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria nº185, de 13 de maio de 1997 da Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952 e Considerando a Resolução Mercosul GMC nº 40/94, que aprovou o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado). Diário Oficial da União 1997; 19 maio.
- BRASIL. Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Brasília, 2017.

BUI THE HUY et al. Recent advances in turn off-on fluorescence sensing strategies for sensitive biochemical analysis - A mechanistic approach. **Microchemical Journal**, v. 179, p. 107511–107511, 1 ago. 2022.

CERVELLI, M. et al. Spermine oxidase: ten years after. **Amino Acids**, v. 42, n. 2-3, p. 441–450, 2 ago. 2011.

CHEN, P. et al. A novel chemiluminescence enhanced method for determination of putrescine in shrimp based on the luminol-[Ag(HIO₆)₂]⁵⁻ reaction. **Analytical Methods**, v. 8, n. 5, p. 1151–1156, 28 jan. 2016.

COSTA, B. E. S. et al. Application of Flow-Injection Spectrophotometry to Pharmaceutical and Biomedical Analyses. **Spectroscopic Analyses - Developments and Applications**, 6 dez. 2017.

DALKIRAN, B. et al. Disposable biosensors based on platinum nanoparticle-modified screen-printed carbon electrodes for the determination of biogenic amines. **Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly**, v. 151, n. 12, p. 1773–1783, 9 nov. 2020.

DEL CAMPO, G. et al. Fluorimetric determination of histamine in wine and cider by using an anion-exchange column-FIA system and factorial design study. **Talanta**, v. 68, n. 4, p. 1126–1134, 15 fev. 2006.

DEL RIO, B. et al. The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 15 jan. 2019.

DANCHUK, A. I. et al. Optical sensors for determination of biogenic amines in food. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, n. 17, p. 4023–4036, 8 maio 2020.

ERDAG, D. et al. Biochemical and Pharmacological Properties of Biogenic Amines. **Biogenic Amines**, 7 nov. 2018.

EFSA. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. **EFSA Journal**, v. 9, n. 10, p. 2393, out. 2011.

FRANCO, C. R. et al. Determination of thiomersal and mercurial residues by photo-degradation and flow injection analysis with luminescence probing using carbon quantum dots prepared from thiourea. **Talanta Open**, v. 7, p. 100184–100184, 1 ago. 2023.

GAMA, E. M. et al. A simple method for the multi-elemental analysis of beer using total reflection X-ray fluorescence. **Talanta**, v. 174, p. 274–278, 1 nov. 2017.

GETO, A.; TESSEMA, M.; ADMASSIE, S. Determination of histamine in fish muscle at multi-walled carbon nanotubes coated conducting polymer modified glassy carbon electrode. **Synthetic Metals**, v. 191, p. 135–140, maio 2014.

GHAZALI, S. A. I. S. M. et al. Graphene quantum dots: A comprehensive overview. **Open Chemistry**, v. 21, n. 1, 1 jan. 2023.

GHOUS, T. Flow injection analysis (FIA). **Journal of The Chemical Society of Pakistan**, v. 21, n. 4, p. 375–381, 9 jul. 1999

GUMPU, M.B. et al. Determination of Putrescine in Tiger Prawn Using an Amperometric Biosensor Based on Immobilization of Diamine Oxidase onto Ceria Nanospheres. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 4, p. 717–724, 16 jan. 2016.

GUO, Y. et al. A High-Luminescence Biomimetic Nanosensor Based on N, S-GQDs-Embedded Zinc-Based Metal–Organic Framework@Molecularly Imprinted Polymer for Sensitive Detection of Octopamine in Fermented Foods. **Foods**, v. 11, n. 9, p. 1348, 6 maio 2022.

HERTEL, C. **Estudo da influência das condições de preparação de pontos quânticos de grafeno nas suas propriedades ópticas e no seu desempenho como sonda desliga/liga (off/on) mediada por Fe^{3+}** . Rio de Janeiro, f. 90, 2021.. 90 p Dissertação (Química) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019

HERNÁNDEZ-CASSOU, S.; SAURINA, J. Determination of Histamine in Wine Samples by Flow-Injection Analysis and Multivariate Calibration. **Analytical Letters**, v. 46, n. 11, p. 1758–1768, 24 jul. 2013.

HUANG, C. et al. Visual and photometric determination of histamine using unmodified gold nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 184, n. 7, p. 2249–2254, 22 abr. 2017.

HUSSAIN, A. et al. High-affinity olfactory receptor for the death-associated odor cadaverine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 48, p. 19579–19584, 11 nov. 2013.

JLASSI, K. et al. Facile preparation of N-S co-doped graphene quantum dots (GQDs) from graphite waste for efficient humidity sensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 328, p. 129058–129058, 1 fev. 2021.

KALAC, P.; KRÍZEK, M. A Review of Biogenic Amines and Polyamines in Beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 109, n. 2, p. 123–128, 2003.

KIM, H. et al. Au@ZIF-8 SERS paper for food spoilage detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 179, p. 113063, maio 2021.

KONG, F. et al. A novel fluorescent probe of alkyne compounds for putrescine detection based on click reaction. **RSC Advances**, v. 12, n. 41, p. 26630–26638, 16 set. 2022.

KORKUT, S. et al. Carbon-based quantum dots in fabrication and modification of membranes: A review. **Separation and Purification Technology**, v. 326, p. 124876, 1 dez. 2023.

LAPENNA, A. et al. “Naked” gold nanoparticles as colorimetric reporters for biogenic amine detection. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 600, p. 124903, 5 set. 2020.

LAW, S. R. From the stench of death to an antidote for plant aluminium toxicity. **Physiologia Plantarum**, v. 167, n. 4, p. 469–470, 24 nov. 2019.

LI, Y.-F. et al. Colorimetric detection of putrescine and cadaverine in aquatic products based on the mimic enzyme of (Fe,Co) codoped carbon dots. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 15, n. 2, p. 1747–1753, 3 jan. 2021.

LIU, J.-J. et al. Glutathione-functionalized graphene quantum dots as selective fluorescent probes for phosphate-containing metabolites. **Nanoscale**, v. 5, n. 5, p. 1810, 2013.

LIU, Z. et al. Size Effect of Graphene Quantum Dots on Photoluminescence. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 3922, 26 jun. 2021.

LORENCOVÁ, E. et al. Biogenic amines occurrence in beers produced in Czech microbreweries. **Food Control**, v. 117, p. 107335, nov. 2020.

MACLAURIN, P. *et al.* Flow injection analysis. **Springer eBooks**, p. 159–182, 1 jan. 1995.

MELHUISE, W. H. Quantum efficiencies of fluorescence of organic substances: effect of solvent and concentration of the fluorescent solute. **J. Phys. Chem.**, v. 65, n. 2, p. 229–235, Feb 1961.

MAHNASHI, M. H. et al. Enhanced molecular imprinted electrochemical sensing of histamine based on signal reporting nanohybrid. **Microchemical Journal**, v. 168, p. 106439, set. 2021.

MIR-CERDÀ, A. et al. Bioactive Amines in Wines. The Assessment of Quality Descriptors by Flow Injection Analysis with Tandem Mass Spectrometry. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 8690–8690, 8 dez. 2022.

MURRAY-STEWART, T.; CASERO, R. A. Regulation of Polyamine Metabolism by Curcumin for Cancer Prevention and Therapy. **Medical Sciences**, v. 5, n. 4, p. 38, 18 dez. 2017.

MURRAY-STEWART, T. et al. Curcumin mediates polyamine metabolism and sensitizes gastrointestinal cancer cells to antitumor polyamine-targeted therapies. **PloS one**, 2018.

NEMATİ, F. et al. Sensitive recognition of ethion in food samples using turn-on fluorescence N and S co-doped graphene quantum dots. **Analytical Methods**, v. 10, n. 15, p. 1760–1766, 2018.

NGAFWAN, N. et al. Study on novel fluorescent carbon nanomaterials in food analysis. **Food Science and Technology**, v. 42, 6 ago. 2021.

NILE, S. H. et al. Nanotechnologies in Food Science: Applications, Recent Trends, and Future Perspectives. **Nano-Micro Letters**, v. 12, n. 1, jan. 2020.

OVALLE-MARMOLEJO, X. Y. et al. Effect of stress factors on the production of biogenic amines by lactic acid bacteria isolated from fermented Mexican foods (cheese and beer). **Food Control**, v. 146, p. 109553, 1 abr. 2023.

ÖZOGUL, Y.; ÖZOGUL, F. Chapter 1: Biogenic Amines Formation, Toxicity, Regulations in Food. In: SAAD, B.; TOFALO, R. **Biogenic Amines in Food: Analysis, Occurrence and Toxicity**. 1 ed. Londres: Royal Society of Chemistry, 2019.. 330 p. cap. 1, p. 1-17.

PAPAGEORGIOU, M. et al. Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 98, p. 128–142, jan. 2018.

PEDROZO-PENAFIEL, M. J. et al. Indirect voltammetric determination of thiomersal in influenza vaccine using photo-degradation and graphene quantum dots modified glassy carbon electrode. **Talanta**, v. 215, p. 120938–120938, 1 ago. 2020.

PIRES, L. N. et al. Assessing the internal standardization of the direct multi-element determination in beer samples through microwave-induced plasma optical emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 1090, p. 31–38, 1 dez. 2019.

POHL, P. Determination and fractionation of metals in beer: A review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 25, n. 6, p. 693–703, jun. 2008.

PONOMARENKO, L. A. et al. Chaotic Dirac Billiard in Graphene Quantum Dots. **Science**, v. 320, n. 5874, p. 356–358, 18 abr. 2008.

POVEDA, J. M. Biogenic amines and free amino acids in craft beers from the Spanish market: A statistical approach. **Food Control**, v. 96, p. 227–233, fev. 2019.

QU, D. et al. Highly luminescent S, N co-doped graphene quantum dots with broad visible absorption bands for visible light photocatalysts. **Nanoscale**, v. 5, n. 24, p. 12272, 2013.

QU, D. et al. Three Colors Emission from S,N Co-doped Graphene Quantum Dots for Visible Light H₂Production and Bioimaging. v. 3, n. 3, p. 360–367, 1 mar. 2015.

RAJENDRACHARI, S. et al. Assessing the Food Quality Using Carbon Nanomaterial Based Electrodes by Voltammetric Techniques. **Biosensors**, v. 12, n. 12, p. 1173, 15 dez. 2022.

REIS, B. F. Análise Química por Injeção em Fluxo: Vinte Anos de Desenvolvimento. **Quim. Nova**, v. 19, n. 1, p. 51–58. 1996.

RODRÍGUEZ-SAAVEDRA, M. et al. Beer spoilage lactic acid bacteria from craft brewery microbiota: Microbiological quality and food safety. **Food Research International**, v. 138, p. 109762, dez. 2020.

RUIZ-CAPILLAS, C.; HERRERO, A. Impact of Biogenic Amines on Food Quality and Safety. **Foods**, v. 8, n. 2, p. 62, 8 fev. 2019.

RŮŽIČKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analysis. principles, applications and trends. **Analytica Chimica Acta**, v. 114, p. 19–44, fev. 1980.

SABY, C. et al. An Electrochemical Flow Analysis System for Putrescine Using Immobilized Putrescine Oxidase and Horseradish Peroxidase. **Electroanalysis**, v. 16, n. 4, p. 260–267, 1 mar. 2004.

SCHMID, G. **Nanoparticles: from theory to application**. Weinheim: Wiley-Vch, 2004.

SILVA, W. et al. Impedimetric sensor for tyramine based on gold nanoparticle doped-poly(8-anilino-1-naphthalene sulphonic acid) modified gold electrodes. **Talanta**, v. 195, p. 604–612, 1 abr. 2019a.

SILVA, W. et al. Tyrosinase based amperometric biosensor for determination of tyramine in fermented food and beverages with gold nanoparticle doped poly(8-anilino-1-naphthalene sulphonic acid) modified electrode. *Food Chemistry*, v. 282, p. 18–26, 1 jun. 2019b.

- SIKIRU, S. et al. Advance and prospect of carbon quantum dots synthesis for energy conversion and storage application: A comprehensive review. **Journal of Energy Storage**, v. 60, p. 106556, abr. 2023.
- SINGH, S. et al. Quantum Dots: An Emerging Tool for Point-of-Care Testing. **Micromachines**, v. 11, n. 12, p. 1058, 29 nov. 2020.
- SIRIPONGPREDA, T. et al. Colorimetric sensor and LDI-MS detection of biogenic amines in food spoilage based on porous PLA and graphene oxide. **Food Chemistry**, v. 329, p. 127165, nov. 2020.
- SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v. 29, n. 7, p. 675–690, out. 1996.
- SONALI J, M. I. et al. New analytical strategies amplified with carbon-based nanomaterial for sensing food pollutants. **Chemosphere**, v. 295, p. 133847, maio 2022.
- STOJANOVIĆ, Z.S. et al. SWCNT-modified carbon paste electrode as an electrochemical sensor for histamine determination in alcoholic beverages. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 10, p. 2701–2710, 1 mar. 2016.
- TELSNIG, D. et al. Characterization of an Amperometric Biosensor for the Determination of Biogenic Amines in Flow Injection Analysis. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, n. 11, p. 10476–10486, nov. 2012.
- TIAN, P. et.al. Graphene quantum dots from chemistry to applications. **Materials Today Chemistry**, v. 10, p. 221–258, 1 dez. 2018.

TOLOZA, C. A.T. et al. Photoluminescence suppression effect caused by histamine on amino-functionalized graphene quantum dots with the mediation of Fe^{3+} , Cu^{2+} , Eu^{3+} : Application in the analysis of spoiled tuna fish. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 448–459, 1 jul. 2017.

VASCONCELOS, H. et al. Detection of biogenic amines in several foods with different sample treatments: An overview. **Trends in Food Science & Technology**, v. 113, p. 86–96, 1 jul. 2021.

VISCIANO, P.; SCHIRONE, M. Update on Biogenic Amines in Fermented and Non-Fermented Beverages. **Foods**, v. 11, n. 3, p. 353, 26 jan. 2022.

ZAGATTO, E. A. G. et al. Information Essential For Characterizing A Flow-Based Analytical System (Iupac Technical Report). **Pure Appl. Chem.**, v. 74, n. 4, p. 585–592. 2002.

ZDROJEWICZ, Z.; LACHOWSKI, M. The importance of putrescine in the human body. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, v. 68, p. 393–403, 10 abr. 2014.

ZHAO, Y. et al. A Versatile, Ultralight, Nitrogen-Doped Graphene Framework. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 45, p. 11371–11375, 12 out. 2012.

ZHU, Y. et al. Purification of nitrogen-doped graphene quantum dots and its application in polymer solar cells. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 648, p. 129401, set. 2022.