



ISEL

**INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**NANOPONTOS DE CARBONO A PARTIR DE RESÍDUOS
INDUSTRIAIS DO PROCESSAMENTO DO AZEITE
PRODUÇÃO E APLICAÇÕES**

DIOGO ALEXANDRE CARTAXO SOUSA

(Licenciado em Engenharia Química e Biológica)

**Trabalho final de Mestrado para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia
Química e Biológica**

Orientadores:

Professor Doutor José Virgílio Prata

Professora Doutora Alexandra Isabel Costa

Júri:

Presidente: Professora Doutora Rita Isabel Pacheco

Vogais: Professora Doutora Alexandra Isabel Costa

Doutora Liliana Marques Martelo

Lisboa

Outubro de 2018

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA

Área Departamental de Engenharia Química

NANOPONTOS DE CARBONO A PARTIR DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS DO PROCESSAMENTO DO AZEITE PRODUÇÃO E APLICAÇÕES

DIOGO ALEXANDRE CARTAXO SOUSA

(Licenciado em Engenharia Química e Biológica)

**Trabalho final de Mestrado para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia
Química e Biológica**

Orientadores:

Professor Doutor José Virgílio Prata

Professora Doutora Alexandra Isabel Costa

Júri:

Presidente: Professora Doutora Rita Isabel Pacheco

Vogais: Professora Doutora Alexandra Isabel Costa

Doutora Liliana Marques Martelo

Lisboa

Outubro de 2018

Agradecimentos

Ao Professor Doutor José Virgílio Prata, orientador deste trabalho, expresso o meu profundo agradecimento por todo o conhecimento transmitido, não só neste trabalho, mas em todas as unidades curriculares em que tive a oportunidade de ser aluno. Agradeço todo o apoio, dedicação e inesgotável disponibilidade que sempre dispensou durante a realização deste trabalho. Agradeço também a oportunidade que o Professor me deu em poder desenvolver esta dissertação e respetivo trabalho de investigação, não só pelo documento em si, mas por tudo aquilo que aprendi.

À Professora Doutora Alexandra Costa, co-orientadora deste trabalho, expresso todo o meu agradecimento pela disponibilidade constante, conhecimentos transmitidos, dedicação e apoio constante, que tornou possível a realização deste trabalho. Agradecer também todo o conhecimento transmitido na unidade curricular de Química Orgânica I, essencial para a realização desta dissertação.

À Professora Doutora Patrícia Barata expresso o meu agradecimento por toda a ajuda dada tanto no trabalho de laboratório como na elaboração do documento final. Agradecer todo o conhecimento transmitido, disponibilidade e apoio dado.

Aos meus colegas de laboratório, Carina Fialho, Jéssica Cruz, Diogo Alves e Manuel Verganista, agradeço toda a amizade, ajuda, apoio e excelente ambiente de trabalho, essenciais para a realização deste trabalho final de mestrado.

Ao Professor Doutor Mário Berberan Santos e Doutora Liliana Martelo, agradeço toda a ajuda, disponibilidade e dedicação dada na realização dos tempos de vida de luminescência no CQFM do IST.

Agradece-se à Professora Doutora Cecília Calado (ISEL) a disponibilidade para a utilização do microscópio Zeiss Axiovert 40 CFL.

Agradece-se à Professora Doutora Paula Cantinho por todo o conhecimento transmitido, apoio e inesgotável disponibilidade dada nos ensaios de determinação de CQO e CBO.

Às empresas que disponibilizaram as águas residuais utilizadas como matéria-prima (não designadas por opção das mesmas).

Ao Instituto Politécnico de Lisboa pelo financiamento concedido através dos projetos IPL/2016/NANOLIVE/ISEL (Olive Mill Wastewater as a Source for Carbon

Nanomaterials: Production and use as Biosensors) e IPL/2017/NANOCHIRAL/ISEL (Chiral Carbon Nanodots from Industry Wastewaters).

À minha Mãe, todo o apoio, carinho, motivação e ajuda. Por ter sempre acreditado em mim, por todo o orgulho e dedicação. Por tudo aquilo que fizeste por mim.

À minha Avó um agradecimento especial por todo o apoio, carinho e ajuda. Todas as palavras serão poucas para expressar todo o agradecimento que tenho por tudo aquilo que fizeste por mim. Ao meu avô pelo carinho e apoio dado.

Um muito obrigado a todos aqueles, que direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

Aos meus colegas de curso e amigos, Ana Lopes, Joana Martinho, Ricardo Ferreira e Luís Almeida, por todo o apoio, toda a ajuda e amizade demonstrada ao longo destes anos.

Aos meus amigos, Tiago Vaz, Gustavo Duarte, Ricardo Oliveira, Paulo Sanches e Rui Monteiro, por toda a amizade, apoio e motivação ao longo destes anos.

Resumo

Na presente dissertação são apresentados métodos de síntese para a obtenção de nanopontos de carbono (NPsC) luminescentes sustentáveis, utilizando como fonte de carbono águas residuais do processamento industrial do azeite (ARPIA) e demonstrada a sua aplicação direta como sensores de proteínas hémicas, e.g. hemoglobina (Hb).

Os NPsC foram sintetizados utilizando ARPIA provenientes de processos de extração contínuos (centrifugação, 2 fases (AR-2F) (ano 2016 (AR-2F-16) e ano 2017 (AR-2F-17)) e descontínuo (prensagem). A caracterização físico-química das ARPIA, assim como os diferentes métodos de síntese utilizados na obtenção dos NPsC são apresentados e discutidos ao longo deste trabalho.

Os NPsC sintetizados foram analisados e caracterizados estruturalmente por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os NPsC sintetizados a partir de AR-2F foram também caracterizados por ressonância magnética nuclear de próton e carbono (RMN ^1H e ^{13}C), análise elementar (AE) e microscopia eletrónica de transmissão (TEM). Técnicas de absorção no estado fundamental (UV-Vis) e luminescência de estado estacionário foram aplicadas para o estudo das propriedades fotofísicas dos NPsC. A determinação do tempo de vida de luminescência dos NPsC obtidos a partir das AR-2F-17 foi igualmente efetuado.

A deteção de proteínas hémicas pelos NPsC provenientes das ARPIA foi comprovada. Os nanomateriais obtidos das AR-2F revelaram elevada sensibilidade e seletividade no reconhecimento de hemoglobina (Hb) em solução.

Palavras-chave: Nanopontos de carbono (NPsC) luminescentes, águas residuais do processamento industrial do azeite (ARPIA), conversão termoquímica, fluorescência, hemoglobina (Hb), recuperação de resíduos.

Abstract

In the present work, synthetic methods to produce new fluorescent and sustainable carbon dots (CDs), using as carbon source olive mill waste waters (OMWWs), will be discussed, demonstrating their direct applicability as hemic protein sensors, *e.g.* haemoglobin (Hb).

Different CDs were developed based on OMWWs of different origins, such as seasonal, *i.e.* OMWWs from the same process but differing in the harvest year (OMWW-2Ph-16 vs OMWW-2Ph-17) and processing methods (OMWW-2Ph-16/17 vs OMWWP). The main differences between these three types of OMWWs and the synthetic methods developed for each one of them are presented and discussed throughout.

The CDs were analysed and structurally characterised by Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR). The CDs that were synthesised by the OMWW-2Ph were additionally characterized by nuclear magnetic resonance of proton and carbon (^1H and ^{13}C NMR), elemental analysis (AE) and transmission electron microscopy (TEM). Absorption techniques at ground state and steady state luminescence were used for the study of photophysical properties. Luminescence lifetimes were studied using CDs from OMWW-2Ph-17.

As a demonstration of the CDs applicability, it will be shown in this dissertation that these new CDs could be used as hemic proteins sensors. The study revealed a high sensibility and selectivity of the CDs towards haemoglobin.

Key-words: Carbon dots (CDs), Olive mil waste water (OMWWs), fluorescence, haemoglobin (Hb), thermal conversion, waste recovery.

Divulgação Científica

No âmbito desta dissertação resultaram as seguintes publicações:

Comunicações em Conferências (Comunicações orais e em painel)

- Prata, J. V., Alexandre, M. R., Costa, A. I., Sousa, D. A., “Highly Fluorescent Carbon Nanodots from Olive Mill Wastewater”, International Conference on Diamond and Carbon Materials, Gothenburg, Sweden, 2017;
- Sousa, D.A, Costa, A.I., Alexandre, M.R., Prata, J.V., “How an Environmental Issue Could Turn Into Useful High-valued Products: The Olive Mill Wastewater Case”, 18th European Meeting on Environmental Chemistry (EMEC), 26-29 Novembro 2017, Porto, Portugal.;
- Sousa, D.A, Costa, A.I., Alexandre, M.R., Prata, J.V., “Influence of Extraction Process on the Luminescent Properties of Carbon Nanomaterials derived from Olive Mill Wastewaters“, 18th European Meeting on Environmental Chemistry (EMEC), 26-29 Novembro 2017, Porto, Portugal;
- Sousa, D.A, Costa, A.I., Alexandre, M.R., Prata, J.V., “Bright Nanoparticles for an Even Brighter Future: efficient production of luminescent carbon nanodots from olive mill wastewater“, XXV Encontro da Sociedade Portuguesa de Química, 16-19 Julho 2017, Lisboa, Portugal;
- Sousa, D.A, Costa, A.I., Alexandre, M.R., Prata, J.V., “Carbon Nanodots from Olive Mill Wastewater: A Sustainable Route”, I Reunião do Grupo de Carbono, 12-13 Junho 2017, Porto, Portugal;
- Sousa, D.A, Costa, A.I., Alexandre, M.R., Prata, J.V., “Detecção e Quantificação de Hemoproteínas com Nanomateriais de Carbono Fluorescentes”, 5º Fórum de Engenharia Química e Biológica (iFEQB’18), 8-10 Maio 2018, Lisboa, Portugal.

Publicações em Revistas Científicas Internacionais:

- Sousa, D. A., Costa, A. I., Alexandre, M. R., Prata, J. V., “How an environmental issue could turn into useful high-valued products: The olive mill wastewater case”, *Science of the Total Environment*, 2019, 647, 1097-1105. Publicado online em 06/08/2018; <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.060>.

Glossário, Abreviaturas e Símbolos

A

AR-2F-16	- Águas residuais do processo de 2 fases (2016)
AR-2F-17	- Águas residuais do processo de 2 fases (2017)
AR-2F	- Águas residuais do processo de 2 fases
AR-P	- Águas residuais do processo de prensa
ARPIA	- Águas residuais do processamento industrial do azeite
Abs	- Absorção
AE	- Análise elementar

B

BSA	- Albumina de soro de bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
BN-CD	- Pontos de Carbono (<i>Carbon dots</i>) co-dopados com boro e azoto

C

Cyt <i>c</i>	- Citocromo <i>c</i>
CDs	- Pontos de Carbono (<i>Carbon dots</i>)
<i>ca.</i>	- Quantidade aproximada
CQO	- Carência química de oxigénio
CBO	- Carência bioquímica de oxigénio
CSTR	- Reator perfeitamente agitado (<i>Continuous stirred-tank reactor</i>)

E

E	- Eficiência de transferência de energia
ED	- Etilenodiamina
<i>e.g.</i>	- <i>exempli gratia</i> (do Latim, por exemplo)
<i>i.e.</i>	- <i>id est</i> (do Latim, isto é)
em	- Emissão
exc	- Excitação
Equiv.	- Equivalente
eV	- Eletrão-Volt

F

F	- Intensidade de fluorescência
f	- Frequência de absorção de intensidade <u>f</u> orte no IV
fr	- Frequência de absorção de intensidade <u>f</u> raca no IV
FTIR	- Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

G

GQD - Pontos quânticos (*Quantum dots*) de grafeno

H

Hb - Hemoglobina humana

I

IPCA - Ácido imidazol[1,2-a]piridina-7-carboxílico (*Imidazo[1,2-a]pyridine-7-carboxylic acid*)

J

J - Integral de sobreposição

K

K - Fator de orientação espacial dos dipolos

K_T - Velocidade de transferência de energia

K_{SV} - Constante de Stern-Volmer

K_D - Constante de Stern-Volmer (mecanismo dinâmico)

K_S - Constante de Stern-Volmer (mecanismo estático)

k_q - Constante de extinção bimolecular

L

Lys - Lisozima

LED - Díodo emissor de luz (*Light emission diode*)

M

m - Frequência de absorção de intensidade média no IV

m.p. - Material de partida

m.r. - Mistura reacional

Mio - Mioglobina

MCF-7 - Linha celular humana do adenocarcinoma da mama (*Michigan Cancer Foundation – 7*)

Max. - Máximo

min. - Minutos

MetHb - Hemoglobina humana de ferro (III) (Metahemoglobina)

N

n - Índice de refração

NMsC - Nanomateriais de carbono luminescentes

NPsC - Nanopontos de carbono

N-CD	- Pontos de Carbono (<i>Carbon dots</i>) dopados com azoto
O	
OxyHb	- Hemoglobina humana de ferro (II) (Oxihemoglobina)
o	- Frequência de absorção de ombro no IV
OMWWs	- <i>Olive mill waste waters</i>
OMWW-2Ph	- <i>Olive mil waste water from continuous centrifugation</i>
OMWW-2Ph-16	- <i>Olive mil waste water from continuous centrifugation (2016)</i>
OMWW-2Ph-17	- <i>Olive mil waste water from continuous centrifugation (2017)</i>
OMWW-P	- <i>Olive mil waste water from discontinuous press</i>
P	
PBD	- <i>Protein Data Bank</i>
PEG	- poli(etilenoglicol)
pl	- Ponto isoelétrico
PPEI-EI	- Poli(propioniletilenoimina-co-etilenoimina)
P	- Prensa descontínua
PQ	- Ponto quântico
PsC	- Pontos de carbono
Q	
QD	- <i>Quantum dot</i>
R	
<i>r</i>	- Distância fixa entre doador e aceitador
R_0	- Distância de Förster
RA	- <i>Right angle</i> (geometria de 90° relativamente à excitação)
RET	- Transferência de energia por ressonância (<i>Resonance Energy Transfer</i>)
RMN ^1H	- Ressonância magnética nuclear de Protão
RMN ^{13}C	- Ressonância magnética nuclear de Carbono
T	
t.a.	- Temperatura ambiente
TEM	- Microscopia eletrónica de transmissão (<i>Transmission electron microscopy</i>)
TG	- Termogravimetria
T	- Temperatura

TS - Teor de sólidos

U

u.a. - Unidades arbitrárias

UV - Ultravioleta

UV-Vis - Espectroscopia de ultravioleta e visível

V

vs - *versus*

V - Volume

Símbolos

[Q] - Concentração de analito

[F] - Concentração de fluoróforo

[F₀] - Intensidade inicial de emissão do fluoróforo

[F Q] - Concentração do complexo fluoróforo-analito

λ - Comprimento de onda

ν - Frequência

δ - Desvio químico

ϵ - Absortividade molar

Φ_F - Rendimento quântico de fluorescência

τ_0 - Tempo de vida do fluoróforo

2F - 2 fases

3F - 3 fases

Índice de Ilustrações

Figura I.1 – Ilustração de diferentes tipos de PsC. Adaptado de Song et al.	5
Figura I.2 - Síntese de NPsC utilizando diferentes fontes de carbono via “top-down”. Adaptado de Chen et al.	6
Figura I.3 – Síntese de NPsC por diferentes fontes de carbono via “bottom-up”. Adaptado de Chen et al.	7
Figura I.4 – Síntese de PsC dopados com N (N-CD) e PsC co-dopados com B e N (BN-CD). Imagens de fotografia mostram suspensões de PsC sob luz visível (esquerda) e sob luz UV a 365 nm (direita). Adaptado de Choi et al.	9
Figura I.5 – Oliveiras em Pont du Gard no sul de França.	14
Figura I.6 – Diagrama de blocos para sistemas 2F. Adaptado de Dermeche et al.	16
Figura I.7 – Diagrama de blocos para sistemas 3F. Adaptado de Dermeche et al.	17
Figura I.8 - Diagrama de blocos para sistemas de prensa. Adaptado de Dermeche et al.	18
Figura I.9 - Exemplos representativos de taninos condensados. Três dímeros de procianidina (A , B e C), um dímero de profisetinidina (D) e um trímero de procianidina (E).....	21
Figura I.10 - Exemplos representativos de taninos hidrolisáveis. Derivado de galotanino (A) e derivados de elágitaninos (B , C , D).....	22
Figura I.11 – Derivados de ácidos fenólicos comuns em subprodutos obtidos do processamento do azeite.	23
Figura I.12 – Compostos fenólicos comuns nos subprodutos da produção de azeite. Oleuropeína (A) e verbascósido (B).	23
Figura II.1 - Espectro de FTIR das AR-2F-16 em pastilha KBr.	31
Figura II.2 - Espectro de FTIR das AR-2F-17 em pastilha KBr.	32
Figura II.3 - Espectro de FTIR das AR-P em pastilha KBr.	32
Figura II.4 - Espectros de UV-Vis (linha cinza), emissão (linha preta; $\lambda_{exc}=340$ nm) e excitação (linha azul; monitorizado a 410 nm) de dispersão aquosa de NPsC (0.1 mg/mL), obtidos das AR-2F-16.	43
Figura II.5 - Espectros de emissão de dispersões aquosas de NPsC (0.1 mg/mL) com excitação a diferentes comprimentos de onda (340 a 420 nm), obtidos das AR-2F-16.	44
Figura II.6 - Variação da fotoluminescência ($\lambda_{exc} = 340$ nm; monitorizando o $\lambda_{em} = 407$ nm) de dispersão aquosa de NPsC (0.1 mg/mL) em função do pH, obtidos das AR-2F-16.	45
Figura II.7 – Variação da Intensidade de emissão com o pH.	46

Figura II.8 - Variação da intensidade de fluorescência (monitorizada a 407 nm) de uma dispersão aquosa (0.1 mg/mL; pH=5.63) de NPsC após irradiação contínua ($\lambda_{exc}=340$ nm) usando uma lâmpada de descarga de Xénon pulsado (potência média 7.3 W a 50 Hz).....	46
Figura II.9 - Espectro de FTIR (KBr) NPsC obtidos das AR-2F-16.....	47
Figura II.10 - Espectro de RMN 1H dos NPsC (MeOD).	48
Figura II.11 - Espectro de RMN ^{13}C dos NPsC (MeOD).	49
Figura II.12 - Imagens de TEM (microscopia eletrônica de transmissão) dos NPsC...	49
Figura II.13 - Espectro de UV-Vis de uma dispersão aquosa de NPsC (0.1 mg/mL) obtidos das AR-P.....	51
Figura II.14 - Espectro de emissão (linha laranja; $\lambda_{exc} = 340$ nm) e de excitação (linha azul; monitorizado a 420 nm) de uma dispersão aquosa de NPsC (0.1 mg/mL), obtidos das AR-P.	52
Figura II.15 – Espectro de FTIR (KBr) obtido para NPsC, obtidos das AR-P.	52
Figura II.16 - Espectros de UV-Vis (linha azul), emissão (linha cinzenta; $\lambda_{exc}=360$) e excitação (linha laranja; monitorizado a 450 nm) de uma dispersão aquosa de NPsC (0.1 mg/mL), obtidos das AR-2F-17.	57
Figura II.17 - Espectros de emissão de dispersões aquosas de NPsC (0.1 mg/mL) obtidos das AR-2F-17 com excitação a diferentes comprimentos de onda (340 a 420 nm).....	58
Figura II.18 - Efeito do pH na intensidade de emissão de uma dispersão aquosa de NPsC (0.1 mg/mL), obtidos das AR-2F-17.	59
Figura II.19 - Efeito da quantidade de ED nos NPsC obtidos das AR-2F-17.	60
Figura II.20 - Decaimento dinâmico de fluorescência para uma dispersão aquosa de NPsC (0.1 mg/mL) obtidos das AR-2F-17; ($\lambda_{exc}=340$ nm; $\lambda_{em}= 440$ nm).	61
Figura II.21 - Espectro de FTIR (KBr) dos NPsC obtidos das AR-2F-17.	62
Figura II.22 - Espectro de RMN 1H dos NPsC obtidos das AR-2F-17 após purificados (MeOD) (ver subsecção II.3.5.3).	63
Figura II.23 - Espectro de RMN ^{13}C dos NPsC obtidos das AR-2F-17 após purificados (MeOD) (ver subsecção II.3.5.3).	64
Figura II.24 - Espectros de UV-Vis de dispersões aquosas de NPsC (0.1 mg/mL). NPsC-AR-P-I (linha vermelha), NPsC-AR-P-III (linha azul) e NPsC-AR-2F-16-III (linha verde).	66
Figura II.25 – Espectros de excitação (monitorizados aos respectivos máximos de emissão (linha tracejada) e emissão ($\lambda_{exc}=340$ nm; linha contínua) de dispersões aquosas de NPsC (0.1 mg/mL). NPsC-AR-P-I (linha vermelha), NPsC-AR-P-III (linha azul) e NPsC-AR-2F-16-III (linha verde).	67

Figura II.26 - Espectros de emissão normalizados de dispersões aquosas de NPsC (0.1 mg/mL) de NPsC-AR-2F-16-III e NPsC-AR-2F-17-XII.....	68
Figura II.27 - Espectros parciais de FTIR (1800-1500 cm ⁻¹ ; KBr) dos NPsC obtidos de AR-2F-16 e AR-2F-17.....	69
Figura II.28 - Espectros de UV-Vis de dispersões aquosas dos NPsC (0.1 mg/mL) obtidos de AR-2F-16 e AR-2F-17.....	69
Figura II.29 – Espectro de FTIR (KBr) das cinzas de NPsC-AR-2F-17-XII.....	71
Figura II.30 - Absorvância das frações obtidas da separação por Sephadex G75; (A) eluição por gravidade e (B) eluição flash.....	72
Figura II.31 - Condutividade das frações obtidas da eluição de KCl por Sephadex G75 (eluição por gravidade).....	73
Figura II.32 - Espectros de FTIR (KBr) das frações extratadas.....	74
Figura II.33 - Imagens de microscopia de fluorescência obtidas para os compósitos NPsC/SiO ₂ -I. (A) Irradiação UV a 365 nm; (B) Irradiação de luz visível.....	77
Figura II.34 - TG dos NPsC-AR-2F-17-XII-I. Temperatura (linha laranja), perda de massa (linha cinzenta).....	77
Figura II.35 - TG dos NPsC-AR-2F-17-XII-I. Temperatura (linha azul), perda de massa (linha cinzenta).....	78
Figura II.36 - Estruturas tridimensionais do (A) Citocromo c (PDB id: 1HRC), da (B) Mioglobina (PDB id: 1YMB) do coração de cavalo e da (C) Hemoglobina humana (PDB id: 4HHB).....	80
Figura II.37 - Estrutura tridimensional da Lisozima da clara de ovo (PDB id: 1LYZ). ⁸³	80
Figura II.38 - Espectros de emissão de dispersões aquosas de NPsC (0.01 mg/mL) na presença de quantidades crescentes de MetHb (pH=7.2) ($\lambda_{exc} = 340$ nm). <i>Inset</i> : Curva de Stern-Volmer.....	85
Figura II.39 - Espectros de emissão de dispersões aquosas de NPsC (0.01 mg/mL) na presença de quantidades crescentes de OxyHb (pH=7.2) ($\lambda_{exc} = 340$ nm). <i>Inset</i> : Curva de Stern-Volmer.....	86
Figura II.40 - Espectros de emissão de dispersões aquosas de NPsC (0.01 mg/mL) na presença de quantidades crescentes de MetHb (pH=7.2) ($\lambda_{exc} = 380$ nm). <i>Inset</i> : Curva de Stern-Volmer.....	87
Figura II.41 - Espectros de emissão de dispersões aquosas de NPsC (0.01 mg/mL) na presença de quantidades crescentes de OxyHb (pH=7.2) ($\lambda_{exc} = 380$ nm). <i>Inset</i> : Curva de Stern-Volmer.....	88
Figura II.42 - Espectros de emissão de dispersões aquosas de NPsC (0.01 mg/mL) na presença de quantidades crescentes de Lys (pH=7.2) ($\lambda_{exc} = 340$ nm). <i>Inset</i> : Curva de Stern-Volmer.....	89

Figura II.43 - Espetros de emissão de dispersões aquosas de NPsC (0.01 mg/mL) na presença de quantidades crescentes de Mio (pH=7.2) ($\lambda_{exc} = 340$ nm). <i>Inset</i> : Curva de Stern-Volmer.....	90
Figura II.44 - Espetros de emissão de dispersões aquosas de NPsC (0.01 mg/mL) na presença de quantidades crescentes de Cyt c (pH=7.2) ($\lambda_{exc} = 340$ nm). <i>Inset</i> : Curva de Stern-Volmer.....	90
Figura II.45 - Espetros de emissão de dispersões aquosas de NPsC (0.01 mg/mL) na presença de MetHb (1nM) e quantidades crescentes de Lys (pH=7.2) ($\lambda_{exc} = 380$ nm). <i>Inset</i> : Curva de Stern-Volmer.....	91
Figura II.46 - Espetros de emissão de dispersões aquosas de NPsC (0.01 mg/mL) na presença de quantidades crescentes de MetHb (pH=7.2) ($\lambda_{exc} = 340$ nm). <i>Inset</i> : Curva de Stern-Volmer.....	92
Figura II.47 - Espetros de emissão de dispersões aquosas de NPsC (0.01 mg/mL) na presença de quantidades crescentes de OxyHb (pH=7.2) ($\lambda_{exc} = 340$ nm). <i>Inset</i> : Curva de Stern-Volmer.....	93
Figura II.48 - Decaimento da emissão de NPsC-AR-2F-17-XII-I [0.01 mg/mL] e Hb [2×10^{-6} M] (pH=7.2); ($\lambda_{exc}=340$ nm; $\lambda_{em}=440$ nm).	94
Figura II.49 - Decaimento da emissão de NPsC-AR-2F-17-XII-I [0.01 mg/mL] (pH=7.2); ($\lambda_{exc}=340$ nm; $\lambda_{em}=440$ nm).....	95

Índice de Tabelas

Tabela II.1 - Caracterização por FTIR e análise elementar do resíduo obtido das águas residuais após evaporação e secagem sob vácuo a 105°C.	31
Tabela II.2 - Quantificação de fenóis totais presentes nas ARPIA.	33
Tabela II.3 - Quantificação de flavonóides presente nas ARPIA.	33
Tabela II.4 - Quantificação de Taninos presentes nas ARPIA.	34
Tabela II.5 - Quantificação de açúcares totais nas ARPIA.	35
Tabela II.6 – Quantificação dos lípidos presentes nas ARPIA.	35
Tabela II.7 - Quantificação de proteínas nas ARPIA.	36
Tabela II.8 - Quantificação de Cloretos presentes nas ARPIA.	36
Tabela II.9 – Quantificação dos nitratos presentes nas ARPIA.	37
Tabela II.10 – Quantificação de cinzas presentes nas ARPIA.	37
Tabela II.11 – Percentagem de cinzas em função do TS de águas de diferentes regiões em função do processo de extração.	37
Tabela II.12 – Valores obtidos de CQO, CBO ₅ e biodegradabilidade para as ARPIA.	38
Tabela II.13 – Características Físico-Químicas das ARPIA.	39
Tabela II.14 – Composição Orgânica aproximada das ARPIA.	39
Tabela II.15 - Efeito da Temperatura no Rendimento Quântico e Rendimento Mássico dos NPsC.	41
Tabela II.16 - Efeito do Tempo nas Características dos NPsC obtidos por Tratamento Hidrotérmico das AR-2F-16.	41
Tabela II.17 - Efeito da Natureza do Aditivo nas Características dos NPsC obtidos. ...	42
Tabela II.18 - Efeito da Quantidade de ED nas Características dos NPsC obtidos.	42
Tabela II.19 – Efeito da adição de AR-2F-16 no Rendimento dos NPsC obtidos a partir de AR-P.	50
Tabela II.20 - Efeito da Temperatura no Rendimento Quântico e Rendimento Mássico dos NPsC.	54
Tabela II.21 - Síntese de NPsC a partir de AR-2F-17 sob N ₂ e TS de 2.6 g/L.	55
Tabela II.22 – Influência do Tempo de Reação e Rácio ED/TS no Rendimento Quântico e Rendimento Mássico dos NPsC.	56
Tabela II.23 - Tempos de vida obtidos para uma dispersão aquosa de NPsC (0.1 mg/mL) obtidos de AR-2F-17.	60
Tabela II.24 - Quantificação de Cinzas dos NPsC sintetizados.	70
Tabela II.25 - Tipos de transferência de energia nas propriedades de fluorescência do doador em que o aceitador é quimicamente diferente.	82

Tabela II.26 - Tipos de transferência de energia nas propriedades de fluorescência do doador no caso de homotransferência.....	83
Tabela II.27 - Tempos de vida de dispersões aquosas de NPsC (NPsC-AR-2F-17-XII-I) (0.01 mg/mL) (pH=7.2) na presença de quantidades crescentes de MetHb (0 - 2×10^{-6} M).....	94

ÍNDICE

Agradecimentos.....	i
Resumo	iii
Abstract.....	v
Divulgação Científica.....	vii
Glossário, Abreviaturas e Símbolos.....	ix
Índice de Ilustrações	xiii
Índice de Tabelas.....	xvii
I – INTRODUÇÃO	1
I.1 – PREÂMBULO	3
I.2 – NANOMATERIAIS DE CARBONO	4
I.2.1 – Métodos de síntese	5
I.2.1.1 – Método “ <i>Top-down</i> ”	6
I.2.1.2 – Método “ <i>Bottom-up</i> ”	7
I.2.1.3 – Funcionalização da superfície e dopagem.....	8
I.2.2 – Propriedades Fotofísicas	10
I.3 – Principais Aplicações.....	12
I.3.1 – Sensores Químicos	12
I.3.2 – Fotocatálise	13
I.3.3 – Bioimagiologia	13
I.3.4 – Optoelectrónica	14
I.4 – INDÚSTRIA DE PRODUÇÃO DO AZEITE.....	14
I.4.1 – Processos de Extração do Azeite	14
I.4.1.1 – Centrifugação Contínua de Duas Fases	15
I.4.1.2 – Centrifugação Contínua de Três Fases	16
I.4.1.3 – Prensa.....	17
I.4.2 – Águas Residuais do Processamento Industrial do Azeite	18
I.4.2.1 – Caracterização e Composição Química.....	19
I.4.2.2 – Problemas Ambientais. Métodos de Tratamento e Valorização ...	23
II – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
II.1 – PREÂMBULO	29
II.2 – CARACTERIZAÇÃO DAS ÁGUAS RESIDUAIS DO PROCESSAMENTO INDUSTRIAL DO AZEITE.....	30
II.2.1 – Caracterização estrutural.....	30
II.2.2 – Quantificação de Compostos Fenólicos.....	32

II.2.2.1	– Quantificação de Fenóis Totais.....	33
II.2.2.2	– Quantificação de Flavonóides.....	33
II.2.2.3	– Quantificação de Taninos	34
II.2.3	– Quantificação de Açúcares	34
II.2.4	– Quantificação de Lípidos	35
II.2.5	– Quantificação de Proteínas.....	36
II.2.6	– Quantificação de Cloretos.....	36
II.2.7	– Quantificação de Nitratos.....	36
II.2.8	– Quantificação de Cinzas	37
II.2.9	– CQO e CBO ₅	38
II.2.10	– Composição sumativa das águas	38
II.3	– SÍNTESE DE NANOPONTOS DE CARBONO (NP_sC) A PARTIR DE	
ARPIA.....	40
II.3.1	– NP _s C obtidos a partir de AR-2F-16	40
II.3.1.1	– Síntese	40
II.3.1.2	– Propriedades Fotofísicas dos NP _s C	42
II.3.1.3	– Caracterização Estrutural	47
II.3.1.4	– Caracterização Morfológica	49
II.3.2	– NP _s C obtidos a partir de AR-P	50
II.3.2.1	– Síntese	50
II.3.2.2	– Propriedades Fotofísicas e Caracterização Estrutural	51
II.3.3	– NP _s C obtidos a partir de AR-2F-17	53
II.3.3.1	– Síntese	53
II.3.3.2	– Propriedades Fotofísicas	56
II.3.3.3	– Caracterização Estrutural	61
II.3.3.4	– Caracterização Morfológica	64
II.3.4	– Efeito do Efluente nas Características dos NP _s C Produzidos por Tratamento Hidrotérmico - Estudo Comparativo	65
II.3.4.1	– Estudo Comparativo dos NP _s C obtidos a partir do Processo de Extração de Duas-Fases (AR-2F-16 vs. AR-2F-17)	67
II.3.5	– Purificação dos NP _s C.....	70
II.3.5.1	– Purificação por Sephadex G75.....	71
II.3.5.2	– Diálise.....	73

II.3.5.3	– Extração Líquido-Líquido	74
II.3.5.4	– Purificação de NPsC com SiO ₂	75
II.3.6	– Síntese de Compósitos de Sílica e NPsC	76
II.3.7	– Análise Térmica dos NPsC	77
II.4	– ESTUDO DE POTENCIAIS APLICAÇÕES	78
II.4.1	– Avaliação Sensorial	79
II.4.1.1	– Avaliação Sensorial em Solução.....	84
III	PARTE EXPERIMENTAL.....	97
III.1	– PREÂMBULO	99
III.2	– REAGENTES, TÉCNICAS GERAIS E EQUIPAMENTO	100
III.3	– CARACTERIZAÇÃO DAS ÁGUAS RESIDUAIS DO PROCESSAMENTO INDUSTRIAL DO AZEITE.....	102
III.3.1	– Quantificação de Sólidos Totais.....	102
III.3.2	– Quantificação de Fenóis Totais ^{64,65}	102
III.3.3	– Quantificação de Flavonóides Totais ⁶⁷	102
III.3.4	– Quantificação de Taninos ⁶⁸	102
III.3.5	– Quantificação de Açúcares Totais ⁶⁹	103
III.3.6	– Quantificação de Cloretos ⁷⁰	103
III.3.7	– Quantificação de Cinzas ⁷³	103
III.3.8	– Quantificação de Nitratos ⁷²	103
III.3.9	– Quantificação de Lípidos	103
III.3.10	– Quantificação de Proteínas.....	104
III.3.11	– Determinação de CQO e CBO.....	104
III.4	– SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DOS NPsC	104
III.4.1	– Síntese dos NPsC derivados das AR-2F-16	104
III.4.2	– Síntese dos NPsC derivados das ARPIA.....	104
III.4.3	– Síntese dos NPsC derivados das AR-2F-17	104
III.4.4	– Purificação dos NPsC por Extração Líquido-Líquido.....	105
III.4.5	– Purificação de NPsC por Sephadex G75	105
IV	CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS.....	107
V	Bibliografia.....	109

I – INTRODUÇÃO

I.1 – PREÂMBULO

No presente trabalho foram obtidos novos nanomateriais de carbono luminescentes (NMsC) pela transformação química de águas residuais do processamento industrial do azeite (ARPIA), efluente de baixa biodegradabilidade e de grande abundância na zona do mediterrâneo, nomeadamente em Portugal, Espanha, França, Itália, Croácia entre outros.

Neste capítulo será realizada a revisão bibliográfica, com uma breve apresentação das nanoestruturas de carbono que antecederam os NMsC, os diferentes tipos de NMsC, bem como a sua metodologia de síntese. Serão evidenciadas as principais propriedades fotofísicas dos NMsC e as áreas onde estes podem ser empregues, devido principalmente às características luminescentes que exibem.

No sentido de contextualizar a matéria-prima utilizada na obtenção dos nanomateriais de carbono descritos no presente trabalho, será feita uma breve abordagem à indústria do processamento do azeite na zona do mediterrâneo, descrevendo os processos utilizados e a metodologia empregue na caracterização das ARPIA. A problemática ambiental associada às ARPIA será referida, nomeadamente os tratamentos usualmente utilizados na sua eliminação e valorização.

I.2 – NANOMATERIAIS DE CARBONO

Os átomos de carbono apresentam a capacidade de formar ligações covalentes robustas com outros átomos de carbono em diversas hibridizações (sp , sp^2 , sp^3) ou com elementos não metálicos, possibilitando a formação de uma série de estruturas, desde moléculas simples a estruturas complexas. Os materiais de carbono presentes na natureza são o diamante, a grafite e outras estruturas amorfas de carbono, sendo o diamante e a grafite materiais que contêm apenas carbono. Kroto *et al.*¹ descobriram a primeira nanoestrutura de carbono, os fulerenos (C_{60}). Na década de 90, os nanotubos de carbono foram descritos por Lijima² e já em 2004, Novoselov *et al.*³ conseguiram isolar e caracterizar nanoestruturas de grafeno. Mais recentemente, tem-se assistido a um crescimento no interesse nestas nanoestruturas, especialmente nos nanomateriais de carbono luminescentes (NMsC), dada a sua grande diversidade de aplicações.⁴

Os NMsC foram reportados pela primeira vez por Scrivens e seus colaboradores.⁵ Estes são caracterizados por terem dimensões entre 1-100 nm, pertencendo os de menor dimensão à categoria dos NPsC. A designação geral dada às várias estruturas de materiais baseados em carbono é pontos de carbono (PsC), onde se incluem os quantum dots de grafeno (GQDs) e os nanopontos de carbono (NPsC).^{6,7,8} Como características mais comuns, estes materiais possuem dimensões inferiores a 10 nm, morfologia esférica e exibem fluorescência significativa.⁹ A estrutura dos NPsC depende fortemente da natureza da fonte de carbono utilizada, bem como dos métodos de síntese empregues na sua obtenção. Isto levará a uma grande diversidade de possíveis estruturas para os NPsC (Figura I.1), contudo sabe-se que é comum um centro de carbono constituído por redes de Csp^2 , com zonas embebidas de funcionalidades oxidadas (e.g. éteres, epóxidos, hidroxilos), ligado a funcionalidades como grupos carboxílicos/carboxilatos, hidroxilos, quinonas e aminas/amónio através das unidades de carbono presentes na sua superfície.^{9,10} Nos últimos anos, os pontos de carbono adquiriram um lugar de destaque no campo dos nanomateriais principalmente devido às suas excelentes propriedades luminescentes, fotoestabilidade e baixa toxicidade, particularmente em comparação com pontos quânticos metálicos e pontos quânticos semicondutores.^{9,10,11}

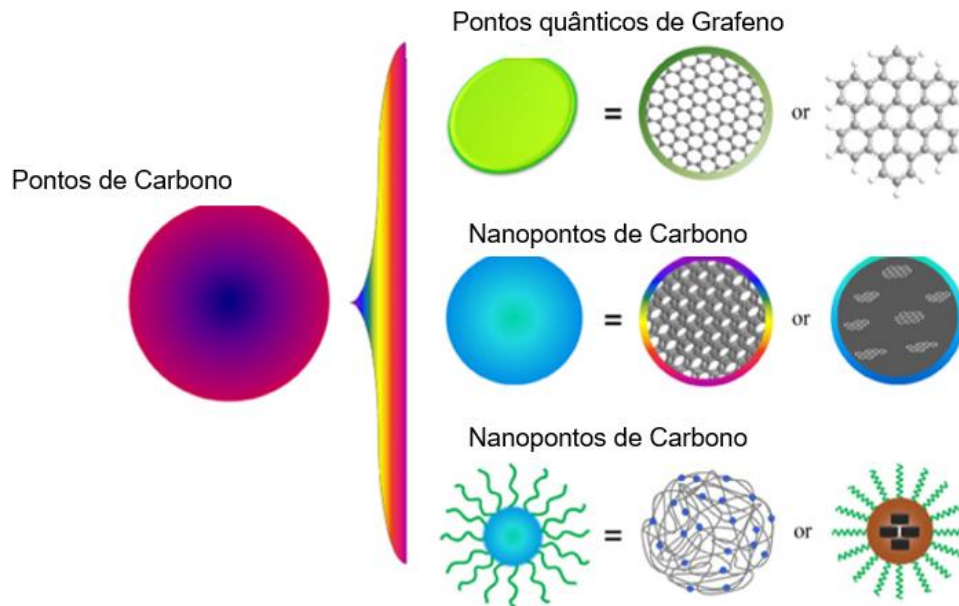


Figura I.1 – Ilustração de diferentes tipos de PsC. Adaptado de Song *et al.*¹⁰

I.2.1 – Métodos de síntese

Os NPsC são sintetizados por duas abordagens diferentes, designadas “*top-down*” e “*bottom-up*”. A abordagem “*top-down*” (Figura I.2) está associada à quebra de largas estruturas de carbono como nanodiamantes, grafite, nanotubos de carbono, carvão ativado, fuligem de carbono e óxidos de grafite. No método “*bottom-up*” (Figura I.3), a síntese dos NPsC utiliza como fonte de carbono precursores moleculares como citratos, hidratos de carbono, entre outros, através de tratamentos hidrotérmicos e irradiação por micro-ondas.¹²

I.2.1.1 – Método “Top-down”

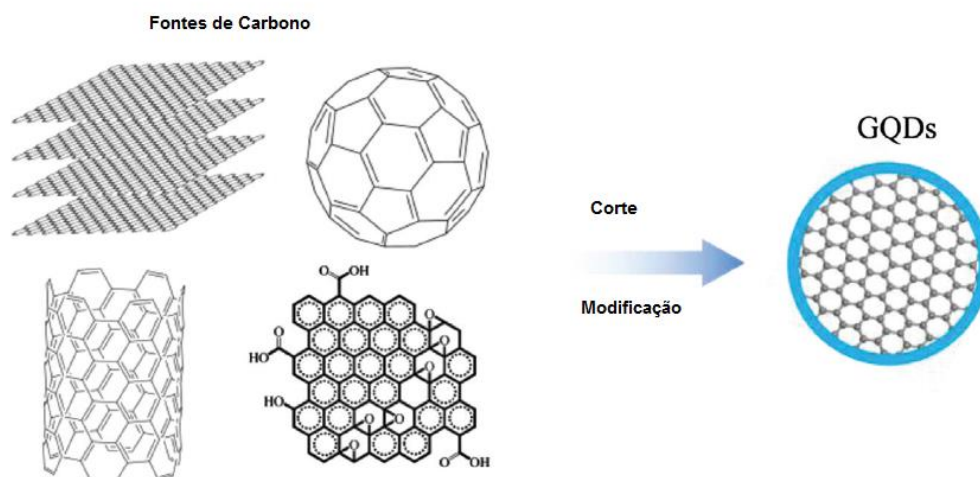


Figura I.2 – Síntese de GQDs utilizando diferentes fontes de carbono *via* “top-down”. Adaptado de Chen *et al.*¹³

As vias sintéticas na abordagem “top-down”, envolvem métodos como descarga elétrica, ablação a laser e oxidação eletroquímica.¹² Como referido anteriormente, Xu *et al.*⁵ sintetizaram os primeiros NPsC fluorescentes na purificação por eletroforese de nanotubos de carbono de camada única, preparados por descarga elétrica com arco. Antes da purificação, foi efetuado um pré-tratamento com ácido nítrico, seguindo-se uma extração com hidróxido de sódio, de onde resulta uma suspensão preta que é sujeita ao processo de isolamento para a separação dos NPsC. O rendimento de NPsC produzidos por descarga elétrica em arco é baixo e a purificação é problemática devido à complexidade da mistura resultante.⁹

A ablação a laser foi utilizada pela primeira vez por Sun *et al.*¹⁴, utilizando árgon com gás de arraste na presença de vapor de água. Partículas de carbono em agregados de diferentes dimensões nanométricas foram sintetizadas, apesar de estes NPsC não demonstrarem emissão de fluorescência. A amostra foi oxidada por tratamento ácido seguido por funcionalização da superfície com PEG ou poli(propioniletienoimina-co-etienoimina) (PPEI-EI), originando NPsC funcionalizados com elevada fotoluminescência.^{9,14} Apesar da ablação a laser apresentar vantagens, tem como inconveniente a utilização de grandes quantidades de carbono para a preparação do alvo. Outra desvantagem relevante é a grande heterogeneidade de tamanhos dos NPsC obtidos, obrigando à separação dos maiores por centrifugação, o que implica uma eficiência baixa na utilização do material de carbono.⁹

A síntese de NPsC por via eletroquímica, utiliza na sua maioria grafite como fonte de carbono, sendo uma excelente opção para a formação de elétrodos. Lu *et al.*¹⁵, utilizou hastes de grafite de alta pureza e grafite pirolítica como ânodo e como contra-elétrodo fio de platina com uma separação de 2 cm. Estes foram inseridos numa solução aquosa/líquido iónico, sendo aplicado um potencial estático para promover a esfoliação do material de carbono. A esfoliação ocorre devido à complexa interação entre a esfoliação oxidativa promovida pela água e a intercalação aniónica proveniente do líquido iónico. Os produtos de esfoliação são posteriormente lavados com água e etanol até pH neutro, obtendo-se NPsC com tamanhos de 6-8 nm após filtração e ultracentrifugação a 15000 rpm (20°C), sendo o rendimento quântico de fluorescência ca. 5%. Os NPsC mostraram excelentes propriedades luminescentes e são termodinamicamente estáveis em água.⁹

1.2.1.2 – Método “Bottom-up”

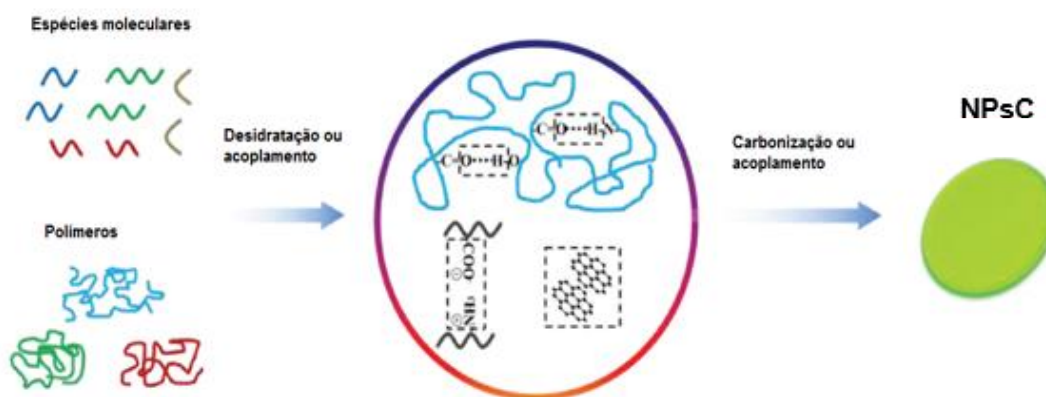


Figura 1.3 – Síntese de NPsC por diferentes fontes de carbono *via* “bottom-up”. Adaptado de Chen *et al.*¹³

Tipicamente a preparação de NPsC por tratamento hidrotérmico/solvotérmico baseia-se na carbonização dos precursores (150-300°C) sob altas pressões de vapor. Paralelamente, a preparação destes últimos por irradiação de micro-ondas pode ser usada para carbonizar o precursor a altas temperaturas num curto espaço de tempo (10 min), com rendimentos mássicos elevados em NPsC. Estes métodos têm como grande vantagem a obtenção de NPsC com elevadas intensidades de fluorescência e altos rendimentos mássicos. Por outro lado, as propriedades dos NPsC dependem

largamente do tipo de precursor e método de síntese, sendo a escolha dependente da disponibilidade do precursor e do seu custo.^{16, 17}

Zhu e seus colaboradores¹⁷ prepararam NPsC sujeitando ácido cítrico e etilenodiamina a tratamento hidrotérmico, durante 5 horas com temperaturas variando entre 150-300 °C. Após essa etapa, o isolamento dos materiais foi realizado por diálise, originando NPsC com rendimentos quânticos entre 3 e 80 %. Além do ácido cítrico, muitas outras fontes de carbono foram utilizadas, nomeadamente quitosano¹⁸, sumo de laranja¹⁹, caule da cana do açúcar²⁰, entre outros. O processo hidrotérmico/solvotérmico tem como grandes vantagens o seu baixo custo, fácil processamento e possibilidade de usar fontes de carbono baratas.¹⁶

Como referido anteriormente, a utilização da irradiação por micro-ondas na síntese dos NPsC é um método eficiente devido ao baixo tempo de reação comparativamente ao tratamento hidrotérmico, para além do melhoramento que poderá ter ao nível do rendimento e qualidade dos produtos.²¹ Os primeiros trabalhos reportados na obtenção de NPsC sintetizados por este método²² utilizaram PEG e glucose dissolvidos em água destilada e aquecidas num micro-ondas doméstico, por períodos de 2-10 minutos. Foram obtidos NPsC com tamanhos entre 2-4 nm e rendimentos quânticos de fluorescência ca. 6%. Tem como eventual inconveniente a escalabilidade do processo a nível industrial.

1.2.1.3 – Funcionalização da superfície e dopagem

A dopagem com heteroátomos é um dos métodos mais convencionais e efetivos no controlo das propriedades óticas e eletrónicas dos PsC, resultando num melhoramento da intensidade de fluorescência dos mesmos,¹⁶ sendo o azoto um dos elementos mais usados para este fim.²² Tipicamente, moléculas orgânicas sofrem carbonização na presença de moléculas contendo N- ou S- ligado covalentemente, obtendo PsC dopados com heteroátomos. Dan *et al.*²³ demonstraram que PsC dopados com azoto utilizando como fonte de carbono ácido cítrico e como fonte de azoto etilenodiamina e ureia, levaria a um aumento de rendimento quântico; os PsC não dopados apresentaram um ϕ_F de 22% vs. 94% para os materiais dopados com azoto.^{16,23} Kim *et al.*²⁴ confirmou que os aditivos podem melhorar o grau de carbonização durante o processo de dopagem com azoto.¹⁶ A adição de HCl como aditivo, por exemplo, aumentou a eficiência da hidrólise de xilitol, fonte de carbono utilizada, e da etilenodiamina, levando à formação de PsC dopados com azoto altamente luminescentes. De forma a melhorar as propriedades luminescentes dos PsC, Choi *et al.*²⁵ sugeriram a dopagem com mais do que um

elemento. Este procedimento conduziu à formação de estados de superfície bem distribuídos, bem como a redução de recombinações não radiativas, o que levou ao aumento do rendimento quântico dos PsC. Os investigadores demonstraram o benefício de co-dopagem ao sintetizar PsC co-dopados com boro e azoto (BN-CD; Figura I.4), obtendo materiais com um rendimento quântico de 80%, o dobro do valor dos obtidos quando dopados apenas com azoto. A análise estrutural mostra que os BN-PsC consistem em N-grafítico e estados de superfície bem distribuídos, nomeadamente grupos carboxílicos e hidroxilo.

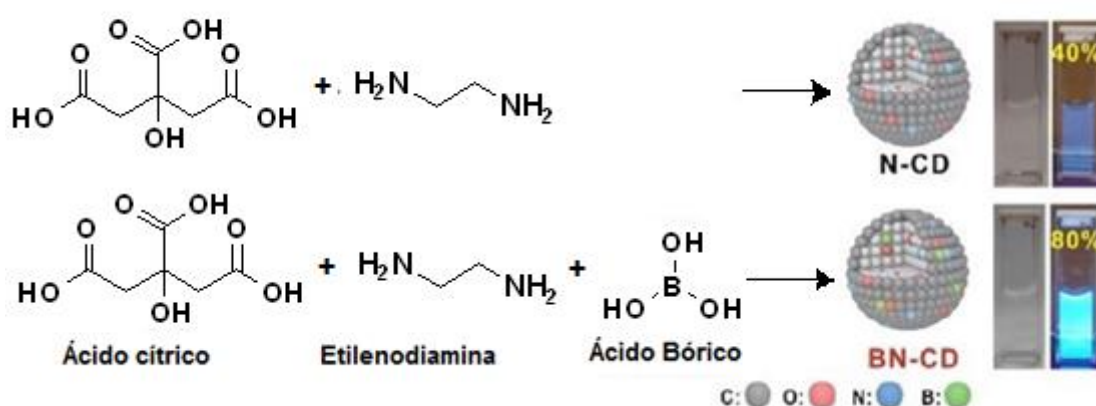


Figura I.4 – Síntese de PsC dopados com N (N-CD) e PsC co-dopados com B e N (BN-CD). Imagens de fotografia mostram suspensões de PsC sob luz visível (esquerda) e sob luz UV a 365 nm (direita). Adaptado de Choi *et al.*²⁵

A funcionalização dos PsC com outras moléculas, é uma outra alternativa para melhorar as suas propriedades fotofísicas. As funcionalidades presentes nos PsC são utilizadas para a funcionalização da superfície deste último utilizando diferentes moléculas orgânicas.¹⁶ Choi *et al.*²⁶ utilizaram PsC derivados de α -ciclodextrina, passivando-os com PEG, resultando em nanomateriais com melhores propriedades óticas (rendimento quântico aumentou de 2.1% para 7.8%), verificando-se ainda a formação de estados de superfície uniformes levando a que a luminescência fosse independente do comprimento de onda de excitação. A funcionalização da superfície dos PsC demonstra ser de grande importância no controlo dos estados de superfície sem alterar o estado do centro.^{16,26}

I.2.2 – Propriedades Fotofísicas

Os NPsC destacam-se bastante no campo da nanotecnologia pelas propriedades fotofísicas que exibem, principalmente a sua extraordinária fotoluminescência.

O seu espectro de UV-Vis exibe duas bandas de absorção características, ca. 240 nm proveniente de transições π - π^* (C- sp^2 da rede de carbono) e ca. 350 nm (transições n - π^* dos grupos carbonilo da superfície).^{16,25,27} Os máximos de absorção dependem fortemente da funcionalização da superfície, como tal estes últimos poderão ser ajustados perspetivando as aplicações pretendidas.¹⁶

A fluorescência dos PsC poderá primeiramente depender de um estado molecular, por exemplo, nos PsC obtidos com ácido cítrico e etilenodiamina por Yang e colaboradores,²⁸ foi possível isolar o fluoróforo maioritário presente e identifica-lo como ácido imidazol[1,2-a]piridina-7-carboxílico (IPCA).²⁸ Esta espécie aumenta significativamente o rendimento quântico dos PsC, sendo o estado molecular claramente distinguido pela presença de um pico gaussiano no UV-Vis e o espectro de emissão é independente do comprimento de onda de excitação. O estado molecular poderá ser reduzido por sucessivas diálises.²⁹ O estado do centro de carbono dos NPsC está relacionado com a existência de aglomerados sp^2 onde ocorre recombinação radiativa de elétron-lacuna. Este mecanismo, muitas vezes coexiste com estados moleculares, que normalmente demonstram um maior rendimento quântico e menor fotoestabilidade. Contudo, a confirmação da existência do centro de carbono é indireta devido ao envolvimento deste por cadeias poliméricas externas e também porque a carbonização é sempre incompleta, levando a que o próprio centro contenha partes de redes poliméricas, hidrocarbonetos cíclicos, grafite dopada com heteroátomos, entre outros, levando a que o centro não seja constituído por grafite pura. Assim, o efeito de confinamento quântico não pode ser rigorosamente considerado em muitos casos, podendo o efeito do centro de carbono ser camuflado por outros centros de forte intensidade de luminescência.^{29,12} Distinguindo-se do estado molecular, o estado de superfície é hibridização sinérgica entre a “espinha dorsal” de carbono com os grupos funcionais. O *gap* de energia do estado superficial, onde elétrons e lacunas se recombinaem e emitem fluorescência, está diretamente correlacionado com a extensão do sistema de elétrons π e com o tipo de funcionalidades presente na superfície. O controlo da fotoluminescência dos PsC pode ser feito por alterações na química de superfície, seja por dopagem/funcionalização ou oxidação/redução.^{12,29}

Uma propriedade de fotoluminescência relevante destes materiais é a sua clara dependência do máximo de emissão com o comprimento de onda de excitação, sendo

uma das razões apontadas para este efeito, a existência de diferentes tamanhos de partícula e características químicas não uniformes à superfície dos PsC. Além disso, comparativamente a um PQ (ponto quântico), a banda de emissão dos PsC é bastante mais alargada, o que poderá indicar uma heterogeneidade de estruturas químicas, o que levará a diferentes centros luminescentes.^{9,16,30}

O meio envolvente dos PsC poderá influenciar as suas propriedades fotoluminescentes, havendo materiais mais sensíveis do que outros a essas alterações. A mudança de solvente poderá contribuir para essas alterações, dado que os NPsC são bastantes sensíveis à polaridade e exibem a capacidade de formar ligações por pontes de hidrogénio.^{16,9} Para além do efeito do solvente, a variação do pH reflete-se igualmente na fotoluminescência. Pan *et al.*³¹ prepararam PsC por via hidrotérmica os quais exibiram uma forte intensidade de fluorescência em meio alcalino, sendo esta extinguida em meio ácido. A fluorescência dos PsC foi posteriormente recuperada ao repor o meio a pH alcalino.^{9,31}

Os NPsC possuem uma elevada fotoestabilidade, não sofrendo fotodegradação após longos tempos de irradiação contínua. Apesar da variabilidade de métodos de síntese, muitos tipos de PsC demonstram fotoestabilidade, parâmetro de extrema importância para as suas principais aplicações.⁹ Wei *et al.*³² sintetizaram PsC a partir de glucose e uma série de análogos de aminoácidos. Estes PsC demonstraram uma excelente fotoestabilidade, mantendo 90% da sua intensidade de fluorescência após 60 min de irradiação contínua. Comparando com o isotiocianato de fluoresceína (extinção de fluorescência ao fim de 5 min de irradiação contínua) e com os pontos quânticos (PQ) de CdTe que reteve apenas ca. 30% da sua luminescência inicial após 20 min de irradiação contínua, os PsC apresentam-se mais fotoestáveis, conferindo-lhes uma vantagem significativa sobre estes últimos fluoróforos.^{9,32}

O rendimento quântico (Φ_F) é o número de fótons emitidos relativo ao número de fótons absorvidos. Os primeiros PsC sintetizados, exibiram baixos rendimentos quânticos, alguns deles abaixo de 1.6%.⁵ Após as modificações de superfície ou passivação que tem vindo a ser desenvolvida, este parâmetro pode aumentar drasticamente, o que efetivamente tem vindo a ser comprovado. Generalizando, este parâmetro é altamente dependente do método de síntese, química de superfície e fonte de carbono.¹¹ Refira-se que no presente trabalho, foi dado grande ênfase ao melhoramento do rendimento quântico dos NPsC obtidos, sendo esse estudo apresentado na Secção II.3.

I.3 – Principais Aplicações

As principais aplicações do PsC estão relacionadas em grande parte com as suas propriedades óticas, aplicações essas em áreas tão diversificadas como a bioimagem, a fotocatalise, como sensores fluorescentes e em optoelectrónica.¹²

Apresentar-se-ão de seguida alguns exemplos reportados das aplicações destes nanomateriais.

I.3.1 – Sensores Químicos

Os NPsC têm sido bastante utilizados na área da química sensorial, sendo esta uma das suas principais aplicações. Yan e seus colaboradores³³ sintetizaram dois tipos de PsC usando ácido cítrico e 1,2-etilenodiamina (CD-1) e *N*-(β -aminoetil)-*g*-aminopropil (CD-2), exibindo ambos elevados rendimentos quânticos, ca. 65.5% e 55.4%, respetivamente. Estes materiais foram posteriormente testados como sensores de iões Hg^{2+} em solução aquosa e em células vivas, demonstrando seletividade e eficácia relevantes na deteção do mercúrio. Os investigadores demonstraram que após a adição de 20 μM de Hg^{2+} , a intensidade de fluorescência do CD-1 decresceu 80% vs. 55% para CD-2. A comparação com a adição de outros metais, comprovou a seletividade dos sensores obtidos para o mercúrio. Para além do mercúrio, tem sido demonstrado que os PsC também têm revelado sensibilidade na deteção de outros metais, nomeadamente Cu^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} , Cr^{6+} e Ag^+ .^{34,35}

Os PsC também têm sido utilizados como sensores de espécies aniónicas. Wu *et al.*³⁶ utilizaram PsC dopados com azoto na deteção de hipoclorito de sódio numa gama de concentração de 0-10 mM por extinção de fluorescência. Esta extinção de fluorescência é explicada pela transferência fotoelectrónica seletiva dos átomos de azoto para o hipoclorito. Os NPsC também poderão detetar outras espécies aniónicas, designadamente iões S^{2-} e $S_2O_3^{2-}$.³⁵

Lin *et al.*³⁷ sintetizaram PsC utilizando cinzas provenientes de papel residual como fonte de carbono, sendo a fluorescência destes materiais extinta por Fe^{3+} , o que permitiu desenvolver um procedimento adequado para a deteção de pesticidas organofosforados. Este baseia-se na extinção da fluorescência do sistema por ação de Fe^{3+} oriundo da oxidação de Fe^{2+} por H_2O_2 , este último proveniente da decomposição da acetilcolina num sistema multienzimático de acetilcolinesterase com a colina oxidase. A adição progressiva de clorpirifos provoca um aumento de fluorescência do sistema ao inibir a atividade da acetilcolinesterase.

Outra aplicação desenvolvida para a detecção de substâncias moleculares foi conseguida por Wu³⁸, criando um sistema baseado em PsC capaz de detetar H₂S. Os PsC funcionam como doadores de energia, sendo a azida de naftalimida o recetor quando na presença de H₂S. Como tal, o aumento da concentração de H₂S, faz desaparecer a emissão azul dos PsC, aumentando a emissão verde da azida de naftalimida, induzindo assim uma mudança do azul para o verde distinguida a olho nu.³⁹

Para além destes exemplos, os PsC podem também ser usados em ensaios de detecção de proteínas hélicas, como por exemplo hemoglobina, onde Qu *et al.*⁴⁰ desenvolveram um sistema de NPsC sintetizado por via hidrotérmica utilizando como fonte de carbono ácido ascórbico. Estes nanomateriais apresentaram elevada sensibilidade (com um limite de detecção de 20 pM) e seletividade para esta proteína, comparativamente, por exemplo, a albumina de soro bovino (BSA), caseína e citocromo *c*.

I.3.2 – Fotocatálise

Devido ao seu potencial carcinogénico, mutagénico e propriedades bactericidas, poluentes orgânicos presentes nas águas residuais industriais têm atraído fortemente a atenção da comunidade científica durante as últimas décadas. Recentemente, a área da organocatálise tem vindo a ganhar destaque devido às desvantagens que os catalisadores baseados em metais nobres e semicondutores apresentam, nomeadamente o seu elevado custo e toxicidade inerentes. Wang *et al.*⁴¹ sintetizaram PsC usando glucose e ácido clorídrico, aplicando-os posteriormente na degradação fotocatalítica do azul de metileno. Os resultados obtidos demonstraram que sob irradiação contínua de luz durante 60 minutos, o azul de metileno foi completamente degradado, com a vantagem de os NPsC, devido à sua estrutura e fotoestabilidade, poderem ser separados e reciclados eficientemente.⁴¹

I.3.3 – Bioimagemologia

Dada a sua baixa toxicidade e excelentes propriedades fluorescentes, os PsC têm demonstrado um grande potencial no campo da bioimagemologia.¹³ GQDs foram aplicados em imagemologia de células do cancro da mama MCF-7 por Dong *et al.*⁴². O estudo demonstrou que a membrana celular, citoplasma e o núcleo podem ser marcados por GQDs fluorescentes. Este trabalho foi pioneiro na utilização de materiais fluorescentes de carbono como marcadores fluorescentes do núcleo celular.¹³

I.3.4 – Optoelectrónica

Beneficiando das suas propriedades optoelectrónicas, os PsC têm vindo a demonstrar grande capacidade para aplicação em dispositivos optoelectrónicos eficientes, nomeadamente na conceção de LEDs e células solares.⁴³ Mirtchev *et al.*⁴⁴ reportaram o uso de PsC obtidos a partir de γ -butiro-lactona, como sensibilizadores em células solares de TiO₂, demonstrando uma potência de eficiência de conversão de 0.13%. Em sistemas de células solares, estes nanomateriais limitam a recombinação de carga e melhoram o transporte da mesma, levando a um melhoramento dessas propriedades, especialmente após a dopagem com heteroátomos.¹⁶

I.4 – INDÚSTRIA DE PRODUÇÃO DO AZEITE

O azeite é obtido a partir da azeitona, fruto das oliveiras (*Olea europea L.*; Figura I.5), por processos mecânicos e operações unitárias, que podem incluir prensagem, lavagem, decantação, centrifugação e filtração. O azeite tem alto valor nutricional e dietético, com uma produção anual de 2.9 milhões de toneladas/ano nos últimos cinco anos.⁴⁵ A produção de azeite é extremamente importante para a atividade agroindustrial na região do Mediterrâneo, representando ca. 95% da produção mundial, onde os países da união europeia representam ca. 71% da cota mundial.⁴⁶



Figura I.5 – Oliveiras na região de Vila de Rei, Portugal.⁴⁷

I.4.1 – Processos de Extração do Azeite

Tipicamente, o azeite é extraído da pasta de azeitona obtida após esmagamento e malaxação de azeitonas por dois processos principais: prensa descontínua (P) e centrifugação contínua. Este último, pode operar por centrifugação de duas fases (2F) ou três fases (3F). Geralmente, dois tipos de resíduos são obtidos, o bagaço (processo

de prensa e 3F) e um resíduo aquoso chamado de água residual do processamento industrial do azeite (ARPIA).⁴⁸ Quando é usado o processo de centrifugação de 2F, um bagaço com maior conteúdo de água é obtido (55-70%), para além do resíduo aquoso (AR-2F) proveniente das lavagens finais do azeite.⁴⁸ Embora o bagaço deste último processo tenha maior conteúdo de água e seja por essa razão mais difícil de processar comparativamente aos outros dois, estratégias industriais de recuperação de óleo e gestão deste mesmo bagaço proveniente de sistemas 2F estão atualmente implementados e em uso.⁴⁸ Independentemente do processo utilizado, 200-1600 L de águas residuais industriais são produzidas por tonelada de azeitona processada.⁴⁸ Os sistemas P e 2F geram as menores quantidades de efluente aquoso, sendo estas duas últimas tecnologias de processamento as mais utilizadas.⁴⁸

I.4.1.1 – Centrifugação Contínua de Duas Fases

Os processos de extração contínua de azeite utilizam decantadores industriais para separar todas as fases por centrifugação. Esta tecnologia baseia-se nas diferenças de densidade dos componentes da pasta de azeite (azeite, água e sólidos insolúveis). Esta metodologia processual, através de pequenas alterações, poderá operar sistemas de 3F ou 2F. De forma a minimizar o consumo de água e respetiva produção de ARPIA, reduzindo assim o impacto ambiental do processo, a extração do azeite por centrifugação contínua de 2F (Figura I.6) foi desenvolvida na década de 90.

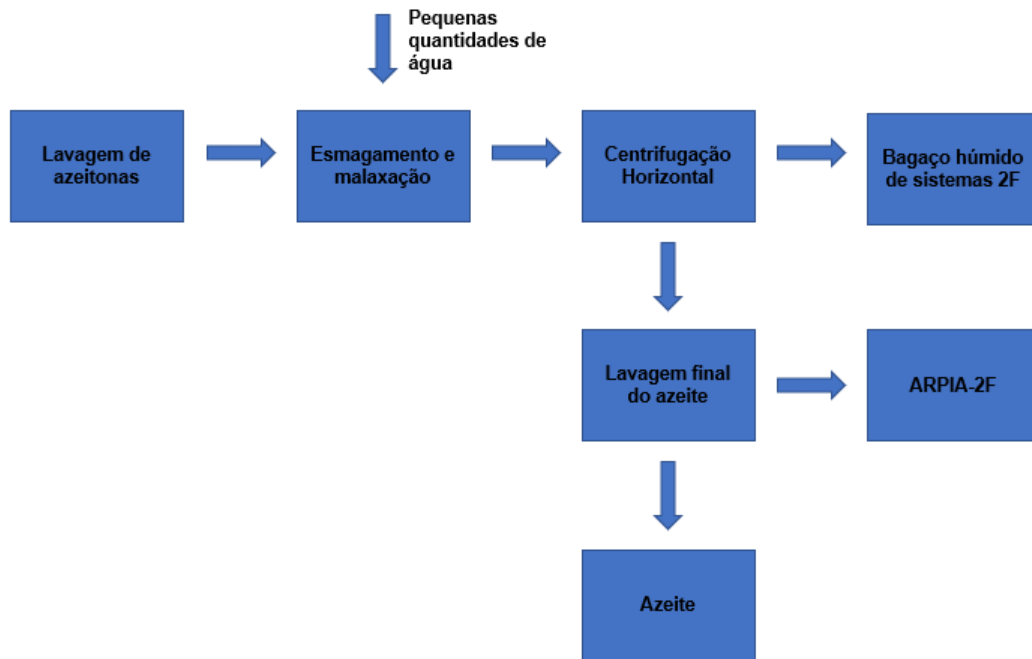


Figura I.6 – Diagrama de blocos para sistemas 2F. Adaptado de Dermeche *et al.*.⁴⁹

Usando esta tecnologia, a pasta de azeitona é separada em duas fases: i) bagaço húmido e ii) azeite. O bagaço húmido obtido é um subproduto semi-sólido que pode ser reprocessado para recuperar o óleo que não foi separado na primeira centrifugação e aumentar os rendimentos. De fato, existem dois tipos de óleo de bagaço: i) óleo extraído com solventes (tradicional) e ii) óleo obtido por uma segunda centrifugação. Este processo tem sido apelidado de “*decantadores ecológicos*” pela redução no consumo de água. Por isso mesmo, este processo tem-se tornado predominante e tem vindo a substituir os processos de extração por 3F.^{48,49}

I.4.1.2 – Centrifugação Contínua de Três Fases

O processo de extração contínua de azeite por decantador de 3F (Figura I.7) tem como principal desvantagem, relativamente ao processo de extração de 2F, a grande quantidade de água utilizada.

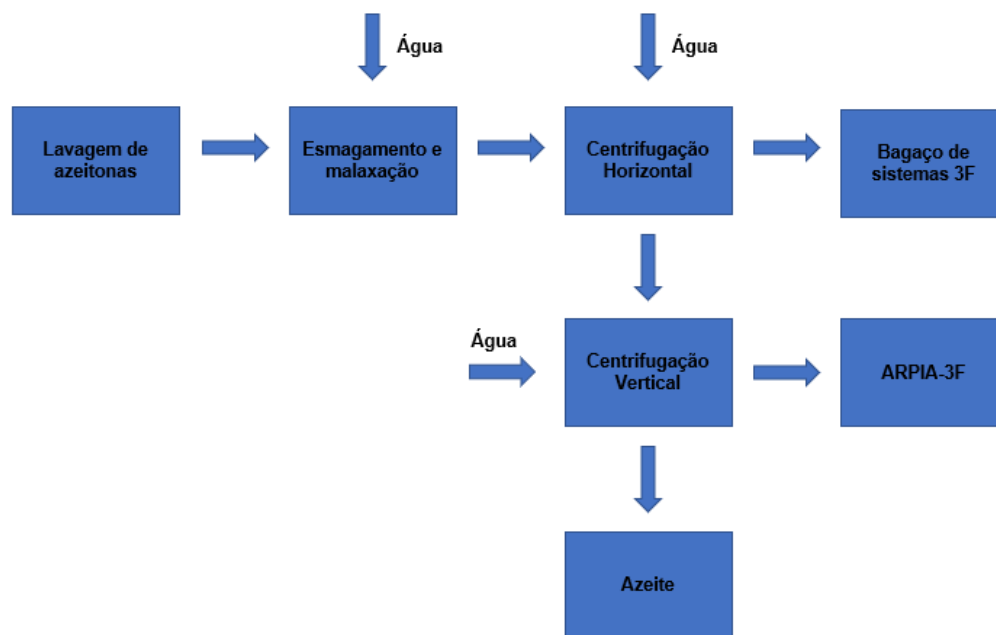


Figura I.7 – Diagrama de blocos para sistemas 3F. Adaptado de Dermeche *et al.*⁴⁹

O processo adiciona água quente às duas etapas de centrifugação, produzindo grandes quantidades de ARPIA (80-120 L/100 Kg de azeitona). Este sistema, assim como o de 2F apresenta como vantagens a autonomia processual, a obtenção de óleo de excelente qualidade e ainda, menores áreas de produção. Contudo, devido ao seu alto consumo de água e energia, tem vindo a cair em desuso.^{48,49}

I.4.1.3 – Prensa

O processo descontínuo de extração do azeite (Figura I.8) é o mais antigo para a obtenção do azeite da azeitona.

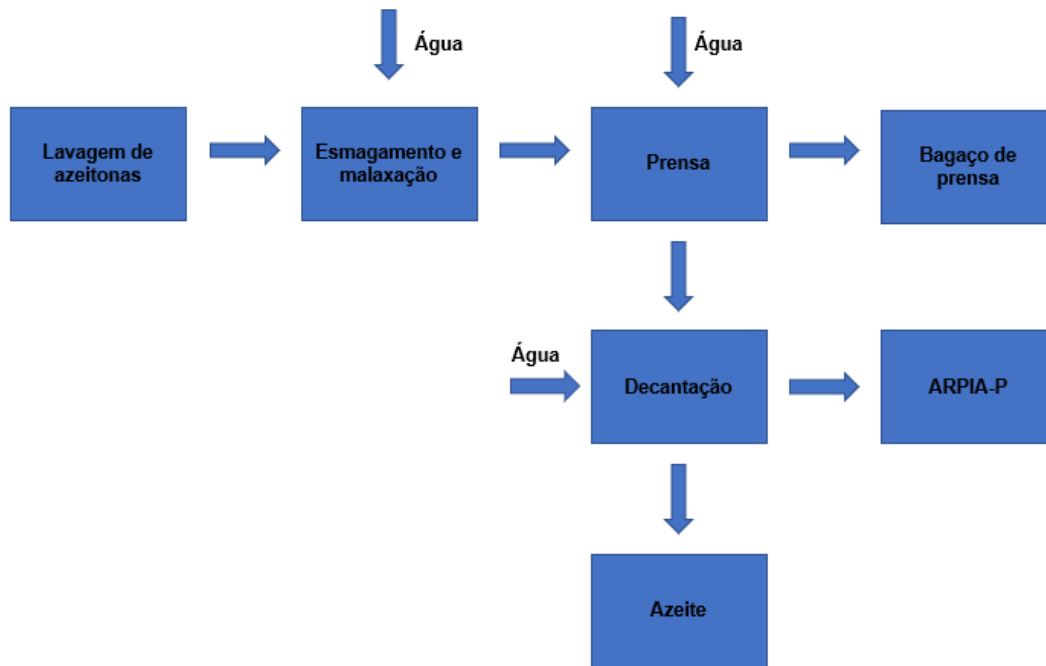


Figura I.8 - Diagrama de blocos para sistemas de prensa. Adaptado de Dermeche *et al.*⁴⁹

A pasta de azeitona é direcionada para uma etapa de prensagem, onde tipicamente dois discos compactam a fase sólida da pasta para a percolar em duas fases líquidas (azeite e água de vegetação). Pequenas quantidades de água são adicionadas para facilitar a separação do azeite. O subprocesso de extração por prensa produz uma fração sólida chamada de bagaço de azeitona que contém polpa de azeitona, peles, inorgânicos e água, sendo esta mistura separada das ARPIA por decantação. Este método oferece como principais vantagens, a utilização de equipamento barato e a simplicidade de processos. Uma outra vantagem, e não menos importante, é a pequena quantidade de ARPIA produzida em comparação com sistemas 3F (ca. 40 a 60 L/100 Kg de azeitonas).⁴⁹ Contudo, devido ao fato de ser um processo descontínuo e de necessitar de um maior número de trabalhadores, este processo tem vindo a cair em desuso desde os anos 70 do Séc. XX.^{48,49}

I.4.2 – Águas Residuais do Processamento Industrial do Azeite

Tipicamente as ARPIA são caracterizadas pela sua baixa biodegradabilidade (CQO até 220 g O₂/L e CBO até 100 g O₂/L)^{50,51} representando um sério problema para o seu tratamento. A toxicidade/fitotoxicidade deste efluente está relacionada com a sua pobre biodegradabilidade que normalmente é atribuída à presença de altos níveis de polifenóis

e derivados de fenóis, que são tóxicos para a maior parte dos microrganismos, tendo alto impacto em ambientes terrestres e aquáticos.⁵⁰ O tipo de ARPIA que se obtém, para além do processo de extração associado, depende de vários parâmetros, nomeadamente a variedade da azeitona, a maturidade da azeitona, as técnicas de cultivo e as condições pedo-climáticas. Nas áreas mediterrâneas, essas águas são produzidas durante o inverno (novembro a fevereiro) e as quantidades totais variam entre 7 a 30 milhões de m³/ano.⁵² As ARPIA representam ca. dois terços dos resíduos do processamento do azeite e são maioritariamente compostas por 83-92% de água naturalmente presente nas azeitonas e água adicionada ao processo. Independentemente da tecnologia usada para a extração do azeite, o produto residual representa um sério problema ambiental.⁵²

Nos países mediterrâneos, onde a área costeira é maioritariamente caracterizada por condições climáticas áridas ou semiáridas, a escassez de solo orgânico e a deficiência de água, conduz a que a utilização mais adequada das ARPIA seja o tratamento e utilização destas no solo. Apesar da sua composição química poder causar contaminação de solos e/ou da água, o seu uso na agricultura como fertilizante é promovido devido ao seu alto teor em nutrientes como N, P, K, Mg e Fe e uma taxa consistente de matéria orgânica.⁵² Contudo, fatores chave são subestimados, nomeadamente a textura e as propriedades do solo, a humidade, o lençol freático e o tipo de cultura, demonstrando produzir um impacto negativo na relação solo-planta. Contudo, o uso controlado e moderado das ARPIA como fertilizante, pode não causar efeitos negativos a longo prazo para os parâmetros químicos do solo, podendo até resultar numa melhoria da fertilidade e da produtividade do solo, apesar dos efeitos negativos a curto-prazo na qualidade do mesmo que podem ser negligenciados após um período de espera adequado.^{49,52}

Considerando toda a problemática associada à produção deste efluente, será apresentado nesta Secção um resumo da composição química destas águas, os problemas ambientais inerentes e os respetivos tratamentos que se podem implementar.

I.4.2.1 – Caracterização e Composição Química

Como referido anteriormente, as ARPIA apresentam baixos valores de biodegradabilidade e quantidades consideráveis de polifenóis. Por exemplo, são reportados valores de fenóis e polifenóis entre 1.3-4.0 % (base seca), enquanto que o total de hidratos de carbono pode variar entre 3.4-33.0 %, ⁵³ refletindo claramente a dependência que a

composição deste resíduo tem no processo de extração e noutros fatores já mencionados.

Os compostos fenólicos incluem substâncias orgânicas que possuem anéis aromáticos funcionalizados com um ou mais grupos hidroxilo. Compostos fenólicos de origem natural, têm por base moléculas simples, como ácidos fenólicos e compostos altamente polimerizados, tais como os taninos.^{49,54}

Os polifenóis são compostos mais complexos, com duas ou mais unidades fenólicas, independente do número de funcionalidades hidroxilo, onde se incluem os flavonóides e os taninos. Estes compostos têm como formas comuns a conjugação a outras moléculas naturais como moléculas de açúcares (mono-, di- ou oligossacáridos), ácidos orgânicos e lípidos, ou ligados a grupos hidroxilo de outros compostos fenólicos, ou menos frequente, a átomos de carbono aromáticos. Estes compostos protegem as plantas de doenças, luz ultravioleta e ajudam a prevenir a danificação das sementes até germinarem.^{49,55}

Os flavonóides são compostos de baixa massa molecular, consistindo em quinze átomos de carbono, rearranjados numa configuração C6-C3-C6; isto é, a estrutura consiste em dois anéis aromáticos, A e B, unidos por uma ponte de 3 carbonos, usualmente na forma de um anel heterocíclico, C. O anel aromático A é obtido via acetato/malonato, enquanto que o anel B é derivado da fenilalanina *via* xiquimatos (derivados do ácido xiquímico). Variações no padrão de substituição do anel C, resulta noutras classes de flavonóides, tais como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanonóis, isoflavanonas e antocianidinas.⁵⁴

Os taninos são compostos de alta massa molecular subdivididos em hidrolisáveis e condensados. Os taninos condensados (Figura I.9) são polímeros ou oligómeros de flavonóides, derivados de monómeros de flavan-3-ol, por exemplo. Os taninos hidrolisáveis (Figura I.10) derivam da esterificação do ácido gálico por um poli-ol e/ou reações de acoplamento oxidativo, originando numerosos derivados. Tipicamente, o poli-ol mais comum é a *D*-glucose, que por esterificação com ácido gálico origina galotaninos.^{54,55}

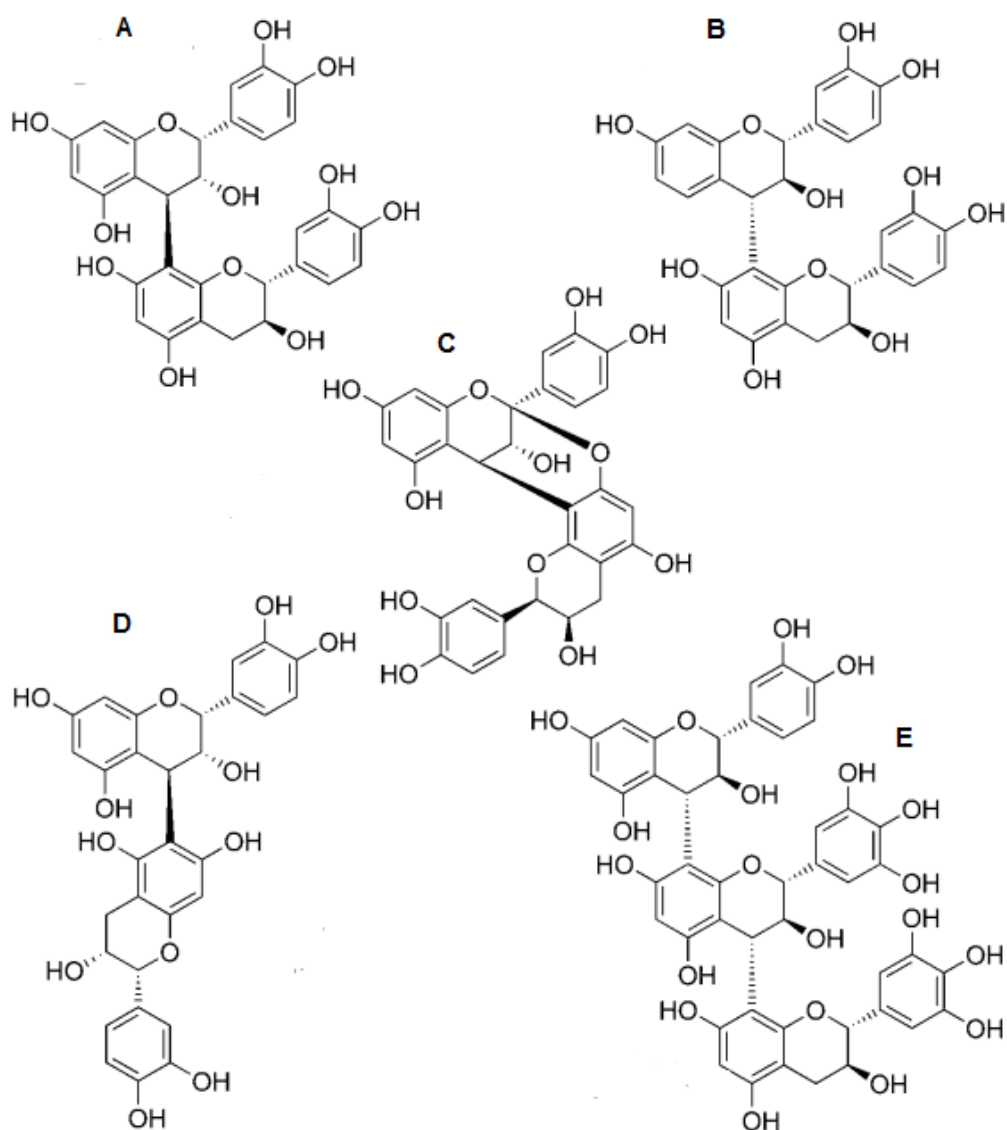


Figura I.9 - Exemplos representativos de taninos condensados. Três dímeros de procianidina (**A**, **B** e **C**), um dímero de profisetinidina (**D**) e um trímero de procianidina (**E**).⁵⁵

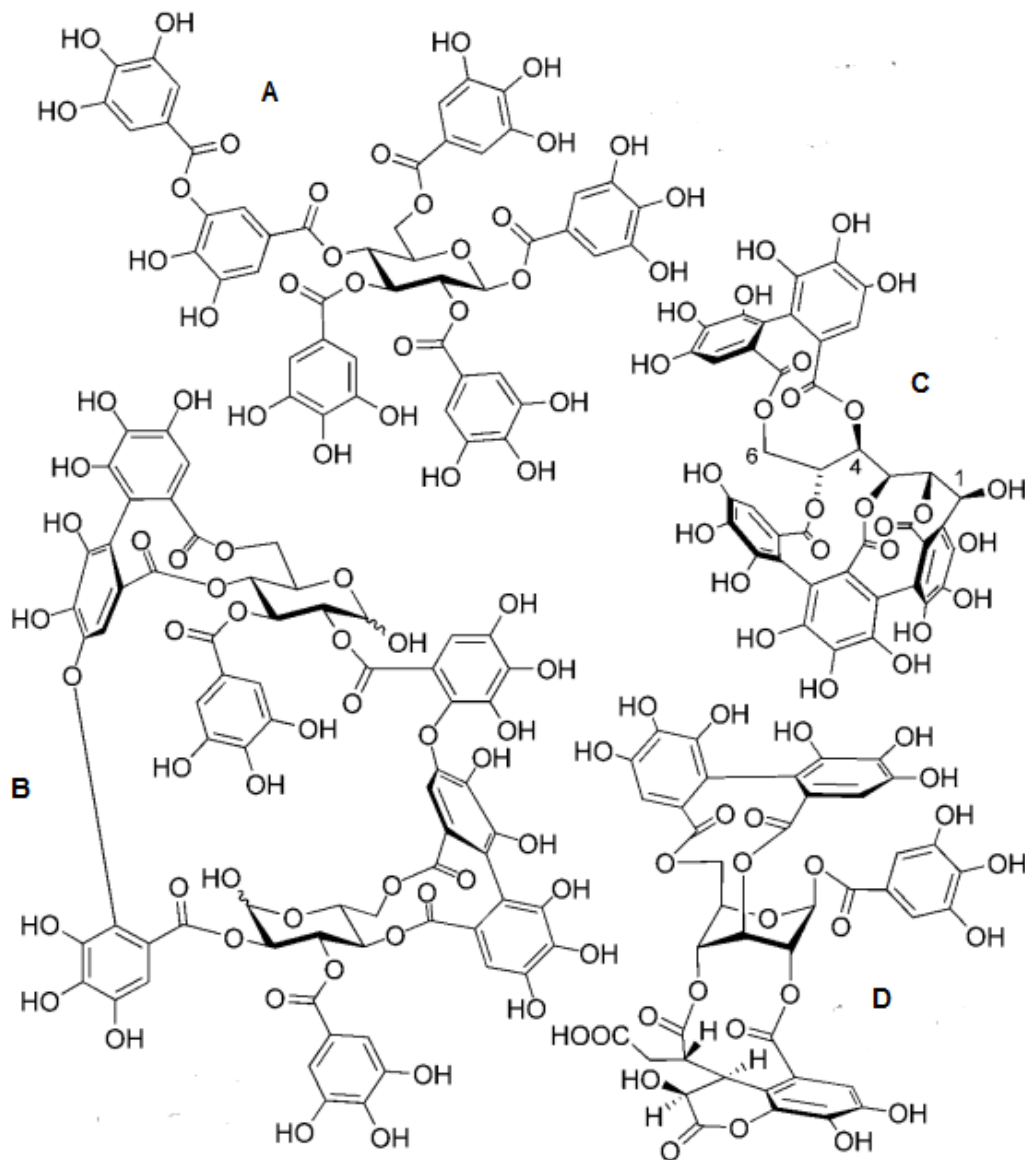


Figura I.10 - Exemplos representativos de taninos hidrolisáveis. Derivado de galotanino (A) e derivados de elágitaninos (B, C, D).⁵⁵

Tipicamente, os subprodutos dos processos extrativos do azeite têm como principais compostos fenólicos, os ácidos fenólicos e conjugações destes a unidades de açúcares. Os principais compostos obtidos para os ácidos fenólicos encontram-se na Figura I.11; na Figura I.12 encontram-se dois derivados comuns de compostos fenólicos ligados a unidades glicosídicas.⁴⁹

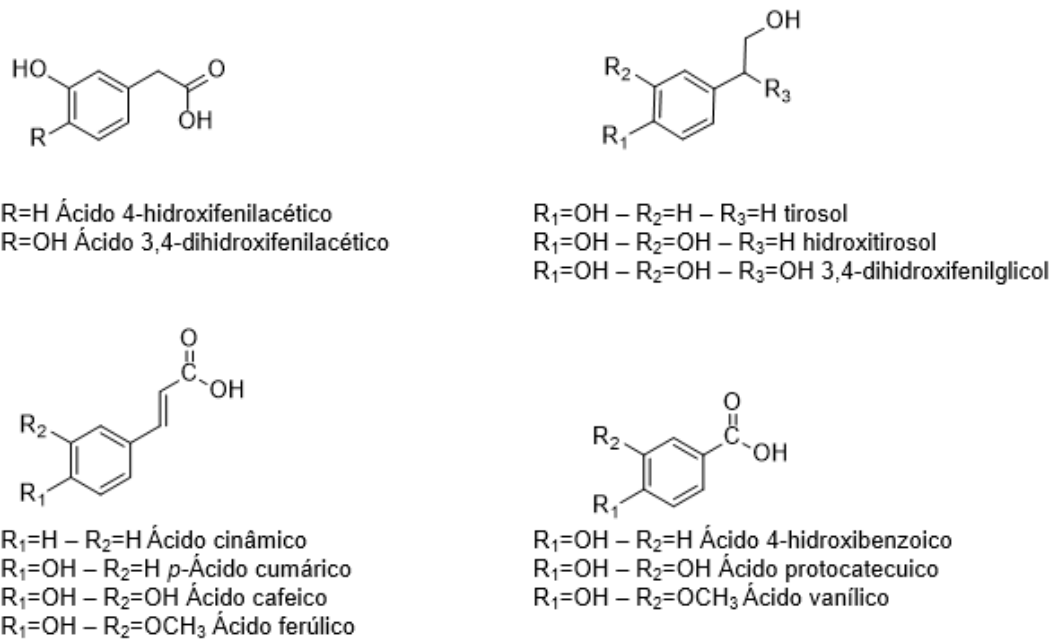


Figura I.11 – Derivados de ácidos fenólicos comuns em subprodutos obtidos do processamento do azeite.⁴⁹

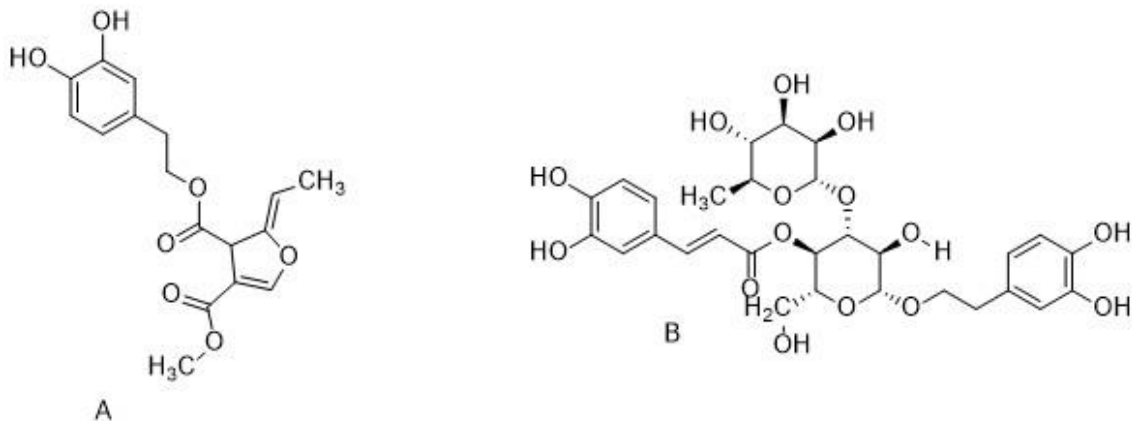


Figura I.12 – Compostos fenólicos comuns nos subprodutos da produção de azeite. oleuropeína (A) e verbascósido (B).⁴⁹

I.4.2.2 – Problemas Ambientais. Métodos de Tratamento e Valorização

Processos e tecnologias para o tratamento das ARPIA e, em alguns casos, a sua valorização, têm sido intensamente investigados nos últimos 70 anos, tendo sido revistas as principais metodologias. Estas incluem tratamento físico-químico (e.g.

filtração por membrana, coagulação-floculação), digestão aeróbica e anaeróbica, co-digestão, métodos biológicos combinados com físico-químicos e processos de oxidação (e.g. ozono/H₂O₂, UV/H₂O₂, Fenton e foto-Fenton). Apesar dos esforços dedicados ao estudo deste efluente, este ainda representa um problema ambiental que necessita de novas estratégias focadas na sua valorização e estabelecimento efetivo de processos industriais simples, práticos e sustentáveis para o efeito.^{48,56,57}

Como referido anteriormente, estas águas contêm grandes cargas orgânicas e elevadas concentrações de compostos fenólicos (0.5 a 24 g/L)⁵⁰ e açúcares. Além disso, também apresentam lípidos de cadeia longa que são tóxicos para microrganismos e plantas. O problema agrava-se pelo fato de a produção do azeite ser sazonal, implicando que os processos de tratamento sejam flexíveis o suficiente para operar em modo não-contínuo, de outra forma, a alternativa passa pelo armazenamento. Adicionalmente, os lagares de azeite são na sua maioria pequenas empresas, maioritariamente negócios familiares, tornando o tratamento individual e no local impraticável.⁵⁰

As práticas correntes aplicadas incluem descarga das ARPIA no solo, nos rios, nos lagos e mares, mas também armazenamento/evaporação em lagoas. Problemas ambientais relacionados com contaminação de solos, poluição de aquíferos, maus odores e proliferação de insetos são regularmente encontrados.⁵⁰

Os limites legais para descarga de águas residuais dispostas no Decreto-Lei nº236/98⁵⁸ relativamente a CQO e CBO é de 150 mg O₂/L e 40 mg O₂/L, respetivamente e para fenóis, o valor máximo admissível é de 0.5 mg fenol/L. Comparando com os valores indicados anteriormente, estas águas apresentam quase sempre valores muito acima do limite legal.

Processos físicos simples como diluição, evaporação, sedimentação, filtração e centrifugação, têm sido implementados no tratamento das ARPIA. Nenhum destes processos consegue por si só, reduzir a carga orgânica e toxicidade a valores aceitáveis. Normalmente, a combinação de processos físicos ou a combinação destes com unidades de coagulação/floculação ou tecnologias de adsorção, levam a remoções mais eficientes de carga orgânica. Al-Malah *et al.*⁵⁹ demonstraram que após centrifugação, o CQO foi reduzido em 21% e o CBO em 15%. Filtração adicional não eliminou o CQO, mas levou a uma redução adicional de 16% no valor de CBO. O filtrado obtido foi depois sujeito a uma etapa de adsorção em carvão ativado, com uma percentagem máxima de remoção de fenóis ca. 81% e de CBO ca. 71%, utilizando uma concentração de 21 g/L de carvão ativado.^{50,57}

A oxidação por reagente de Fenton foi aplicada por Nieto *et al.*⁶⁰, utilizando FeCl_3 como catalisador na presença de peróxido de hidrogénio. Verificou-se que a degradação de matéria orgânica (90%) e compostos fenólicos (>95%) nas ARPIA foi conseguida com boa eficiência, utilizando um rácio $[\text{FeCl}_3]/[\text{H}_2\text{O}_2]$ entre 0.02-0.04 (p/p). O pH ótimo é 3, sendo este conseguido com a adição do catalisador, bastando ter um rácio $[\text{FeCl}_3]/[\text{H}_2\text{O}_2] > 0.01$. Hodaifa *et al.*⁶¹ aplicaram o mesmo tratamento, mas em modo contínuo num reator CSTR. Ficou demonstrado que a pH 3, com tempo de residência de 3 horas, um rácio $[\text{FeCl}_3]/[\text{H}_2\text{O}_2]$ entre 0.026 - 0.058 (p/p), com uma concentração de Fe(III) 0.35-0.4 g/dm³ e à temperatura ambiente, se conseguia remover 97% da matéria orgânica e 99% dos compostos fenólicos presentes nas ARPIA.^{60,61}

Através da combinação de oxidação avançada por UV/O₃ com processos de biodegradação, Lafi *et al.*⁶² verificou que este processo leva a grandes níveis de remoção de CQO (>90%) quando comparado com outros tratamentos de único estágio sob as mesmas condições operatórias.⁶²

Sendo a compostagem um processo bioquímico de degradação aeróbica, Chowdhury *et al.*⁶³ demonstraram que a sua aplicação nas ARPIA é um processo viável para produzir composto maduro e livre de patógenos, garantindo máximos benefícios na produção de culturas. Outras alternativas de valorização têm sido recentemente descritas na literatura, envolvendo a produção de diversos produtos, designadamente adsorventes, produção⁴⁹ de antioxidantes, biopolímeros, enzimas e corantes⁵⁶ para têxteis. A sua aplicação a nível industrial carece de desenvolvimento de forma a aumentar a viabilidade económica dos processos, adicionando valor aos produtos da produção de azeite.^{56,63}

II – RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.1 – PREÂMBULO

O desenvolvimento de processos de síntese, a avaliação das propriedades fotofísicas, caracterização estrutural, métodos de purificação e aplicação de NPsC como sensores, tem sido amplamente estudado e suscitado o interesse da comunidade científica, atendendo à baixa toxicidade e elevada biodegradabilidade exibida por estes nanomateriais.

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os métodos de síntese utilizados na obtenção de NPsC provenientes de águas residuais da indústria do azeite, ao longo do texto designados por AR-2F-16, AR-2F-17 e AR-P. Estes resíduos apresentam um forte impacto para o ambiente, estando associados a vários problemas ambientais devido à sua elevada carga orgânica e baixa biodegradabilidade. A caracterização das ARPIA foi realizada por quantificação de fenóis totais, flavonóides, taninos, açúcares totais, cloretos, nitratos, cinzas, lípidos, e proteínas, e ainda por FTIR, análise elementar, CQO e CBO.

Os NPsC obtidos foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN $^1\text{H}/^{13}\text{C}$), análise elementar (AE) e microscopia electrónica de transmissão (TEM). Da diversidade de NPsC sintetizados a partir dos diferentes tipos de efluente estudados, a caracterização estrutural e morfológica apresentada diz respeito aos nanomaterias que exibiram melhores propriedades luminescentes (rendimento quântico mais elevado).

A avaliação das propriedades fotofísicas dos NPsC foi efetuada por espectroscopia de absorção no estado fundamental e luminescência no estado estacionário. O tempo de vida foi obtido para os NPsC obtidos a partir do efluente AR-2F-17.

Será ainda demonstrada a capacidade sensorial dos NPsC sintetizados, como biossensores de proteínas hémicas em solução (tampão fosfato), recorrendo a espectroscopia de fluorescência de estado estacionário como método de deteção.

II.2 – CARACTERIZAÇÃO DAS ÁGUAS RESIDUAIS DO PROCESSAMENTO INDUSTRIAL DO AZEITE

Nesta Secção serão descritas e discutidas as análises realizadas para a caracterização das ARPIA.

A composição das ARPIA depende do tipo de processo empregue na obtenção do azeite. No presente trabalho foram estudadas águas residuais provenientes de processos de extração de azeite por centrifugação de 2 fases (AR-2F), recolhidas em 2016 e 2017 e também por processo de prensagem (AR-P). As AR-P apresentaram cor negra, exibindo um teor de sólidos (TS) de 58.9 gL^{-1} , pH 4.73 (25°C) e uma condutividade de 10.89 mS cm^{-1} (15°C). As AR-2F-16 caracterizam-se por ter uma intensa turbidez e cor castanha clara, com um TS de 2.61 gL^{-1} , pH 4.65 (25°C) e uma condutividade de 0.695 mS cm^{-1} (16°C); por seu turno, as AR-2F-17 exibiram igualmente turbidez e cor castanha, com um TS bastante mais elevado (30.72 gL^{-1}), pH 4.59 (24°C) e uma condutividade de 0.226 mS cm^{-1} (24°C).

II.2.1 – Caracterização estrutural

Neste tópico serão descritos os resultados obtidos na caracterização estrutural das ARPIA (Tabela II.1 e Figura II.1 a Figura II.3).

Tabela II.1 - Caracterização por FTIR e análise elementar do resíduo obtido das águas residuais após evaporação e secagem sob vácuo a 105°C.

	$\nu_{\text{máx}}$ (KBr) / cm^{-1}	Análise Elementar (corrigida para o valor de cinzas)
AR-2F-16	3414 (m, larga, OH), 3240 (o, NH), 3007 (o, CH), 2955 (o, CH ₃), 2925 (f, CH ₂), 2855 (f, CH ₂), 1746 (f, C=O éster), 1644 (o, C=O ácidos/amidas), 1567 (m, N-H/ C=C), 1460 (m, CH ₂), 1380 (m, CH ₃), 1240, 1163, 1120, 1095 e 1035 (m, C-O).	C, 66.52%; H, 8.84%; N, 1.71% e O (calc.), 22.93%; S<0.3%.
AR-2F-17	3423 (m, larga, OH), 3395 (o, NH), 2958 (o, CH), 2925 (f, CH ₃), 2856 (f, CH ₂), 1746 (f, C=O éster), 1618 (m, C=O ácidos/amidas), 1462 (m, NH/ C=C), 1371 (m, CH ₃), 1240, 1163, 1120, 1095 e 1035 (m, C-O).	C, 60.44%; H, 7.73%; N, 0.89% e O (calc.), 30.95%; S<0.3%.
AR-P	3395 (m, larga, OH), 3260 (o, NH), 3050 (o, CH), 2965 (o, CH ₃), 2938 (f, CH ₂), 2875 (f, CH ₂), 1747 (f, C=O éster), 1570 (m, N-H/ C=C), 1458 (m, CH ₂), 1372 (m, CH ₃), 1295, 1155, 1069 e 1017 (m, C-O).	—————

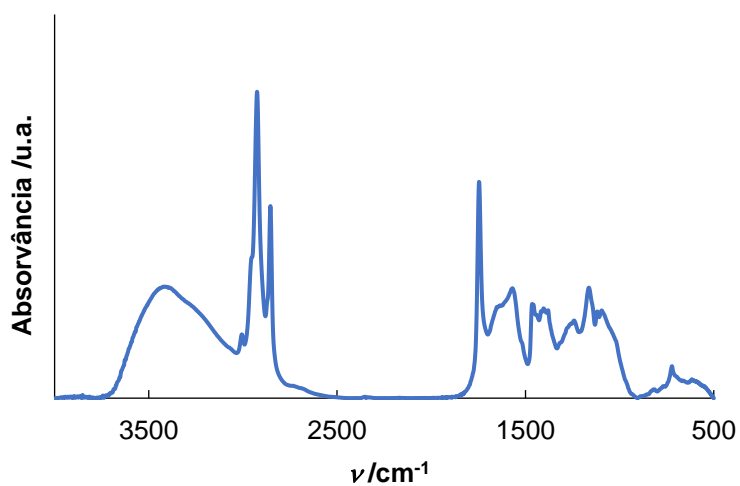


Figura II.1 - Espectro de FTIR das AR-2F-16 em pastilha de KBr.

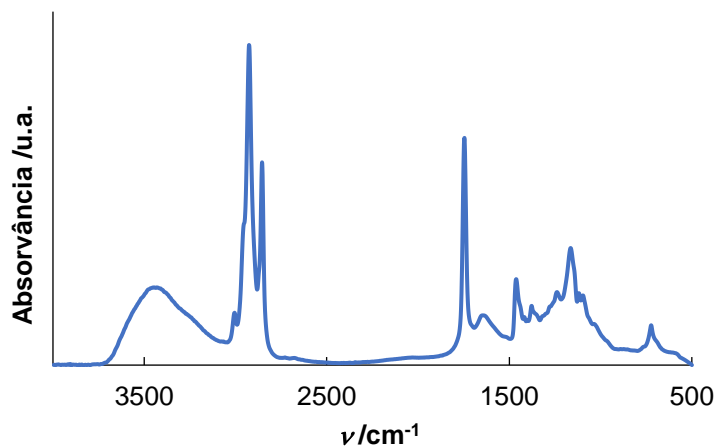


Figura II.2 - Espectro de FTIR das AR-2F-17 em pastilha de KBr.

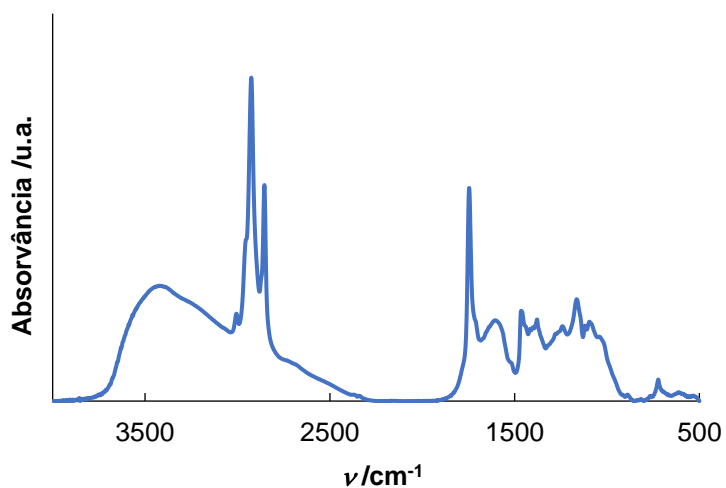


Figura II.3 - Espectro de FTIR das AR-P em pastilha de KBr.

II.2.2 – Quantificação de Compostos Fenólicos

A quantificação de compostos fenólicos, assim como flavonóides e taninos foi realizada nas diferentes amostras de ARPIA, recorrendo a métodos descritos e/ou adaptados da literatura.^{64,65,67,68}

II.2.2.1 – Quantificação de Fenóis Totais

Os fenóis totais nas ARPIA foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu.^{64,65} Este método colorimétrico baseia-se na reação entre os compostos fenólicos presentes na amostra com um complexo ácido de fosfomolibdato/fosfotungstato, resultando num complexo de cor azul com absorção a 725 nm. A quantificação de fenóis totais obtida é apresentada na Tabela II.2.

Tabela II.2 - Quantificação de fenóis totais presentes nas ARPIA.

ARPIA	Equiv. Ácido gálico (g/L ⁻¹)	Equiv. Ácido tânico (g/L ⁻¹)
Ar-2F-16	0.17	0.21
Ar-2F-17	1.75	2.27
AR-P	3.68	4.77

Dados da literatura indicam para águas residuais provenientes do processo de centrifugação, um valor de fenóis totais de 3.40 g/L⁶⁶ e para águas provenientes do processo de prensagem ca. 4.20 g/L⁶⁶ (ambos expressos em teor de sólidos). Comparando com os valores obtidos, verifica-se que as AR-2F-2016 apresentam um conteúdo de fenóis totais bastante mais baixo. Este resultado poderá ter origem no TS presente na amostra. Nas AR-P o valor de fenóis totais é similar ao descrito na literatura, embora mais baixo para o ácido gálico e superior para o ácido tânico. As ARPIA provenientes de AR-2F-2017 exibem valores mais baixos quando comparados com a referência⁶⁶.

II.2.2.2 – Quantificação de Flavonóides

A quantificação de flavonóides nas ARPIA foi realizada pelo método colorimétrico do cloreto de alumínio⁶⁷. Reações de complexação entre o catião Al³⁺ e os flavonóides presentes na amostra, originam complexos de cor amarela com absorção entre 410-430 nm.⁶⁷ Os resultados obtidos são apresentados na Tabela II.3.

Tabela II.3 - Quantificação de flavonóides presente nas ARPIA.

ARPIA	Equiv. Quercetina (g/L ⁻¹)
AR-2F-16	0.01
AR-2F-17	0.72
AR-P	0.30

A análise dos resultados mostra que a quantidade de flavonóides presente nas AR-2F-17 é muito superior às AR-2F-16. A percentagem de flavonóides nas AR-2F-17 relativamente aos fenóis totais é ca. 32% (por comparação com equiv. ácido tânico); sendo este valor bastante mais baixo nas AR-2F-16 (ca. 6.5%). O valor obtido nas AR-P foi ca. 6.1%, valor da mesma ordem de grandeza do encontrado nas AR-2F-16.

II.2.2.3 – Quantificação de Taninos

A quantidade de taninos nas ARPIA foi estimada após precipitação com pó de pele cromado, seguida de análise colorimétrica do filtrado pelo método de Folin-Ciocalteu utilizado na determinação da quantidade de fenóis totais. O teor de taninos presente nas ARPIA foi então determinado pela diferença com o valor de fenóis totais (Tabela II.4).⁶⁸

Tabela II.4 - Quantificação de Taninos presentes nas ARPIA.

ARPIA	Equiv. Ácido gálico (gL ⁻¹)	Equiv. Ácido tânico (gL ⁻¹)
AR-2F-16	0.09	0.12
AR-2F-17	1.33	1.73
AR-P	2.17	3.02

Os resultados obtidos mostram que a percentagem de taninos relativa aos fenóis totais para as AR-P (comparando com equiv. ácido tânico) é ca. 63% e para as AR-2F-16 ligeiramente menor (58%). Estes resultados demonstram que os polifenóis presentes nas AR-P têm um maior conteúdo de taninos quando comparado com as AR-2F-16. As AR-2F-17 apresentam uma quantidade de taninos na quantidade de fenóis totais muito superior comparativamente às outras amostras de ARPIA (ca. 76%).

II.2.3 – Quantificação de Açúcares

A quantificação dos açúcares totais nas ARPIA foi realizada por método espectrométrico adaptado da literatura⁶⁹, usando β -D-glucose como referência (Tabela II.5). Neste método, a adição de ácido sulfúrico promove a hidrólise dos açúcares complexos (oligo e polissacáridos) nos correspondentes monossacáridos. As unidades de pentose e hexose são posteriormente desidratadas a furfural e hidroxi-metilfurfural, respetivamente. A condensação dos produtos de desidratação com fenol origina derivados com absorção a 480-490 nm.^{69,70}

Tabela II.5 - Quantificação de açúcares totais nas ARPIA.

ARPIA	Equiv. β -D-glucose (gL ⁻¹)
AR-2F-16	0.36
AR-2F-17	8.90
AR-P	15.4

Estes resultados evidenciam um teor de açúcares nos três efluentes de ARPIA estudados muito diferente dos valores descritos na literatura⁶⁶. Nas AR-P o valor de referência é ca. 7.00 gL⁻¹⁶⁶, menos de metade do valor obtido. Para as águas obtidas do processo de centrifuga, a literatura refere ca. 2.80 gL⁻¹⁶⁶, valor superior ao obtido nas AR-2F-16, mas bastante inferior ao das AR-2F-17. Comparando a quantidade de açúcares obtida (em %TS) nos efluentes com a mesma origem (AR-2F), verifica-se que as AR-2F-16 apresentam ca. 13.71 % de TS e nas AR-2F-17 esse valor é ca. 28.96% de TS. A avaliação destes resultados mostra que o conteúdo em açúcares são uma das grandes diferenças na composição das ARPIA com a mesma origem de processamento, permitindo assim inferir, que existe uma grande flutuação na composição da matéria-prima consoante o ano de recolha.

II.2.4 – Quantificação de Lípidos

A quantificação de lípidos nas ARPIA foi realizada por extração com n-hexano, isolando os lípidos da fase orgânica por evaporação e secagem sob vácuo a T<40°C. Na Tabela II.6 encontram-se os valores obtidos.

Tabela II.6 – Quantificação dos lípidos presentes nas ARPIA.

ARPIA	Lípidos (% de TS)
AR-2F-16	16.2
AR-2F-17	26.9
AR-P	3.86

Os resultados obtidos permitem concluir que o tipo de processamento da matéria-prima na produção do azeite tem uma influência muito significativa na quantidade de lípidos presentes nas ARPIA. Os processos de centrifuga de duas fases parecem demonstrar a ocorrência de efluentes com uma composição mais rica em lípidos comparativamente aos efluentes obtidos a partir dos processos de prensa.

II.2.5 – Quantificação de Proteínas

A determinação do teor de proteínas nas ARPIA tem por base a formação de um complexo entre as proteínas presentes na amostra e o azul de Comassie, complexo com absorção a 620nm⁷¹ (Tabela II.7).

Tabela II.7 - Quantificação de proteínas nas ARPIA.

ARPIA	Equiv. BSA (gL ⁻¹)
AR-2F-16	0.09
AR-2F-17	3.81
AR-P	5.25

Os resultados obtidos são superiores aos descritos na literatura para efluentes de ARPIA da mesma natureza (em AR-P = 3.80 g/L e em águas obtidas do processo de centrífuga referenciam o valor de 2.00 g/L).⁶⁶ Contudo, o valor obtido nas AR-2F-16 é inferior à literatura⁶⁶, muito provavelmente devido ao seu TS.

II.2.6 – Quantificação de Cloretos

Dado o conteúdo de compostos inorgânicos nas ARPIA, procedeu-se à quantificação de cloretos recorrendo ao método de Mohr.⁷⁰ Este método baseia-se na quantificação de iões cloreto por titulação com nitrato de prata, resultando na precipitação de cloreto de prata. O indicador normalmente usado é o cromato de potássio, sendo o ponto final da titulação caracterizado pela precipitação de cromato de prata de cor vermelha, que se forma após o consumo dos iões cloreto pelos iões de prata.⁷⁰ Na Tabela II.8 são apresentados os valores obtidos para as ARPIA estudadas.

Tabela II.8 - Quantificação de Cloretos presentes nas ARPIA.

Tipo de efluente	Cloretos (% de TS)
AR-2F-16	4.2
AR-2F-17	2.3
AR-P	3.8

II.2.7 – Quantificação de Nitratos

A quantificação dos nitratos nas ARPIA foi realizada recorrendo ao método do ácido salicílico⁷². Neste método, uma solução de ácido salicílico em ácido sulfúrico concentrado é adicionada à amostra de ARPIA, promovendo a nitração do anel

fenólico do ácido salicílico por parte dos nitratos presentes, que após alcalinização a pH 12, origina um complexo com absorção a 410-420 nm⁷² (Tabela II.9).

Tabela II.9 – Quantificação dos nitratos presentes nas ARPIA.

ARPIA	Equiv. NaNO ₃ (% TS)
AR-2F-16	1.48
AR-2F-17	2.03
AR-P	1.51

Os efluentes objeto de estudo apresentam idêntica composição em nitratos, tendo as AR-2F-17 um valor ligeiramente superior (ca. 0.5%).

II.2.8 – Quantificação de Cinzas

A quantificação de cinzas é de extrema importância, pois define a fração inorgânica presente, contribuindo para a clarificação de alguns aspetos relacionados com a síntese dos nanopontos de carbono. As cinzas foram determinadas pelo método de Sluiter.⁷³ Na Tabela II.10 encontram-se os valores obtidos para as diferentes ARPIA estudadas.

Tabela II.10 – Quantificação de cinzas presentes nas ARPIA.

ARPIA	Cinzas (% TS)
AR-2F-16	16.8
AR-2F-17	5.15
AR-P	18.2

A Tabela II.11 reúne dados da literatura do conteúdo em cinzas em ARPIA.⁷⁴

Tabela II.11 – Percentagem de cinzas em função do TS de águas de diferentes regiões em função do processo de extração.⁷⁴

Azerraj (n=4) – processo prensa	Chemlal (n=5) – processo prensa	Sigoise (n=3) – processo prensa	Azerraj (n=7) – processo 3 fases	Chemlal (n=6) – processo 3 fases	Sigoise (n=4) – processo 3 fases
16.7 %	22.7%	32.1%	14.2%	9.76%	15.6%

O valor de cinzas obtido para as AR-P é superior ao obtido nas ARPIA da região de Azerraj e ligeiramente mais baixo comparativamente ao efluente de Chemlal e de Sigoise. Nas ARPIA provenientes do processo extrativo de duas fases, as AR-2F-17

apresentam um valor mais baixo do que as AR-2F-16. Por comparação com os valores descritos na literatura ⁷⁴ para o processo de três fases, o valor de cinzas nas AR-2F-17 é inferior, mas sempre superior nas AR-2F-16.

II.2.9 – CQO e CBO₅

A carência química de oxigênio (CQO) e a carência bioquímica de oxigênio (CBO₅) foram determinados por métodos reportados.⁷⁵ A sua quantificação permitiu estudar a biodegradabilidade dos efluentes objeto de estudo. Na Tabela II.12 são apresentados os valores obtidos.

Tabela II.12 – Valores obtidos de CQO, CBO₅ e biodegradabilidade para as ARPIA.

ARPIA	CQO (gO ₂ L ⁻¹)	CBO ₅ (gO ₂ L ⁻¹)	CBO ₅ /CQO
AR-2F-16	5.2	3.5	0.7
AR-2F-17	112.5	42.5	0.4
AR-P	83.9	18.5	0.2

Da análise dos resultados obtidos, verifica-se que as AR-2F-17 e as AR-P apresentam uma baixa biodegradabilidade; por outro lado, as AR-2F-16 revelam um valor de CBO₅ muito mais próximo do valor de CQO.

II.2.10 – Composição sumativa das águas

A Tabela II.13 reúne os resultados da quantificação das características físico-químicas determinadas para as ARPIA em análise.

Tabela II.13 – Características Físico-Químicas das ARPIA.

Parâmetro	AR-2F-16	AR-2F-17	AR-P
pH	4.7 (25°C)	4.6 (24°C)	4.7 (25°C)
Condutividade (mS/cm) a [TS] = 2.61 g/L	0.7 (16°C)	0.2 (24°C)	10.5 (15°C)
Sólidos Totais (TS) (g/L)	2.6	30.7	58.9
Cinzas (% de TS)	16.8	5.2	18.2
CQO (g O ₂ /L)	5.2	113	83.9
CBO ₅ (g O ₂ /L)	3.5	42.5	18.5

Na Tabela II.14 são apresentados os resultados globais da quantificação da composição orgânica das ARPIA objeto de estudo.

Tabela II.14 – Composição Orgânica aproximada das ARPIA.

Parâmetro	Ar-2F-16 ^{a)}	AR-2F-17 ^{a)}	AR-P ^{a)}
Fenóis Totais (equiv. ácido gálico)	6.3	5.7	6.3
(equiv. ácido tânico)	8.2	7.4	8.1
(equiv. vanilina)	15.8	-	15.6
Flavonóides (equiv. quercetina)	0.5	2.4	0.5
Taninos (equiv. ácido gálico)	3.4	4.3	3.7
(equiv. ácido tânico)	4.7	5.6	5.1
(equiv. vanilina)	8.0	-	8.8
Açúcares totais (equiv. D-glucose)	13.7	29.0	26.2
Proteínas (equiv. BSA)	3.3	12.4	8.9
Lípidos	16.2	26.9	3.8

a) Valores expressos em percentagem de TS de efluente.

Das análises efetuadas, foi possível quantificar ca. 60% de matéria orgânica nas AR-2F-16 e valor similar foi encontrado nas AR-P (ca. 65%). Nas AR-2F-17 o valor é ligeiramente superior (80%). Verificou-se também que as variações na composição das águas residuais provenientes do mesmo processo extrativo são consideráveis.

II.3 – SÍNTESE DE NANOPONTOS DE CARBONO (NPsC) A PARTIR DE ARPIA

Nesta Secção serão apresentados e discutidos os métodos de síntese empregues na obtenção de NPsC a partir de ARPIA com origem em processos extrativos distintos, designadas ao longo do texto por AR-2F-16, AR-2F-17 e AR-P.

A caracterização estrutural e ótica dos NPsC será igualmente descrita e os resultados racionalizados com o método empregue na sua preparação, correlacionando a fonte de matéria-prima vs. condições reacionais, com as propriedades exibidas pelos nanomateriais.

Os rendimentos quânticos apresentados foram determinados utilizando sulfato de quinino em H_2SO_4 0.01M como padrão (*vide* II.2 da Parte Experimental).

II.3.1 – NPsC obtidos a partir de AR-2F-16

As AR-2F-16 foram usadas como fonte de carbono na preparação dos NPsC por tratamento hidrotérmico recorrendo a aquecimento clássico.

II.3.1.1 – Síntese

Tipicamente, o vaso do reator foi carregado com uma amostra de AR-2F-16 (a escala dos ensaios variou entre ca. 60 ou 120 mL) na presença ou ausência de aditivo (etilenodiamina, ED) e a mistura reacional sujeita a tratamento hidrotérmico a uma dada temperatura durante um período pré-definido. Um dos parâmetros de importância relevante é a temperatura, quer no rendimento mássico, quer na natureza dos NPsC, designadamente nas suas propriedades luminescentes (Tabela II.15). Apresentam-se na tabela seguinte os ensaios onde se utilizaram ca. 120 mL de AR-2F-16 e 27.5 μL de ED, cuja mistura foi sujeita a tratamento hidrotérmico durante 8 horas e com velocidade de agitação de 180 rpm.

Tabela II.15 - Efeito da Temperatura no Rendimento Quântico e Rendimento Mássico dos NPsC.

Ensaio	Temp ^a (°C)	Pressão (bar)	$\phi_F^{a)}$	% Mássica NPsC
NPsC-AR-2F-16-I	150	5	0.04	49.8
NPsC-AR-2F-16-II	200	15	0.12	45.4
NPsC-AR-2F-16-III	250	40	0.42	39.7
NPsC-AR-2F-16-IV	300	85	0.08	24.4

a) $\lambda_{exc}=340$ nm.

Para além da temperatura, o efeito do tempo de reação nas características dos NPsC obtidos foi também avaliado. Nesse sentido, realizaram-se vários ensaios utilizando uma carga de 60 mL de AR-2F-16, 13.8 uL de ED a 250°C, pressão de 40 bar e sem agitação, fazendo variar o tempo de residência da mistura reacional no reator. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela II.16.

Tabela II.16 - Efeito do Tempo nas Características dos NPsC obtidos por Tratamento Hidrotérmico das AR-2F-16.

Ensaio	Tempo (h)	$\phi_F^{a)}$	% Mássica de NPsC
NPsC-AR-2F-16-V	2	0.17	41.4
NPsC-AR-2F-16-VI	4	0.22	46.5
NPsC-AR-2F-16-VII	6	0.28	39.1
NPsC-AR-2F-16-VIII	8	0.34	39.5
NPsC-AR-2F-16-IV	12	0.15	31.0

a) $\lambda_{exc}=340$ nm.

Tal como referido anteriormente, os NPsC também podem ser obtidos sem adição de ED. Assim, realizaram-se ensaios, quer na ausência destes aditivos, bem como recorrendo à utilização de aditivos alternativos à ED. As reações foram realizadas utilizando condições típicas: ca. 120 mL de AR-2F-16, temperatura de 250°C a uma pressão de 40 bar, durante 8 horas (Tabela II.17).

Tabela II.17 - Efeito da Natureza do Aditivo nas Características dos NP_sC obtidos.

Ensaio	Aditivo	mmol/g TS	$\phi_F^{a)}$	% Mássica de NP _s C
NP _s C-AR-2F-16-X	-	-	0.087	40.2
NP _s C-AR-2F-16-XI	ureia	1.3	0.069	41.8
NP _s C-AR-2F-16-XII	NaOH	1.0	0.065	33.7
NP _s C-AR-2F-16-III	ED	1.3	0.42	39.7

a) $\lambda_{exc}=340$ nm.

Os resultados obtidos permitem inferir que dos aditivos testados vs. ausência de aditivo, o tratamento hidrotérmico das AR-2F-16 na presença de ED produziu NP_sC com melhor rendimento quântico. Assim, foram realizados ensaios adicionais onde se fez variar a quantidade de ED, mantendo as restantes condições operatórias (Tabela II.18).

Tabela II.18 - Efeito da Quantidade de ED nas Características dos NP_sC obtidos.

Ensaio	mmol ED/g TS	$\phi_F^{a)}$	% Mássica de NP _s C
NP _s C-AR-2F-16-III	1.3	0.42	39.7
NP _s C-AR-2F-16-XIII	2.6	0.33	46.0
NP _s C-AR-2F-16-XIV	5.2	0.15	46.7

a) $\lambda_{exc}=340$ nm.

Da avaliação dos resultados alcançados é possível concluir que os NP_sC com melhores características ($\phi_F = 0.42$ e rendimento mássico de ca. 40%) foram sintetizados a partir das AR-2F-16 por tratamento hidrotérmico na presença de 1.3 mmol de ED/g TS.

Foi ainda realizado um ensaio suplementar ao anteriormente mencionado, utilizando uma velocidade de agitação duas vezes superior (ca. 360 rpm). Os NP_sC produzidos apresentaram rendimento quântico inferior (ca. 0.30).

II.3.1.2 – Propriedades Fotofísicas dos NP_sC

As propriedades fotofísicas dos NP_sC foram estudadas por espectroscopia de absorção de estado fundamental (UV-Vis) e fluorescência de estado estacionário (excitação e emissão) de dispersões aquosas de NP_sC. Os espectros que de seguida

se apresentam correspondem aos NPsC anteriormente referidos, os quais apresentaram maior rendimento quântico de fluorescência (Figura II.4).

O espectro de UV-Vis exibe bandas bem definidas a ca. 239, 273 e 320 nm, sendo as de maior energia atribuíveis a transições $\pi-\pi^*$ do centro de carbono (rede C-sp²) e a comprimentos de onda mais elevados, transições n- π^* ou mistura de transições n- π^* e $\pi-\pi^*$ relacionadas com as funcionalidades (e.g. C=O, amidas/ácidos) covalentemente ligadas à superfície da matriz de carbono. Dispersões aquosas dos NPsC (0.1 mg/mL) quando excitadas a 340 nm, emitem no azul (Figura II.4) com um $\lambda_{em\ max}$ centrado a ca. 410 nm, com um desvio de Stokes de 0.85 eV (90 nm) e uma largura de banda a meia altura (LBMA) de 0.54 eV (74 nm). O espectro de excitação (monitorizado a 410 nm) mostra que os cromóforos com maior contribuição na emissão dos NPsC, apresentam transições eletrônicas a 242 e 336 nm, sendo este último claramente predominante.

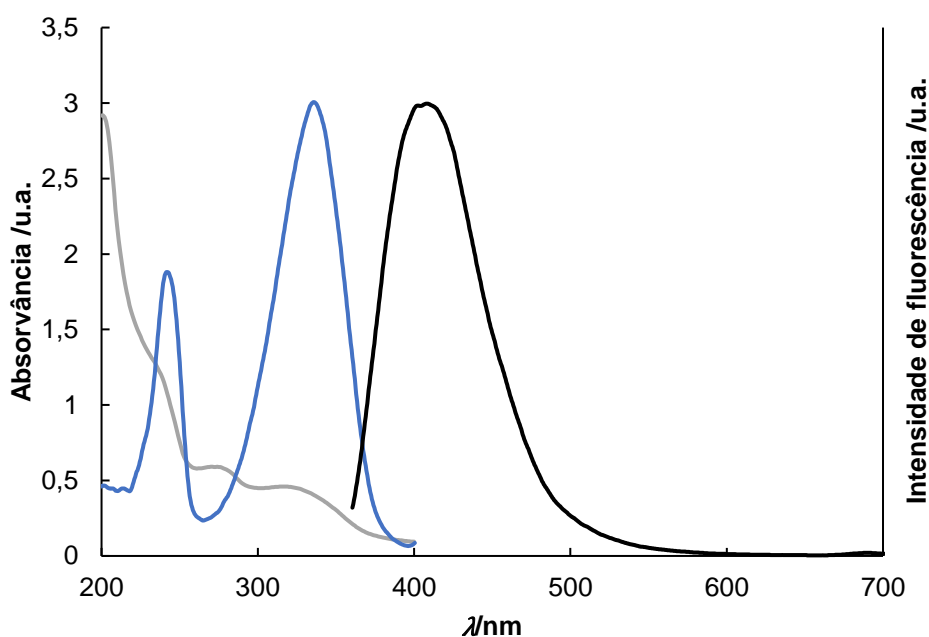


Figura II.4 - Espectros de UV-Vis (linha cinza), emissão (linha preta; $\lambda_{exc}=340$ nm) e excitação (linha azul; monitorizado a 410 nm) de dispersão aquosa de NPsC (0.1 mg/mL), obtidos das AR-2F-16.

É conhecido em muitos NPsC, particularmente naqueles em que as propriedades luminescentes não dependem de espécies moleculares (embebidas na rede de carbono ou ligadas à superfície), da forte dependência do máximo de emissão com o

comprimento de onda de excitação (λ_{exc}). Esta propriedade torna os NPsC materiais de grande interesse em diferentes áreas de aplicação por apresentarem máximos de emissão ajustáveis. Excitação entre 250-340 nm origina perfis de emissão idênticos, com aumento de intensidade ao longo do intervalo, com a intensidade mais alta a 410 nm. Por outro lado, a irradiação dos NPsC com menores energias, principalmente com comprimentos de onda superiores a 380 nm, origina desvios significativos para o vermelho, acompanhados de intenso hipocromismo. Por exemplo, quando excitados a 420 nm, a emissão exibe o seu máximo a 485 nm, com o corte da emissão a ocorrer a 700 nm (Figura II.5).

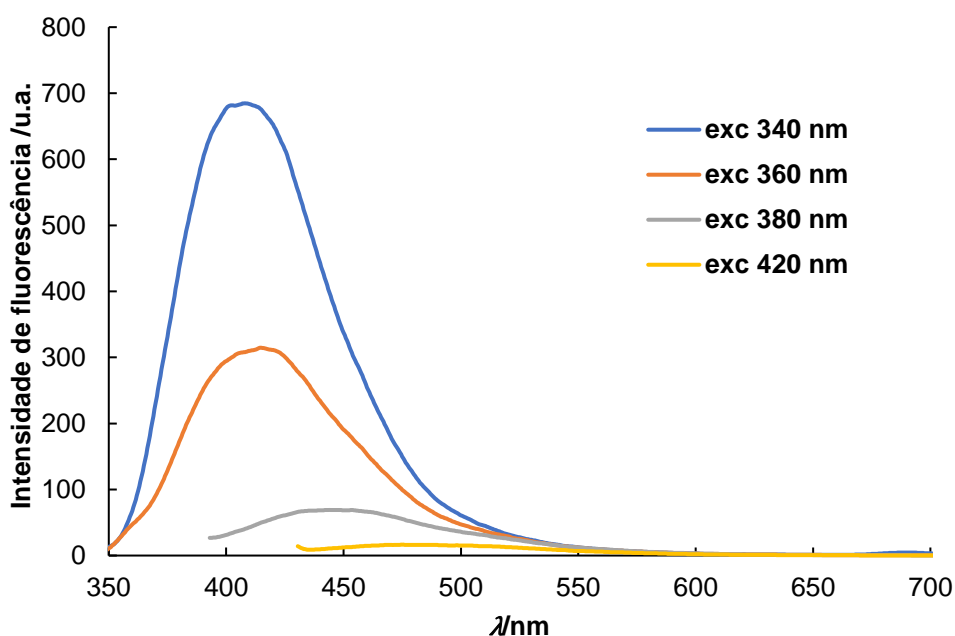


Figura II.5 - Espectros de emissão de dispersões aquosas de NPsC (0.1 mg/mL) com excitação a diferentes comprimentos de onda (340 a 420 nm), obtidos das AR-2F-16.

Refira-se que o rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F) dos NPsC sintetizados foi de 0.42 quando determinado a $\lambda_{exc} = 340$ nm, diminuindo para ca. 0.20 ao λ_{exc} de 380 nm.

Outras condições operatórias adiantes apresentadas, em que se utilizou o mesmo efluente (AR-2F-16) na síntese de NPsC, produziram nanomateriais cujo rendimento quântico de fluorescência foi da mesma ordem de grandeza ($\phi_F = 0.35$).

O efeito do pH na luminescência dos NPsC foi também avaliado fazendo variar o pH da dispersão aquosa de NPsC (0.1 mg/mL, pH inicial 5.63) de 1 a 12, através da adição

de soluções aquosas de HCl e NaOH, mantendo a concentração inicial da dispersão de NPsC (Figura II.6).

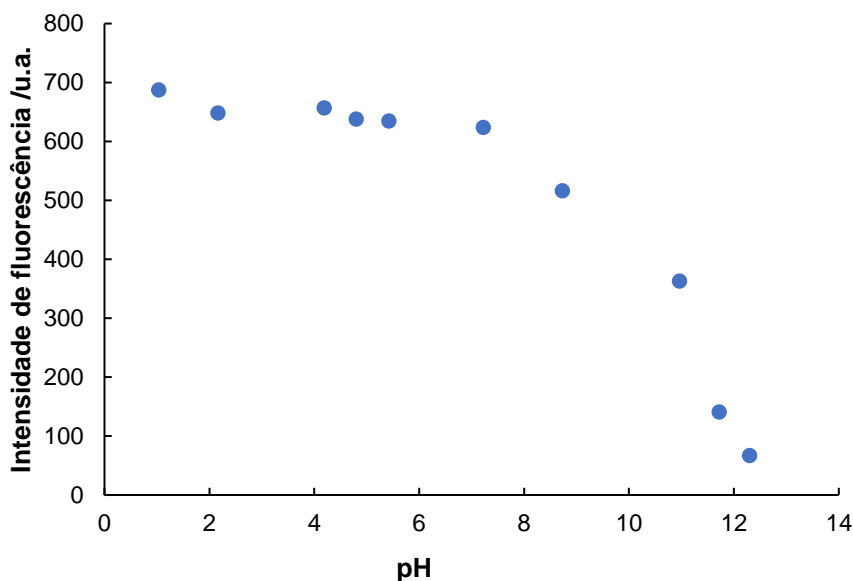


Figura II.6 - Variação da fotoluminescência ($\lambda_{exc} = 340$ nm; monitorizando o $\lambda_{em} = 407$ nm) de dispersão aquosa de NPsC, obtidos das AR-2F-16 (0.1 mg/mL) em função do pH.

Verificou-se que após excitação da dispersão aquosa a 340 nm, a emissão de fluorescência ($\lambda_{em\ max} = 407$ nm) se manteve constante para valores de pH entre 1.0 e 7.5, decrescendo a partir deste último, até alcançar ca. 10% da intensidade inicial a pH de 12.3. Os perfis de emissão apresentados na Figura II.7, demonstram que as bandas de emissão não apresentam alterações até pH 11, surgindo a partir deste valor desvios batocrômicos (5 e 14 nm a pH 11.7 e 12.7, respetivamente). Estes resultados demonstram a sensibilidade dos NPsC sintetizados a variações do pH do meio. O ajuste subsequente dos valores de pH 11.0 para 7.3 ou de pH 11.7 para 1.4, revelaram a recuperação da intensidade de luminescência em 85% do valor inicial. Este comportamento é consistente com os sucessivos equilíbrios ácido/base que se estabelecem durante variações de pH do meio, alterações essas que envolvem as funcionalidades ácidas presentes na superfície dos NPsC.

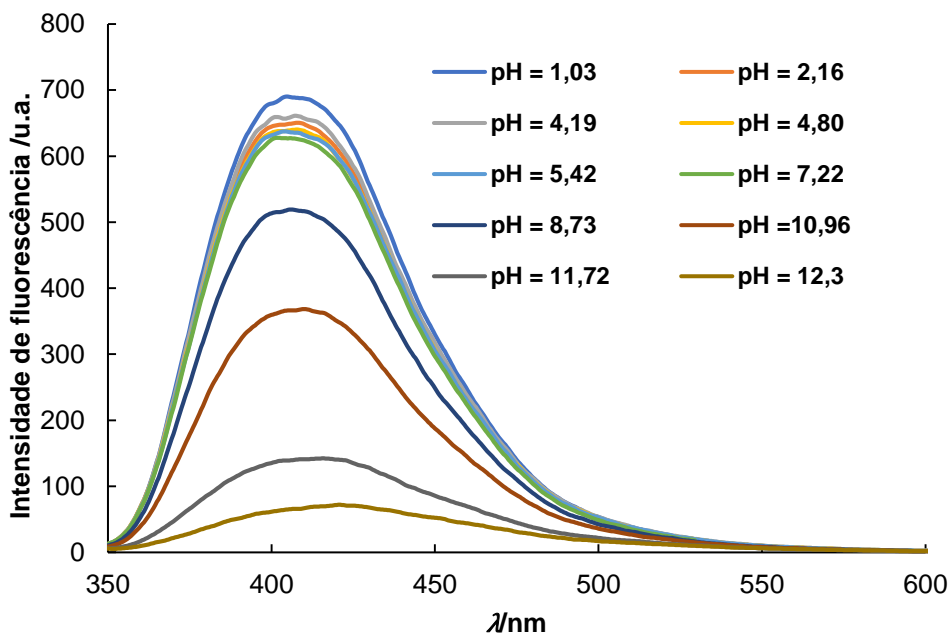


Figura II.7 – Variação da Intensidade de emissão com o pH.

A fotoestabilidade da dispersão aquosa dos NPsC (0.1 mg/mL; pH=5.63) foi confirmada sobre condições de irradiação contínua de UV ($\lambda_{exc}=340$ nm). O ensaio efetuado demonstrou que até ca. de cinco horas de irradiação contínua, a perda de intensidade de fluorescência (monitorizada a 407 nm) é nula (Figura II.8).

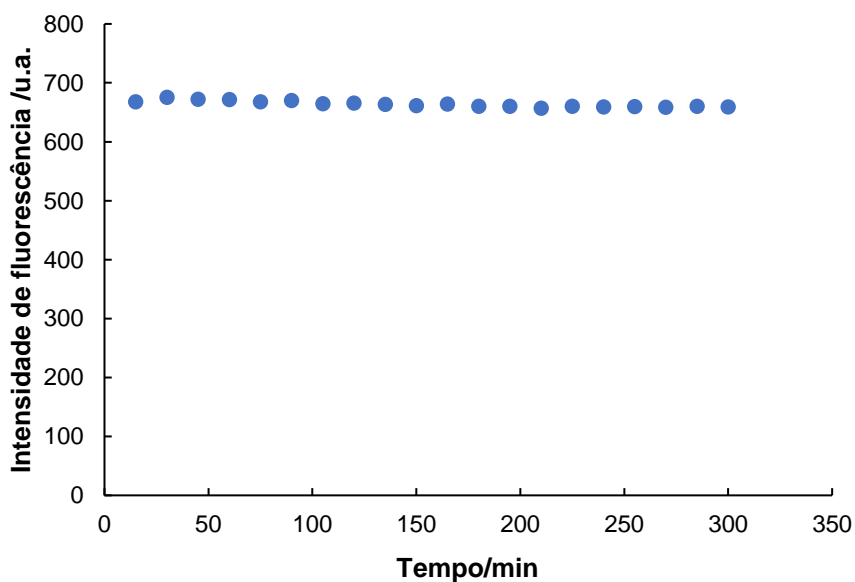


Figura II.8 - Variação da intensidade de fluorescência (monitorizada a 407 nm) de uma dispersão aquosa (0.1 mg/mL; pH=5.63) de NPsC após irradiação contínua ($\lambda_{exc}=340$ nm) usando uma lâmpada de descarga de Xénon pulsado (potência média 7.3 W a 50 Hz).

II.3.1.3 – Caracterização Estrutural

A caracterização estrutural dos NPsC com maior rendimento quântico de fluorescência sintetizados a partir de AR-2F-16 foi realizada por FTIR, RMN (^1H e ^{13}C) e análise elementar.

A análise elementar obtida para os NPsC após correção para cinzas (28.5%) foi de C, 54.76%; H, 6.68%; N, 4.20% e O (calculado), 34.37%. Comparando com os valores obtidos para as AR-2F-16, o rácio molar N/C e O/C aumenta de 0.022 para 0.066 e de 0.26 para 0.47, respetivamente, o que significa que tanto o conteúdo em azoto como em oxigénio, aumenta significativamente nos NPsC. O rácio H/C decresce, mas em pequena extensão (1.58 para 1.45), assim como o rácio O/N (11.7 para 7.2).

O espectro de FTIR (Figura II.9) revela que as bandas predominantes se encontram a 3420, 3245, 2963, 2858, 1655, 1568, 1410, 652 e 618 cm^{-1} . Comparando com o FTIR das AR-2F-16, a matéria-prima empregue na produção dos NPsC em análise (*vide* Secção II.2.1), verifica-se que as bandas correspondentes à ligação OH e NH (3650-3100 cm^{-1}) aumentam de intensidade, contrariamente às correspondentes à presença de compostos alifáticos (3030-2800 cm^{-1} , CH), as quais apresentam um claro decréscimo, acompanhado com o desaparecimento da banda correspondente a grupos éster (1746 cm^{-1}). O aparecimento de novas bandas, designadamente a 1655 e 1568 cm^{-1} , foram atribuídas a vibrações de ácidos/carboxilatos e amidas.

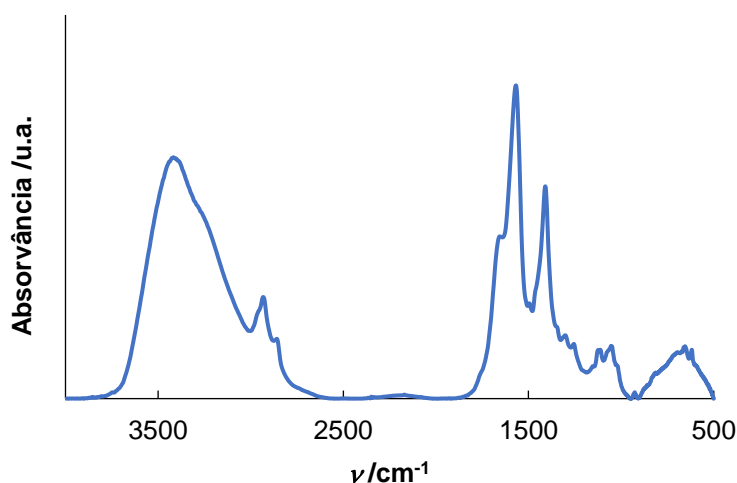


Figura II.9 - Espectro de FTIR dos NPsC obtidos das AR-2F-16 em pastilha de KBr.

O espectro de RMN foi obtido tendo como principal objetivo identificar tentativamente quais as funcionalidades dominantes e/ou tipologias de carbono na superfície dos NPsC. O RMN ^1H dos NPsC (Figura II.10) mostra sinais correspondentes a CH alifático situados entre 0.8-2.5 ppm, enquanto que os sinais que surgem entre 3.25-4.25 ppm podem estar associados a ligações CH-N e CH-O. Os sinais que aparecem no intervalo 6.5-8.6 ppm foram atribuídos a prótons arílicos.

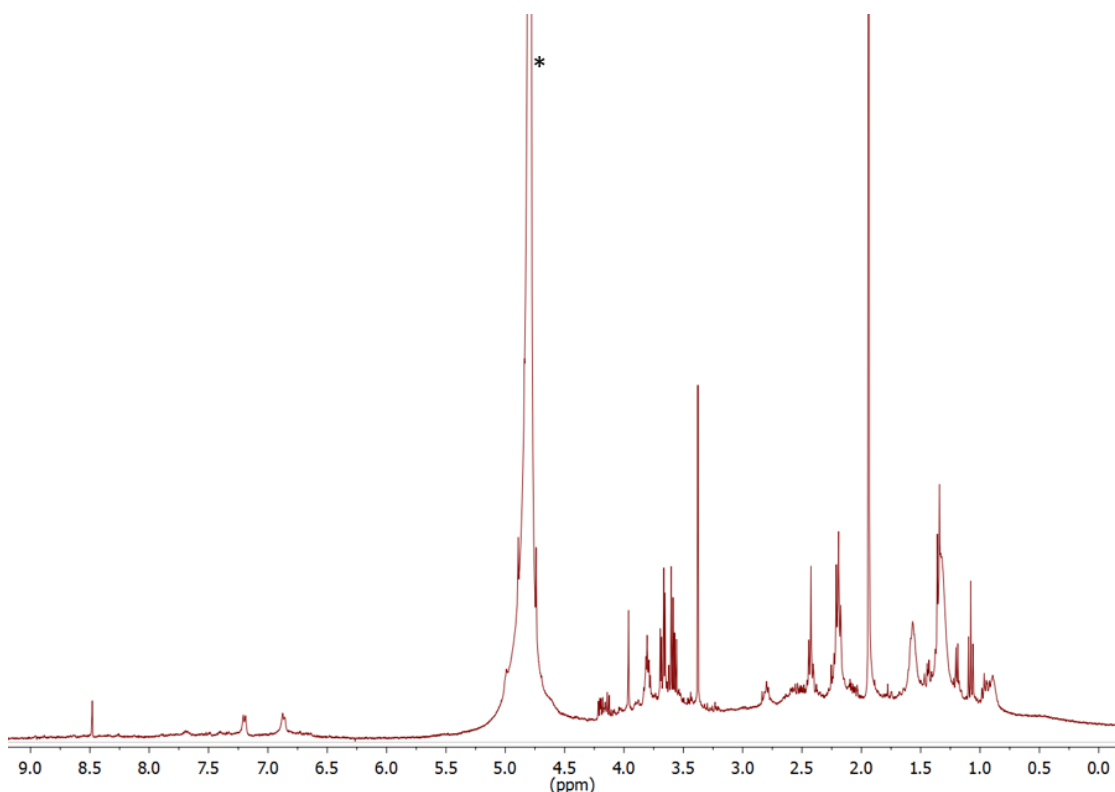


Figura II.10 - Espectro de RMN ^1H dos NPsC obtidos das AR-2F-16 (D_2O); *sinal do solvente D_2O .

Os sinais observados no RMN ^{13}C (Figura II.11) são de fraca intensidade. Contudo, três regiões podem ser distinguidas: 20-40 ppm correspondente a C-H alifáticos, 50-75 ppm atribuíveis a C-sp^3 presentes em estruturas C-H-N e C-H-O e ainda ressonâncias ca. 120-145 ppm e 180 ppm que podem estar relacionadas com C-sp^2 de carbonos arílicos e olefínicos, e carbonos quaternários de grupos carboxílicos/carboxilato, fenóis/fenolatos, estruturas quinóides e amidas, respetivamente.

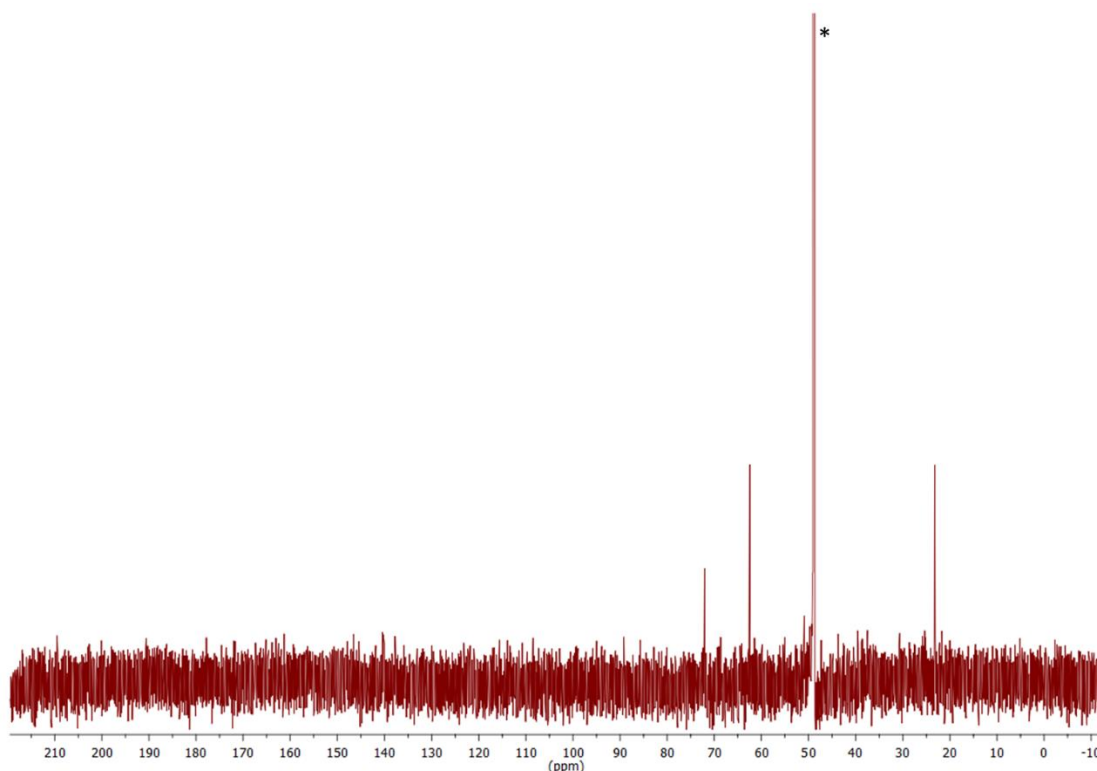


Figura II.11 - Espectro de RMN ^{13}C dos NPsC obtidos das AR-2F-16 (MeOD); *sinal do solvente MeOD.

II.3.1.4 – Caracterização Morfológica

Para obter uma caracterização morfológica dos NPsC sintetizados foi realizada análise de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de dispersões aquosas dos nanomateriais (Figura II.12).

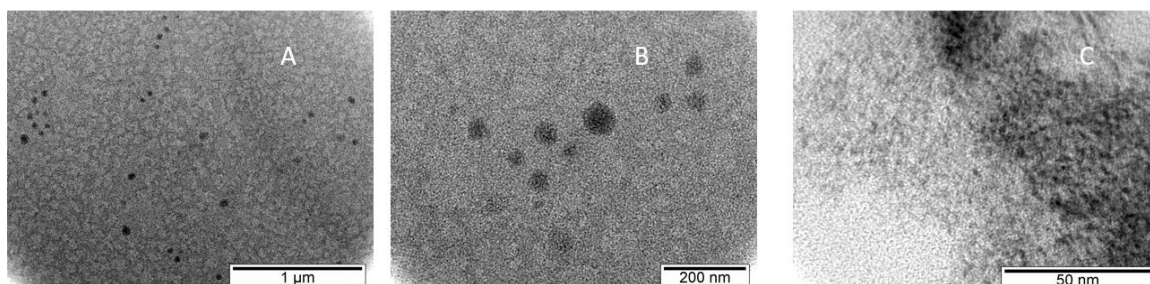


Figura II.12 - Imagens de TEM (microscopia eletrônica de transmissão) dos NPsC.

Verificou-se que dispersões aquosas de NPCs numa concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura II.12 C) se verificava a formação de agregados compreendendo partículas de tamanhos inferiores a 2.5 nm. A presença de partículas maiores, ou aglomerados, de

diâmetros até 75 nm foram observadas (Figura II.12 A e B) para concentrações mais elevadas (100 µg/mL) dos NPsC.

Os resultados obtidos por TEM demonstraram a presença de NPsC com tamanhos inferiores a 10 nm obtidos por tratamento hidrotérmico de ARPIA (AR-2F-16). Verificou-se ainda uma natural tendência para ocorrência de agregação das nanopartículas no estado sólido, mesmo para soluções aquosas bastante diluídas (25 µg/mL).

II.3.2 – NPsC obtidos a partir de AR-P

Conforme os estudos apresentados na obtenção de NPsC a partir AR-2F-16 descritos em II.3.1, ensaios idênticos foram realizados a partir de um efluente gerado num processo de extração de prensa (AR-P).

II.3.2.1 – Síntese

Dada a diferença de TS existente entre as AR-2F-16 e as AR-P, foram realizados ensaios de forma a avaliar a influência do TS nos NPsC e ainda se a diluição das AR-P recorrendo a AR-2F-16 como “solvente”, se refletia nas características luminescentes dos NPsC obtidos. Na Tabela II.19 encontram-se os resultados obtidos dos NPsC sintetizados por tratamento hidrotérmico de AR-P na presença de AR-2F-16 (carga do reator com $V_{total} = 60$ mL) a 250 °C ($P = 40$ bar), utilizando um rácio de ED/TS de 0.08 e tempo de reação de 8 horas.

Tabela II.19 – Efeito da adição de AR-2F-16 no Rendimento dos NPsC obtidos a partir de AR-P.

Ensaio	AR-P (mL)	AR-2F-16 (mL)	ϕ_{F-2}	% Mássica de NPC
NPsC-ARP- I	2.66	0	10.7	54.5
NPsC-ARP- II	13.3	0	10.2	39.1
NPsC-ARP-III	13.3	46.7	14.5	38.4

a) $\lambda_{exc}=340$ nm.

Da análise dos resultados obtidos para os NPsC sintetizados, verificou-se que o ϕ_F é melhorado com a adição de AR-2F-16 à m.r., embora bastante inferior ao alcançado pelos NPsC sintetizados a partir de AR-2F-16; no entanto, o rendimento mássico foi similar.

II.3.2.2 – Propriedades Fotofísicas e Caracterização Estrutural

As propriedades fotofísicas dos NPsC com maior rendimento quântico de fluorescência obtidos a partir de AR-P foram avaliadas a partir de dispersões aquosas (0.1 mg/mL), por espectroscopia de absorção no estado fundamental (UV-Vis) e por fluorescência de estado estacionário (excitação e emissão). O espectro de absorção exibe uma banda predominante a ca. 275 nm (Figura II.13), sendo a banda responsável pela emissão máxima a que se encontra a ca. 335 nm.

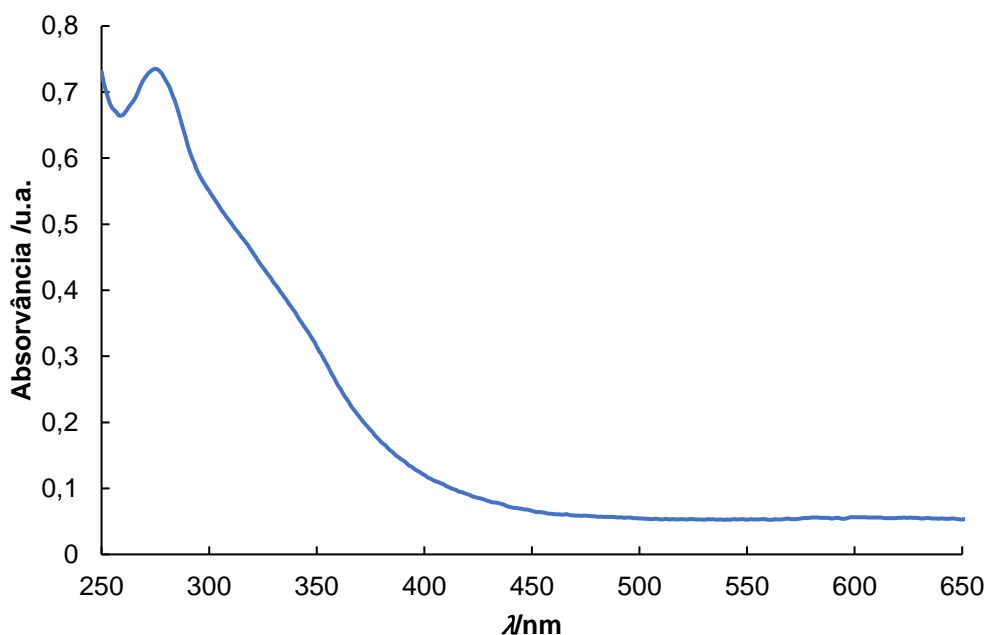


Figura II.13 - Espectro de UV-Vis de uma dispersão aquosa de NPsC (0.1 mg/mL) obtidos das AR-P.

A dispersão dos NPsC quando excitada a 340 nm (Figura II.14), exibe um $\lambda_{em\ max}$ centrado a ca. 420 nm, com um desvio de Stokes de 0.75 eV (85 nm) e uma LBMA de 0.63 eV (90 nm).

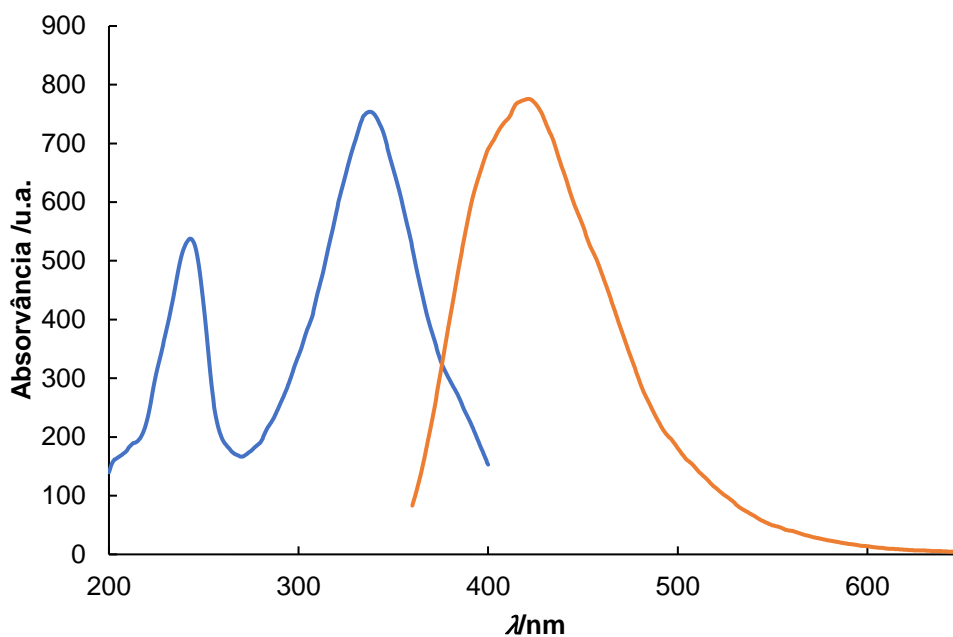


Figura II.14 - Espectro de emissão (linha laranja; $\lambda_{exc} = 340$ nm) e de excitação (linha azul; monitorizado a 420 nm) de uma dispersão aquosa de NPsC (0.1 mg/mL), obtidos das AR-P.

Os NPsC sintetizados a partir das AR-P apresentam bandas características no FTIR a 3429, 3252, 3005, 2926, 2845, 1655, 1566, 1458, 1164, 722 e 619 cm^{-1} , mostram um aumento das bandas correspondentes a ligações OH e NH (3650-3100 cm^{-1}) e a diminuição de intensidade das bandas atribuíveis aos componentes alifáticos (3030-2800 cm^{-1} , CH) e ainda o desaparecimento da banda correspondente a grupos éster (1741 cm^{-1}), comparativamente à matéria-prima. A presença de bandas respeitantes a ácidos/carboxilatos e amidas (bandas a 1655, 1566 e 1458 cm^{-1}) estão também presentes (Figura II.15).

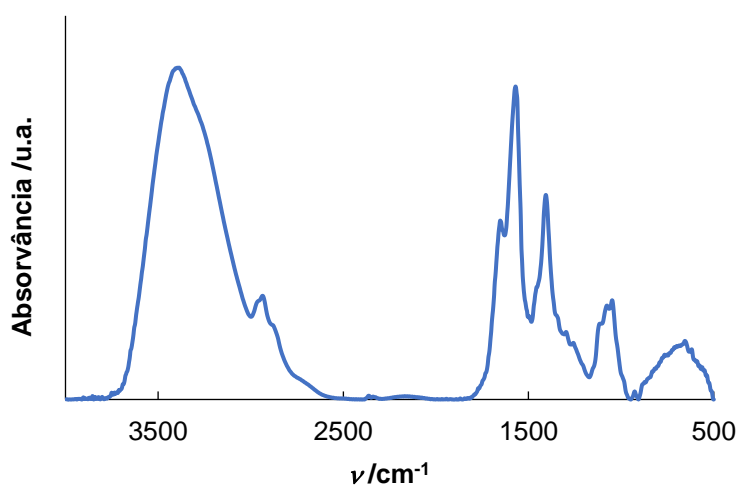


Figura II.15 – Espectro de FTIR dos NPsC, obtidos das AR-P em pastilha de KBr.

II.3.3 – NPsC obtidos a partir de AR-2F-17

Na presente Seção serão apresentados os resultados obtidos na síntese dos NPsC produzidos a partir de AR-2F-17 e comparados com os NPsC sintetizados a partir de AR-2F-16 e AR-P já discutidos na presente dissertação.

II.3.3.1 – Síntese

Como mencionado anteriormente, independentemente do processo extrativo aplicado na produção do azeite, a variabilidade encontrada na composição das ARPIA, poderá ter um impacto relevante nas características dos NPsC obtidos por tratamento hidrotérmico. Na Seção II.2 foram avaliados diferentes parâmetros, nomeadamente o teor de açúcares e proteínas presentes em ARPIA obtidas pelo mesmo processo extrativo (extração de duas fases), mas recolhidas em anos diferentes (AR-2F-16 e AR-2F-17). Verificou-se um maior conteúdo de açúcares e proteínas nas AR-2F-17, contrastando com o valor de cinzas que é menor. Adicionalmente, as AR-2F-17 demonstraram um TS muito superior (30.72 g/L), assim como os níveis de CQO e CBO₅ (112.5 gO₂/L e 42.5 g/L, respetivamente; biodegradabilidade = 0.38).

As condições operatórias iniciais empregues na produção dos NPsC por tratamento hidrotérmico a partir das AR-2F-17 foram as que produziram os melhores NPsC a partir das AR-2F-16. Contudo, o resultado obtido a partir deste efluente, conduziu a um baixo rendimento quântico de fluorescência ($\phi_F = 0.08$).

Na tentativa de explorar a potencialidade deste efluente na produção de NPsC com características satisfatórias, foram realizados outros ensaios onde se variaram alguns parâmetros reacionais, nomeadamente a temperatura, utilizando um TS de 2.6 g/L, um rácio ED/TS de 0.16 e mantendo a m.r. durante 8 horas no reator (Tabela II.20).

Tabela II.20 - Efeito da Temperatura no Rendimento Quântico e Rendimento Mássico dos NPsC.

Ensaio	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	ϕ_F^c	% Mássica de NPsC
NPsC-AR-2F-17-I ^{a)}	150	5	0.074	23.9
NPsC-AR-2F-17-II	200	15	0.148	30.3
NPsC-AR-2F-17-III	250	40	0.131	58.0
NPsC-AR-2F-17-IV ^{b)}	300	85	0.032	55.4

a) Reação de 12 horas.

b) Reação com TS de 30.72 g/L e rácio ED/TS de 0.25.

c) $\lambda_{exc}=340$ nm.

As condições testadas parecem mostrar que para o mesmo tempo de reação, o aumento de temperatura de 200°C para 250°C tem um impacto negativo no rendimento quântico. Variando o tempo de reação para 4 horas e 12 horas, foram obtidos ϕ_F de 0.148 e 0.163, respetivamente.

Considerando que a presença de oxigénio pudesse refletir-se negativamente na qualidade dos NPsC obtidos por tratamento hidrotérmico, foram realizados ensaios com as AR-2F-17 sob atmosfera de azoto. Realizou-se um ensaio durante 12 horas a 200°C, com um rácio ED/TS de 0.16, tendo sido obtidos NPsC com um rendimento quântico de 0.156, resultado surpreendente quando comparado com dados reportados na síntese de NPsC utilizando glicerol por Lai *et al.*⁷⁶, que refere que não observa formação de NPsC sob condições inertes (N₂), inferindo que oxigénio atmosférico é fundamental para a síntese destes materiais.⁷⁶ Mantendo a atmosfera de N₂ foram realizados ensaios adicionais, variando alguns parâmetros reacionais, designadamente o rácio ED/TS e o tempo de reação (Tabela II.21).

Tabela II.21 - Síntese de NPsC a partir de AR-2F-17 sob N₂ e TS de 2.6 g/L.

Ensaio	Temp (°C) ^a	Tempo (h)	ϕ_F^a	Rácio ED/TS
NPsC-AR-2F-17-V	200	12	0.22	0.08
NPsC-AR-2F-17- VI	250	12	0.12	0.08
NPsC-AR-2F-17- VII	200	12	0.16 ^b	0.16
NPsC-AR-2F-17- VIII	200	12	0.06	0.32
NPsC-AR-2F-17- IX	200	2	0.20	0.08
NPsC-AR-2F-17- X	200	4	0.25	0.08

a) $\lambda_{exc}=360$ nm.

b) $\lambda_{exc}=340$ nm.

Os resultados obtidos parecem mostrar que o melhor rácio ED/TS para obtenção de NPsC com maior rendimento quântico a partir das AR-2F-17 é idêntico ao utilizado na obtenção dos NPsC a partir de AR-2F-16, embora com menor tempo de reação (4h) e temperatura de 200°C.

Sendo a utilização do efluente direto, sem qualquer tipo de tratamento ou diluição, um dos objetivos do trabalho, realizaram-se ensaios a 200°C, com o TS das AR-2F-17 ca. 30.72 g/L como concentração inicial da reação e atmosfera positiva de N₂ (2 bar). A Tabela II.22 reúne as condições reacionais estudadas, assim como o rendimento quântico e rendimento mássico dos NPsC produzidos.

Tabela II.22 – Influência do Tempo de Reação e Rácio ED/TS no Rendimento Quântico e Rendimento Mássico dos NPsC.

Ensaio	Tempo (h)	Rácio ED/TS	ϕ_F^a	% Mássica de NPsC
NPsC-AR-2F-17- XI	4	0.04	0.12	29.7
NPsC-AR-2F-17- XII	4	0.08	0.38	29.2
NPsC-AR-2F-17- XIII	2	0.08	0.29	31.2

a) $\lambda_{exc}=360$ nm.

Estes ensaios permitiram obter NPsC a partir das AR-2F-17 com boas propriedades luminescentes e elevados rendimentos mássicos (0.38 e 29.2%, respetivamente). Ressalva-se que a obtenção de nanomateriais com maior luminescência a temperaturas entre 200-250°C, permite inferir que os principais responsáveis pela fluorescência do sistema são os NPsC e não espécies moleculares.

II.3.3.2 – Propriedades Fotofísicas

As propriedades fotofísicas dos NPsC obtidos por tratamento hidrotérmico do efluente AR-2F-17 foram avaliadas pelas técnicas analíticas anteriormente descritas.

Na Figura II.16 apresentam-se os espectros de absorção no estado fundamental e de fluorescência no estado estacionário (emissão e excitação) de dispersões dos NPsC que nas condições reacionais testadas, mostraram melhor rendimento quântico.

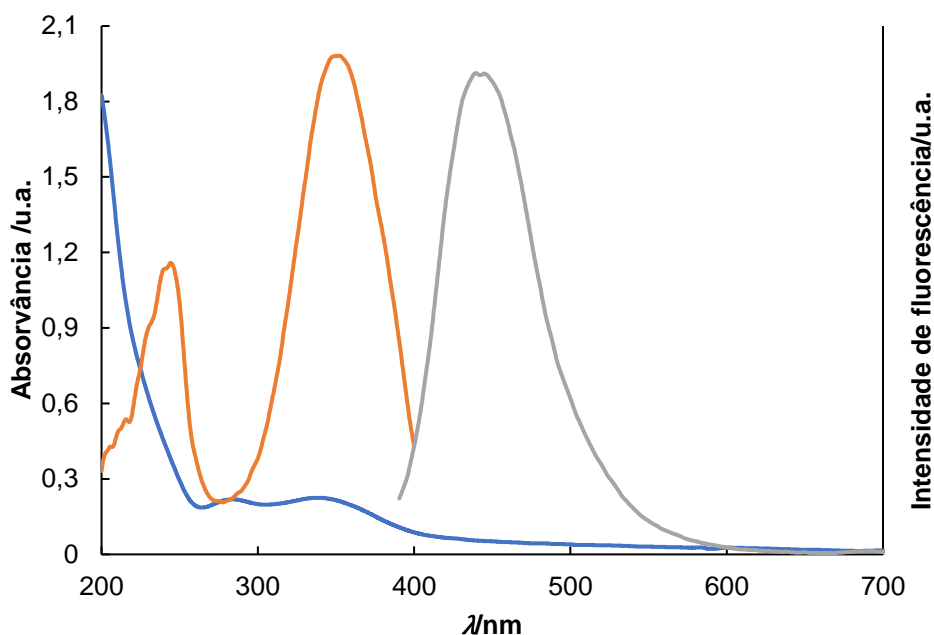


Figura II.16 - Espectros de UV-Vis (linha azul), emissão (linha cinzenta; $\lambda_{exc}=360$) e excitação (linha laranja; monitorizado a 450 nm) de uma dispersão aquosa de NPsC (0.1 mg/mL), obtidos das AR-2F-17.

O UV-Vis caracteriza-se pela existência de três bandas distintas a ca. 244, 283 e 335 nm, sendo a de maior energia atribuível a transições $\pi-\pi^*$ do centro de carbono e a maiores comprimentos de onda a transições $n-\pi^*$ ou uma mistura de transições entre $\pi-\pi^*$ e $n-\pi^*$ (e.g. C=O, amidas/ácidos) covalentemente ligados à superfície da matriz de carbono. Note-se que, comparativamente ao discutido na Secção II.3.1.2, existe um desvio batocrômico destas bandas características dos NPsC. Assim, quando excitados a 360 nm, ocorre emissão no azul com um $\lambda_{em\ max}$ centrado a ca. 445nm, com um desvio de Stokes de 0.91 eV (110 nm) e uma largura de banda a meia altura (LBMA) de 0.44 eV (71 nm). O espectro de excitação (monitorizado a 445nm) indica que os cromóforos com maior contribuição na emissão dos NPsC, têm transições eletrônicas a 245 e 350 nm, sendo este último claramente predominante, confirmando que ocorreu efetivamente um desvio batocrômico nas propriedades luminescentes do NPsC, comparativamente aos obtidos a partir das AR-2F-16.

Como referido nas secções anteriores, a emissão dos NPsC é dependente do comprimento de onda de excitação. Os NPsC obtidos do tratamento hidrotérmico das AR-2F-17 também revelaram esse comportamento, sendo a emissão desviada para o vermelho com o aumento do progressivo do λ_{exc} (Figura II.17).

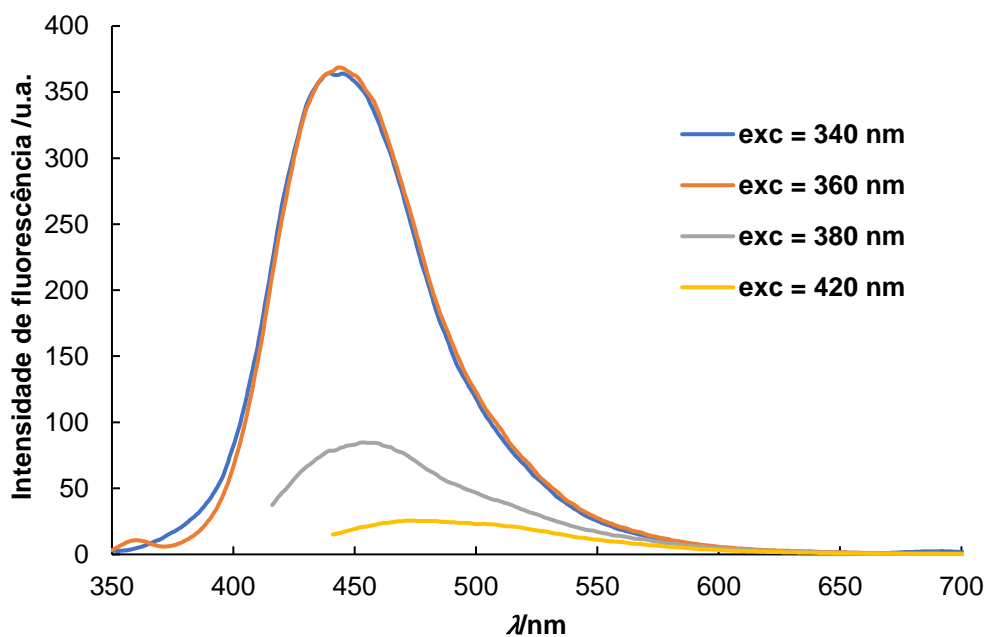


Figura II.17 - Espectros de emissão de dispersões aquosas de NPsC (0.1 mg/mL) obtidos das AR-2F-17 com excitação a diferentes comprimentos de onda (340 a 420 nm).

A variação do pH nestes NPsC é, no entanto, bastante diferente da observada para os NPsC obtidos a partir das AR-2F-16. Na gama de pH entre 4 e 11.3 a intensidade de emissão é constante, mas nos intervalos de pH 1 a 4 e pH 11.3 a 14, observa-se um decaimento brusco na intensidade de emissão dos NPsC, acompanhado de um ligeiro desvio batocrômico a pH mais ácido (ca. 10 nm) (Figura II.18).

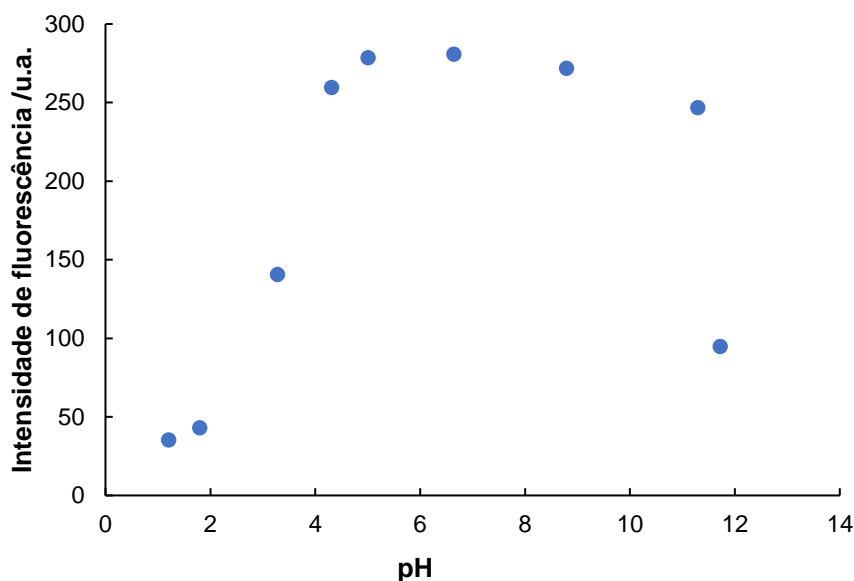


Figura II.18 - Efeito do pH na intensidade de emissão de uma dispersão aquosa de NPcC (0.1 mg/mL), obtidos das AR-2F-17.

A pH mais básico, a emissão não sofreu qualquer desvio, apesar do decréscimo da intensidade de emissão. No entanto, o efeito do pH na intensidade de luminescência mostrou ser reversível, tendo recuperado a intensidade de emissão em ca. 88% após a inversão de pH de 1.79 a 7.08 e também no abaixamento de pH de 11.29 para 6.87. O estabelecimento de equilíbrios ácido/base com as funcionalidades de caráter ácido para valores de pH mais elevados e também com as de caráter básico a pH mais baixo, poderão justificar este comportamento. De notar que este último efeito não se verificou nos NPcC obtidos a partir das AR-2F-16. Estes resultados permitem concluir que os NPcC produzidos a partir das AR-2F-16 exibirão funcionalidades muito mais oxidadas (ácidos, obtidos em condições mais oxidativas), comparativamente ao NPcC obtidos das AR-2F-17, que certamente terão na sua composição mais grupos amina e imina que poderão sofrer protonação e conseqüentemente, justificar a redução de fluorescência observada a valores de pH inferiores a 4.

Na secção anterior, ficou claramente demonstrado que a 150°C e a 300°C, se obtiveram NPcC com baixa luminescência, comparativamente aos sintetizados a 200°C e 250°C. Da avaliação dos ensaios realizados sob atmosfera de N₂, verifica-se que os NPcC mais emissivos foram obtidos a 200°C. Como descrito na literatura,^{24,25} os NPcC mais emissivos dependem do conteúdo em N ou N co-dopado com outro heteroátomo, levando ao estudo da influência do rácio ED/TS nos NPcC sintetizados a partir de AR-2F-17 sob atmosfera de azoto (Figura II.19).

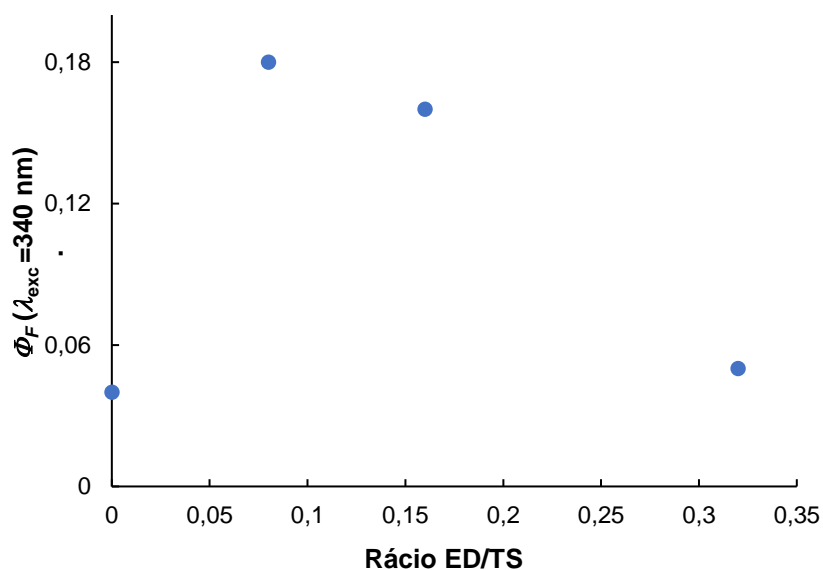


Figura II.19 - Efeito da quantidade de ED nos NPsC obtidos das AR-2F-17.

Verifica-se que o rácio ED/TS de 0.08 é o que origina NPsC mais fluorescentes, conforme observado para os nanomateriais obtidos a partir das AR-2F-16.

De forma a complementar o estudo das propriedades fotofísicas dos NPsC, foi estudada a dinâmica do decaimento de intensidade de fluorescência dos NPsC utilizando técnicas de fluorescência resolvida no tempo. Os resultados foram obtidos a um $\lambda_{exc} = 340$ nm e ao máximo de emissão (440 nm), utilizando duas somas de exponenciais, conduzindo a dois tempos de vida, sendo depois ponderados para o resultado global de tempo de vida (Tabela II.23).

Tabela II.23 - Tempos de vida obtidos para uma dispersão aquosa de NPsC (0.1 mg/mL) obtidos de AR-2F-17.

	a_1 /%	τ_1 /ns	a_2 /%	τ_2 /ns	$\tau_{média}$ /ns
NPC-AR-2F-17-XII	91	15	9	16	15

Os resultados mostraram tempos de vida relativamente longos, da ordem dos 15 ns.

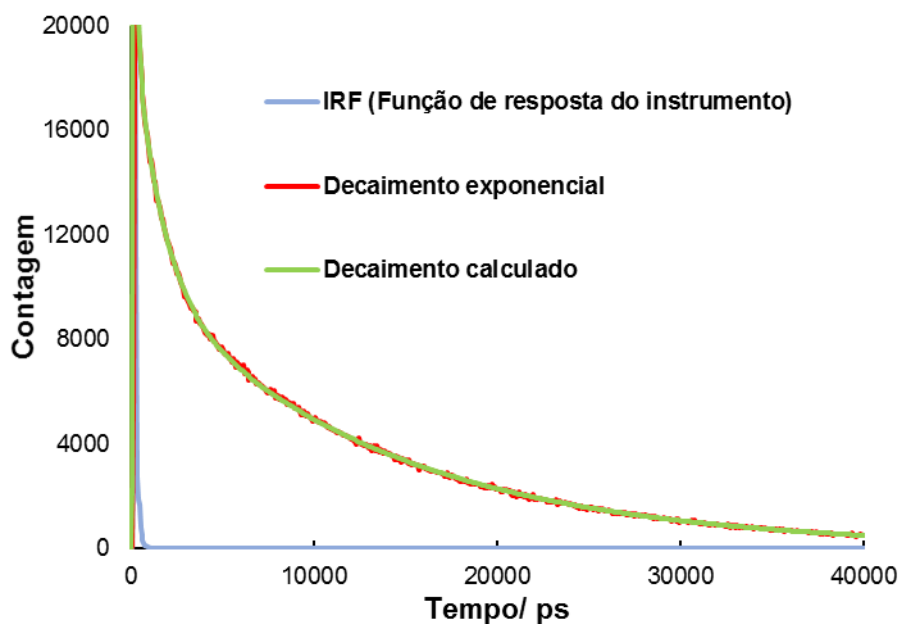


Figura II.20 - Decaimento dinâmico de fluorescência para uma dispersão aquosa de NPCs (0.1 mg/mL) obtidos das AR-2F-17; ($\lambda_{exc}=340$ nm; $\lambda_{em}=440$ nm).

II.3.3.3 – Caracterização Estrutural

Da análise por FTIR, RMN de ^1H e ^{13}C e análise elementar dos NPsC produzidos a partir do efluente AR-2F-17, foi possível caracterizar estruturalmente os nanomateriais. Refira-se que por não se tratar de um composto puro, não é possível realizar uma caracterização estrutural exata.

A análise elementar obtida para os NPsC (ver subsecção II.3.5.3) após correção de cinzas (13.3 %) foi: C, 45.32 %; H, 4.69%; N, 6.21%; e O (calculado), 43.78 %. Por comparação com as AR-2F-17, o rácio molar de N/C aumenta de 0.013 para 0.12 e o rácio O/C aumenta de 0.38 a 0.72; por outro lado, o rácio H/C decresce ligeiramente (1.53 para 1.24). O rácio O/N exibe um decréscimo acentuado de 30.16 para 6.23, demonstrando que o conteúdo em azoto aumentou substancialmente, resultado que não acompanha o obtido nos NPsC produzidos a partir das AR-2F-16.

A análise por FTIR mostra bandas características a 3451, 3265, 3001, 2930, 2858, 1655, 1590, 1458, 1039, 726 e 591 cm^{-1} . Conforme observado nos espectros dos NPsC já descritos, existe um aumento das bandas de OH e NH ($3650\text{-}3100$ cm^{-1}) e um decréscimo das bandas CH correspondentes aos compostos alifáticos ($3030\text{-}2800$ cm^{-1}). Adicionalmente, observa-se o desaparecimento da banda correspondente aos grupos éster (1747 cm^{-1}) e o surgimento das bandas a 1655, 1590 e 1458 cm^{-1} , correspondentes a ácidos/carboxilatos e amidas (Figura II.21).

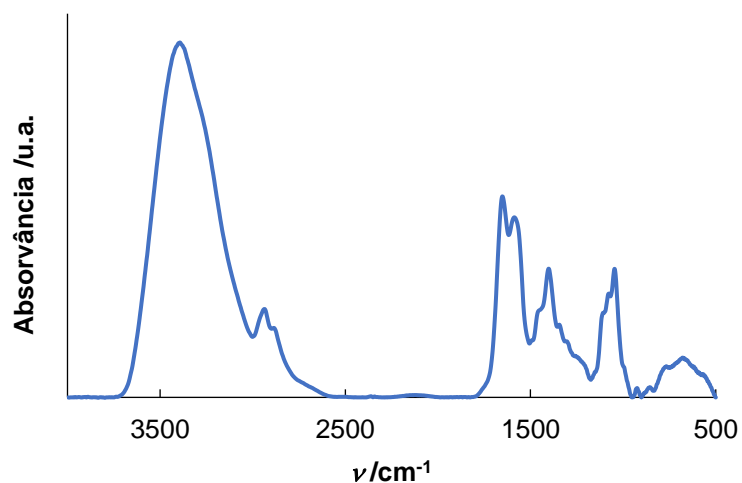


Figura II.21 - Espectro de FTIR dos NPsC obtidos das AR-2F-17 em pastilha de KBr.

Os NPsC obtidos das AR-2F-17 foram sujeitos a um procedimento de purificação (*vide* Secção II.3.5.3) e obtidos os espectros de RMN ^1H e ^{13}C em MeOD (Figura II.22 e Figura II.23, respetivamente). No RMN ^1H , identificam-se ressonâncias em três zonas distintas, a primeira zona com sinais entre 0.8 e 2.5 ppm correspondentes a CH alifáticos, uma segunda zona com sinais entre 3 e 4.2 ppm correspondentes a CHN e CHO e também ressonâncias respeitantes a prótons aromáticos (6.5-9 ppm).

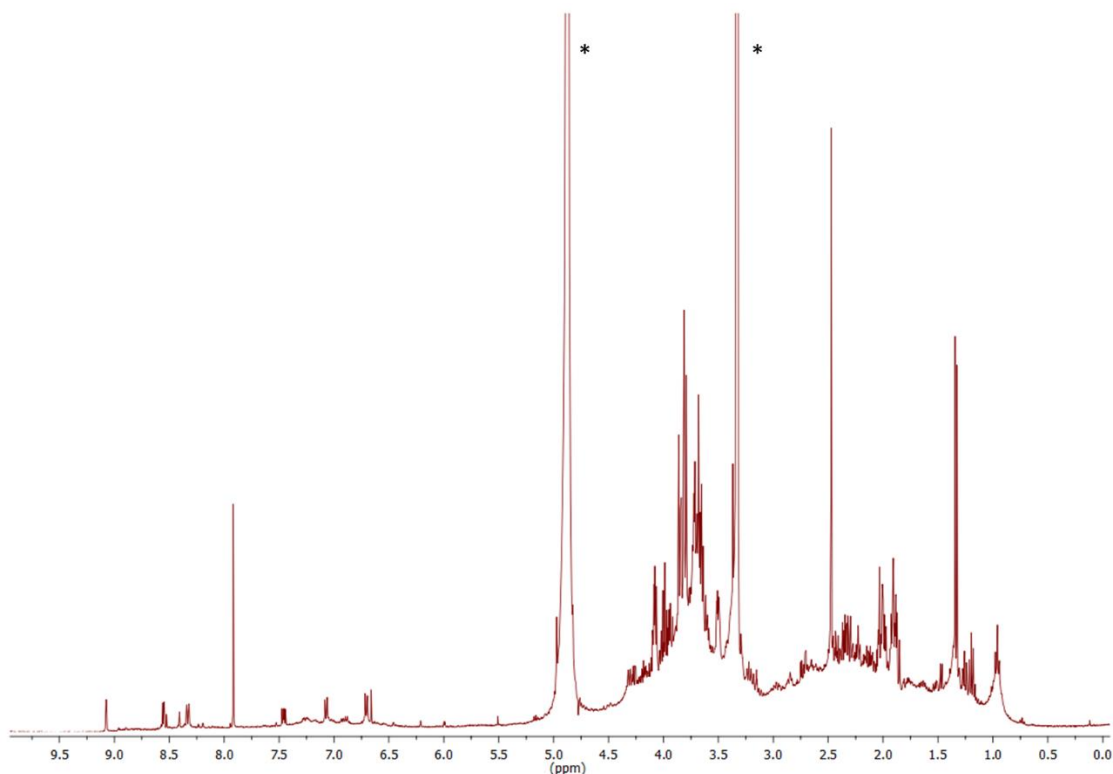


Figura II.22 - Espectro de RMN ^1H dos NPsC obtidos das AR-2F-17 após purificados (MeOD) (ver subsecção II.3.5.3); *solvente residual.

O espectro de ^{13}C apresenta sinais entre 20-40 ppm, correspondentes aos grupos alifáticos CH , uma segunda zona com sinais entre 60-80 ppm de Csp^3 presentes em grupos amina/álcool e ainda sinais entre 115-150 ppm, que podem ser atribuídos a Csp^2 de grupos arilo e carbonos olefínicos. Carbonos quaternários de grupos carboxilato/carboxílico/aldeído, fenóis/fenolatos, estruturas quinóides e amidas podem ser identificados a 180 ppm.

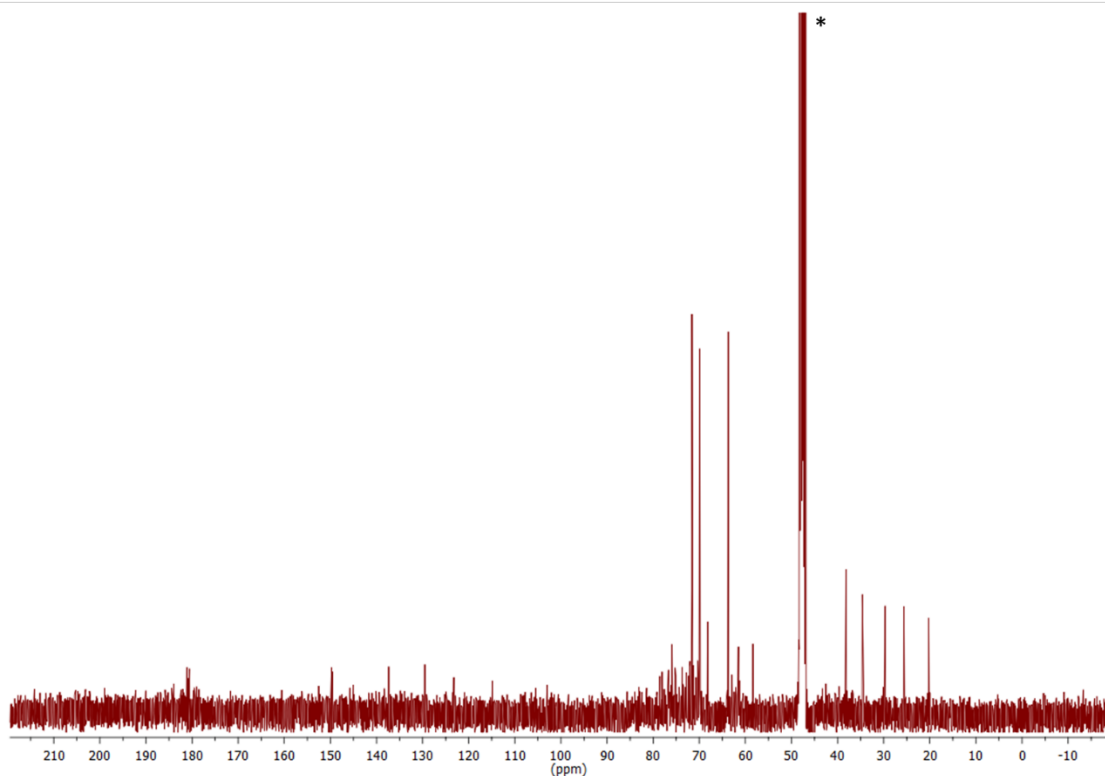


Figura II.23 - Espectro de RMN ¹³C dos NPsC obtidos das AR-2F-17 após purificados (MeOD) (ver subsecção II.3.5.3); *solvente residual.

II.3.3.4 – Caracterização Morfológica

As caracterizações morfológicas (TEM) dos NPsC obtidos das AR-2F-17 não foram realizadas devido a uma avaria do microscópio eletrónico de transmissão (desde março de 2018), que não pode ser, entretanto, colmatada.

II.3.4 – Efeito do Efluente nas Características dos NPsC Produzidos por Tratamento Hidrotérmico - Estudo Comparativo

Ficou provado ao longo desta dissertação que a origem do efluente utilizado na produção dos NPsC por tratamento hidrotérmico tem uma influência muito significativa nas propriedades destes nanomateriais. Por essa razão, as condições reacionais foram ajustadas de forma a obter NPsC com propriedades luminescentes aptas para diversas aplicações. De seguida, será apresentado um estudo comparativo das propriedades dos NPsC produzidos a partir de efluentes distintos obtidos na produção industrial do azeite.

A avaliação das propriedades fotofísicas dos NPsC é um parâmetro de grande importância tendo em vista as potenciais aplicações dos nanomateriais.

Na Figura II.24 são apresentados os espectros de absorção de estado fundamental de NPsC obtidos por tratamento hidrotérmico de diferentes ARPIA. No espectro dos NPsC obtidos de AR-2F-16 (linha verde) verifica-se a presença de uma banda a 320 nm, ausente nos espectros dos nanomateriais com origem em AR-P (linha vermelha e azul). Uma outra particularidade, reside na banda a ca. 280 nm característica nos NPsC obtidos a partir de AR-2F-16 e que também ocorre no espectro dos nanomateriais obtidos a partir de uma mistura de AR-2F-16 e AR-P. Nos NPsC obtidos a partir das AR-P, essa banda está ligeiramente desviada para o ultra-violeta (linha vermelha).

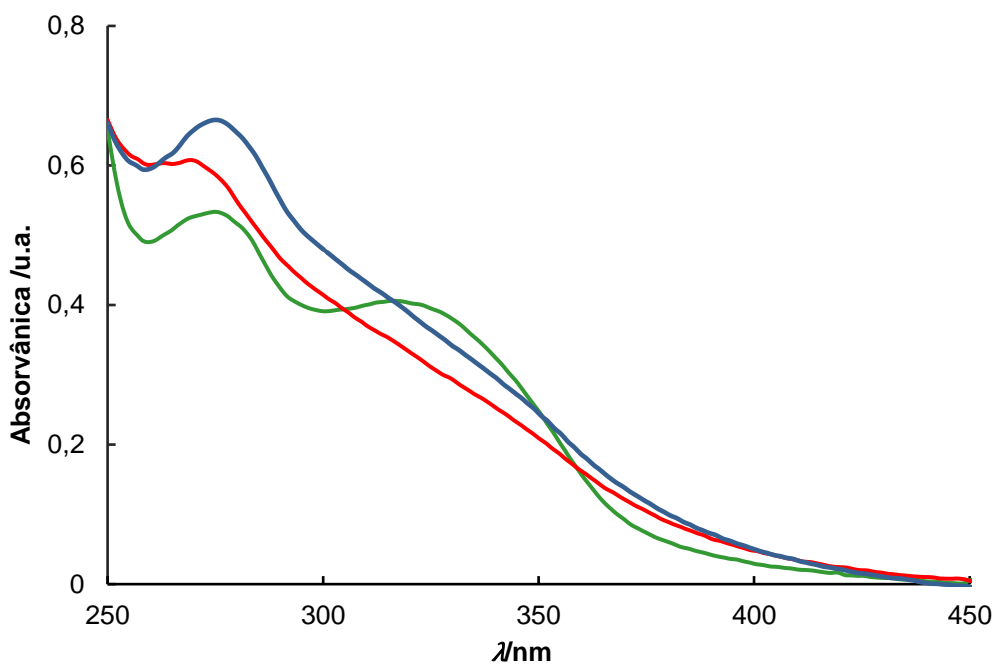


Figura II.24 - Espectros de UV-Vis de dispersões aquosas de NsPC (0.1 mg/mL). NPc-AR-P-I (linha vermelha), NPc-AR-P-III (linha azul) e NPc-AR-2F-16-III (linha verde).

Na Figura II.25 são apresentados os espectros de emissão e excitação dos NPc obtidos a partir dos diferentes efluentes objeto de estudo.

Nos espectros de emissão, observa-se um desvio batocrômico de ca. 10 nm dos NPc obtidos a partir de AR-P. No espectro de excitação dos NPc-AR-P-I (linha vermelha) ocorre um desvio da banda a ca. 280nm, efeito já anteriormente corroborado no espectro de UV-Vis.

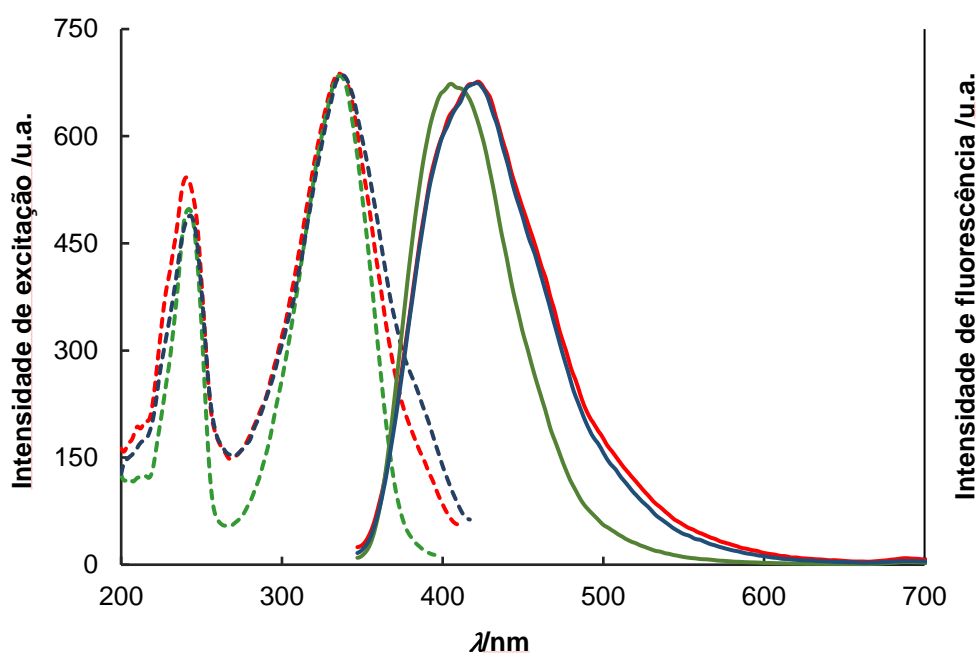


Figura II.25 – Espectros de excitação (monitorizados aos respetivos máximos de emissão (linha tracejada) e emissão ($\lambda_{exc}=340$ nm; linha contínua) de dispersões aquosas de NPSC (0.1 mg/mL). NPC-AR-P-I (linha vermelha), NPSC-AR-P-III (linha azul) e NPSC-AR-2F-16-III (linha verde).

Dado que os efluentes em estudo revelaram uma diferença significativa no seu conteúdo em hidratos de carbono e lípidos (AR-P mais ricas em hidratos de carbono e AR-2F-16 em lípidos), poderá concluir-se que, nas mesmas condições reacionais, estes parâmetros terão forte impacto nas características dos nanomateriais obtidos por tratamento hidrotérmico.

II.3.4.1 – Estudo Comparativo dos NPSC obtidos a partir do Processo de Extração de Duas-Fases (AR-2F-16 vs. AR-2F-17)

A flutuação da composição das ARPIA não reside unicamente no tipo de processo de extração/instalação industrial empregue na produção do azeite, mas para o mesmo tipo de processo extrativo, o período da colheita da matéria-prima (azeitona) que originará o respetivo efluente, revelou ter um impacto significativo nas características dos NPSC produzidos.

A Figura II.26 apresenta os espectros de emissão dos NPsC produzidos em idênticas condições reacionais, a partir das AR-2F (AR-2F-16 e AR-2F-17) estudadas no presente trabalho. O espectro dos NPsC obtidos a partir de AR-2F-17 apresenta um desvio batocrômico significativo (ca. 30 nm).

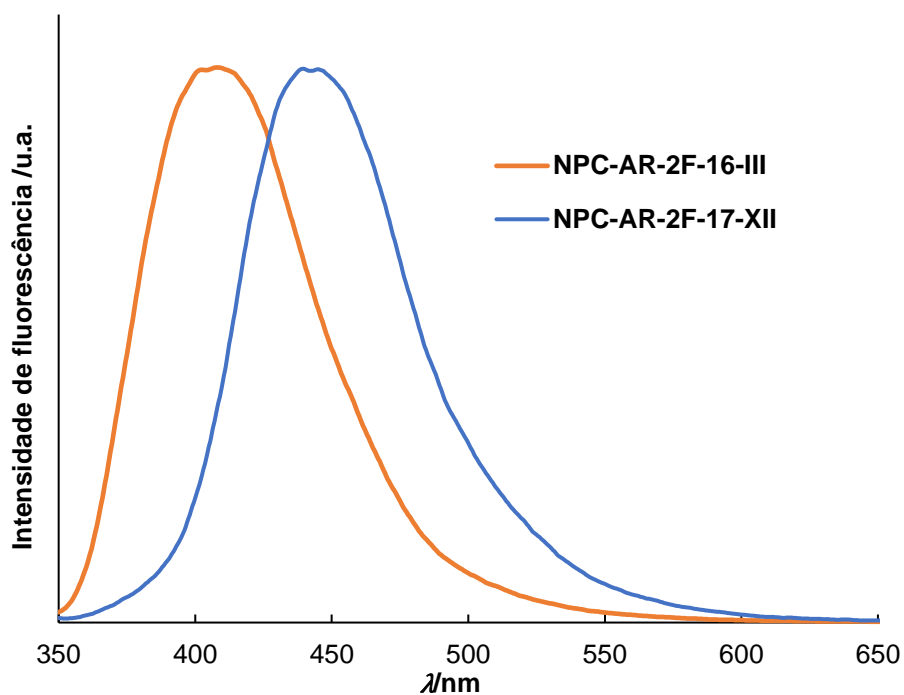


Figura II.26 - Espectros de emissão normalizados de dispersões aquosas de NPsC (0.1 mg/mL) de NPsC-AR-2F-16-III e NPsC-AR-2F-17-XII.

O espectro de FTIR também exibe uma diferença relevante no número de onda respeitante às funcionalidades ácido/carboxilatos e amidas (Figura II.27).

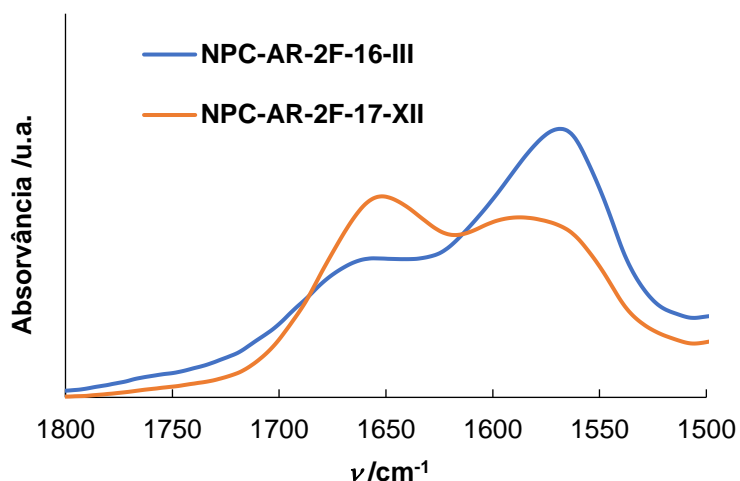


Figura II.27 - Espectros parciais de FTIR (1800-1500 cm^{-1}) dos NPsC obtidos de AR-2F-16 e AR-2F-17 em pastilha de KBr.

Também os correspondentes espectros de UV-Vis (Figura II.28) exibem uma diferença significativa no espectro dos NPsC obtidos das AR-2F-17, com um desvio batocrômico ca. 15 nm da banda a 320 nm. Esta análise dos espectros de UV-Vis permite inferir que os NPsC obtidos das AR-2F-17 apresentam maior extensão de conjugações π (C=C, C=N e C=O), a qual se reflete no desvio da emissão para o vermelho.

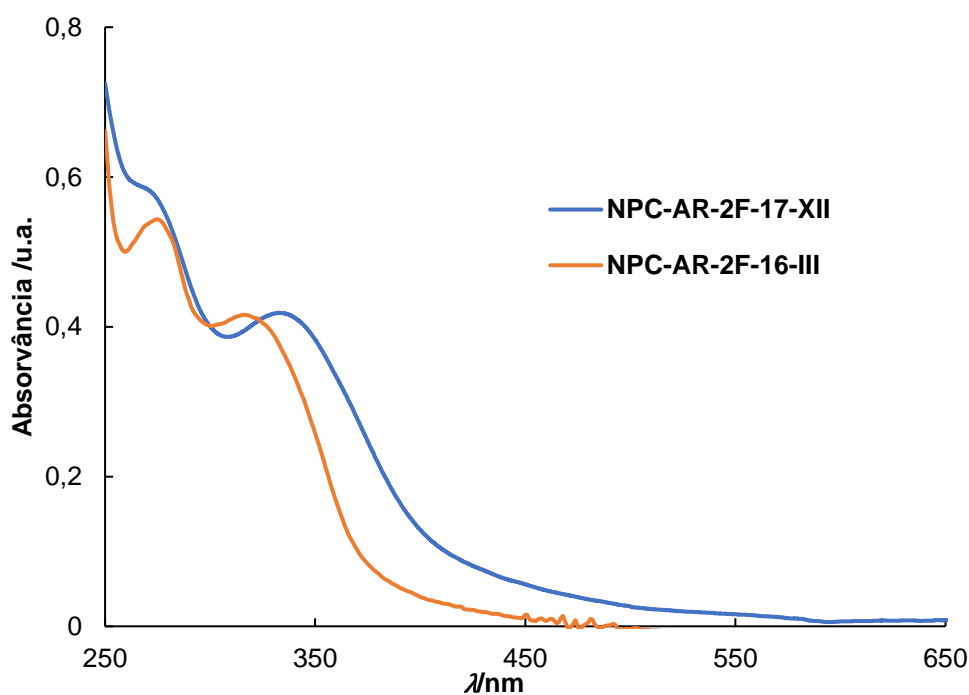


Figura II.28 - Espectros de UV-Vis de dispersões aquosas dos NPsC (0.1 mg/mL) obtidos de AR-2F-16 e AR-2F-17.

II.3.5 – Purificação dos NPsC

Na tentativa de melhorar as propriedades dos NPsC sintetizados por tratamento hidrotérmico, designadamente o rendimento quântico de fluorescência, foram tentativamente aplicados métodos de purificação aos nanomateriais (cromatografia, diálise e extração líquido-líquido com solvente orgânico). A remoção de impurezas inorgânicas com origem nas ARIPA utilizadas na obtenção dos NPsC foi um dos principais objetivos tendo em vista as potenciais aplicações destes materiais. Na Tabela II.24 apresentam-se os valores obtidos para as cinzas dos NPsC obtidos de AR-2F-16 e AR-2F-17. Os métodos de purificação foram testados tendo como objetivo remover impurezas inorgânicas presentes; contudo, algumas dessas impurezas permaneceram nos NPsC por estarem ligadas ionicamente a funcionalidades da superfície como contra-íão.

Tabela II.24 - Quantificação de Cinzas dos NPsC sintetizados.

Ensaio	Extrato/mg	Cinzas/mg	% Cinzas
NPsC-AR-2F-16-X	45.8	18.5	40.4
NPsC-AR-2F-16-IV	31.1	16.5	53.1
NPsC-AR-2F-17-VII	13	3.1	23.8
NPsC-AR-2F-17-X	37	6.1	16.5
NPsC-AR-2F-17-XII	158.4	21	13.3

Do espectro de FTIR das cinzas dos NPsC-AR-2F-17 (Figura II.29), podemos inferir que o material inorgânico é constituído maioritariamente por carbonatos (presença de banda muito forte a 1420 cm^{-1}); a banda alargada na zona entre $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ é atribuída à presença de água.⁷⁷

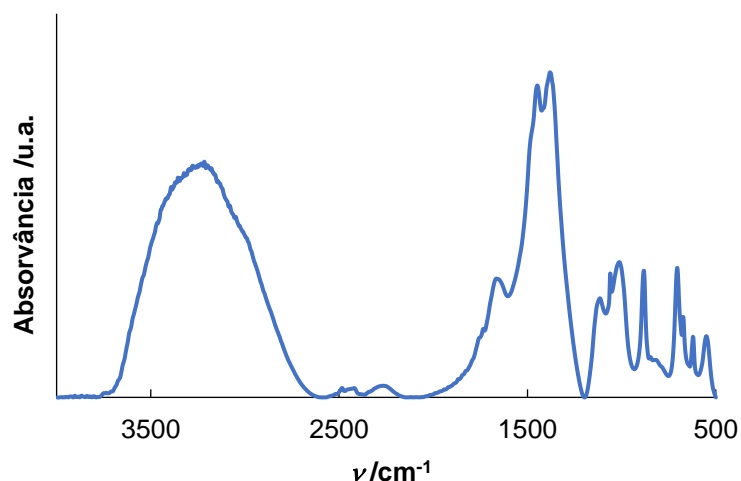


Figura II.29 – Espectro de FTIR das cinzas de NPsC-AR-2F-17-XII em pastilha de KBr.

II.3.5.1 – Purificação por Sephadex G75

A purificação por Sephadex G75 baseia-se numa separação por cromatografia de permeação em gel. O princípio cromatográfico assenta na exclusão por tamanho dos constituintes da amostra a purificar, sendo primeiro eluídas as espécies de maior tamanho, *i.e.* menores tempos de retenção na coluna cromatográfica.

Foram purificados por este processo os NPsC sintetizados nas condições do ensaio NPsC-AR-2F-16-XV. A purificação decorreu por gravidade e também sob pressão de azoto (eluição *flash*). As frações eluídas foram rastreadas por UV-Vis ao comprimento de onda de 320 nm (máximo de absorção dos NPsC) (Figura II.30 (A e B)).

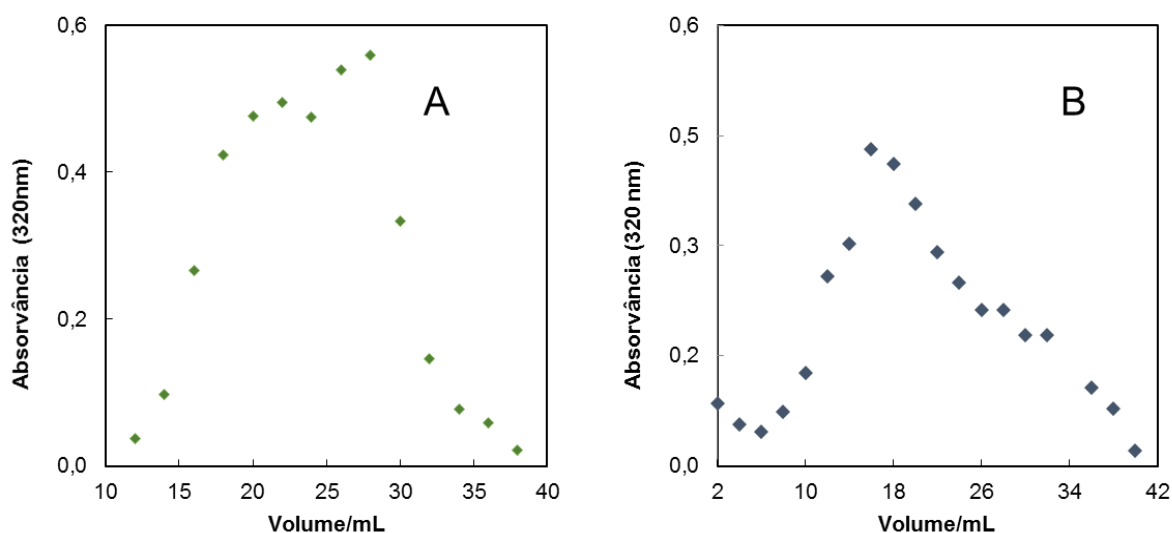


Figura II.30 - Absorvância das frações obtidas da separação por Sephadex G75; (A) eluição por gravidade e (B) eluição *flash*.

Com recurso a pressão de N_2 a fração com absorvância máxima a 320 nm ocorreu após eluição de um volume de 18 mL, originando frações contendo NPSC a partir de 12 mL. Por outro lado, na eluição por gravidade o máximo de NPSC ocorreu para um volume de eluato de 30 mL. Na cromatografia por gravidade (A), o balanço mássico da purificação originou 18.43 mg de NPSC para uma carga inicial de ca. 25.2 mg.

Na purificação recorrendo a pressão de N_2 (cromatografia *flash*, B) para idêntica carga na alimentação, a quantidade de NPSC eluídos não ultrapassou os 16.05 mg.

Na tentativa de rastrear a natureza dos sais inorgânicos presentes nos NPSC, foi realizada em condições idênticas uma cromatografia de KCl e a eluição do sal avaliada pela medição da condutividade das frações eluídas (Figura II.31).

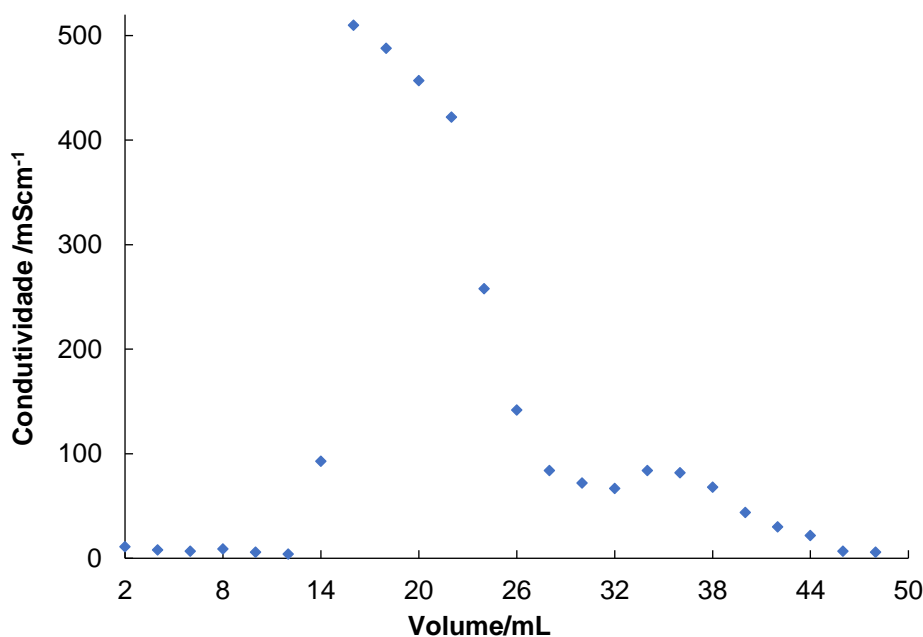


Figura II.31 - Condutividade das frações obtidas da eluição de KCl por Sephadex G75 (eluição por gravidade).

Os perfis das curvas de condutividade obtidas das frações eluídas, quer dos NPsC eluídos por gravidade (Figura II.30, **A**), quer das frações provenientes da eluição do KCl (Figura II.31) mostraram ser sobreponíveis, sendo uma forte indicação de que o material inorgânico presente é eluído em conjunto com os NPsC.

II.3.5.2 – Diálise

A diálise é um dos métodos mais utilizados na purificação deste tipo de materiais¹⁷ para remoção de espécies moleculares presentes, assim como impurezas de outra natureza. Este processo de purificação foi aplicado aos NPsC produzidos a partir das AR-2F-17 utilizando uma membrana com *cut-off* de 1000 Da, contra água Millipore®, durante 24 horas.

Decorrido esse período, verificou-se que os NPsC se encontravam no exterior da membrana. Esta situação é justificada pelo baixo tamanho “molecular” dos NPsC produzidos, que atravessaram a membrana. Por outras palavras, não foi possível purificar os NPsC por este método.

II.3.5.3 – Extração líquido-líquido

Outro método de purificação utilizado foi a extração com recurso a solvente orgânico. Uma amostra de ca. 100mL de NPsC obtidos após isolamento da m.r., foi sucessivamente extratada com duas porções de 75 mL de CH₂Cl₂ e duas porções de 75 mL de AcOEt.

Após evaporação dos solventes, os resíduos foram quantificados, tendo sido obtidos ca. 829.01 mg da fração aquosa (NPC-AR-2F-17-XII-I), ca. 23.2 mg da fração do CH₂Cl₂ (NPC-AR-2F-17-XII-II) e a fração do AcOEt (NPC-AR-2F-17-XII-III) apresentou apenas ca. 2.3 mg. Foram traçados os espectros de FTIR (Figura II.32) das três frações verificando-se que os NPsC integram a composição da fase aquosa, ocorrendo espécies moleculares nas fases orgânicas.

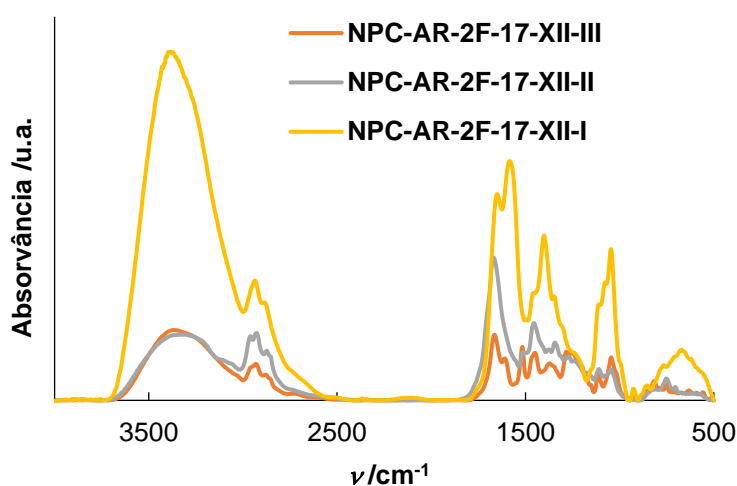


Figura II.32 - Espectros de FTIR das frações extratadas em pastilha de KBr.

Este procedimento contribuiu assim para uma melhoria das características dos nanomateriais. O rendimento quântico de fluorescência da fase aquosa manteve o seu valor praticamente inalterado ($\phi_f=0.32$, $\lambda_{exc}=360\text{nm}$), dando indicação que as entidades responsáveis pela luminescência (*vide* Secção II.3.3.1) do sistema são efetivamente os NPsC e não espécies moleculares presentes.

Estes resultados permitem adiantar que o conteúdo de compostos inorgânicos se mantém conjuntamente com os nanomateriais dada a sua elevada solubilidade na fase aquosa.

Tratamento adicional foi realizado com uma toma de 30 mL de NPsC-AR-2F-17-XII-I levada à secura ($T < 50^\circ\text{C}$) de onde se obtiveram ca. 308 mg de resíduo sólido. Este resíduo foi dissolvido em 30 mL de MeOH e a suspensão resultante filtrada por

membrana de celulose de 0.2 μm . Após secagem da membrana, foi quantificado um resíduo em *ca.* 14.6 mg e determinado o rendimento quântico do filtrado (NPsC-AR-2F-17-XII-IV; $\phi_F = 0.38$ ($\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$)).

A quantificação das cinzas (% m/m) presentes no filtrado (*ca.* 12.0%) evidenciou um abaixamento de apenas *ca.* 1.3%. Deste resultado, poder-se-á inferir que a fração maioritária de inorgânicos presentes nos NPsC se encontram ligados à sua superfície como contra-íão.

II.3.5.4 – Purificação de NPsC com SiO_2

Na tentativa de remover espécies moleculares que pudessem interferir na intensidade de fluorescência dos NPsC, foi realizada uma cromatografia de uma amostra de NPsC utilizando como fase estacionária SiO_2 . Refira-se que Yang e colaboradores^{17,28} após sintetizarem NPsC por tratamento hidrotérmico de ácido cítrico e etilenodiamina a 150°C, isolaram com sucesso por esta via o IPCA ou moléculas de estrutura semelhante, comprovando que a fluorescência destes depende em grande parte, de estados moleculares.

Os NPsC sujeitos a este processo de purificação foram sintetizados nas condições do ensaio NPsC-AR-2F-16-III na ausência de agitação. Uma amostra de *ca.* 40 mL de dispersão aquosa dos NPsC foi evaporada à *secura* e seca sob vácuo a 105°C, obtendo-se *ca.* 48 mg de um resíduo sólido. Esta amostra foi carregada numa coluna contendo SiO_2 como fase estacionária, carregada previamente como *slurry*, utilizando como fase móvel para a eluição da amostra AcOEt:MeOH (80:20), aumentando progressivamente a polaridade para AcOEt:MeOH (60:40). As frações recolhidas foram avaliadas por UV-Vis e fluorescência. Os espectros obtidos permitiram verificar a ausência de NPsC e mesmo de qualquer outro composto fluorescente no eluato, resultado que se manteve inalterado mesmo aumentando a polaridade para AcOEt:MeOH (20:80).

Também é descrito na literatura²⁸, o recurso a cromatografia preparativa com suporte de sílica para purificar NPsC. Utilizando AcOEt:MeOH (1:2) como sistema eluente, nas primeiras frações (incolores) foram detetados fluoróforos (não NPsC), com grande intensidade de luminescência; os nanomateriais de carbono apenas foram eluídos em frações posteriores.

Comparando com o comportamento observado na purificação efetuada aos NPsC obtidos das AR-2F-16, poder-se-á concluir que estes estabelecem afinidades fortes com a sílica que inviabilizam a sua eluição.

Refira-se, no entanto, que o sucesso da purificação realizada por Yang²⁸ poderá ser justificado pela temperatura (150°C) à qual foi realizado o tratamento hidrotérmico na obtenção dos NPsC, temperatura inferior à utilizada na preparação dos nanomateriais a partir das AR-2F-16 (250°C). É ainda apontado por estes investigadores, que a temperatura do tratamento hidrotérmico influencia a fluorescência dos materiais obtidos a partir de ácido cítrico e etilenodiamina, adiantando que até 150°C a fluorescência é na sua maioria, proveniente de estados moleculares e que com o aumento da temperatura até ca. 300 °C, os estados do centro de carbono tornam-se nos principais responsáveis pela fluorescência, resultado do aumento do grau de carbonização, sendo este efeito observado com o aumento da dependência da emissão com o comprimento de onda de excitação.²⁸

II.3.6 – Síntese de Compósitos de Sílica e NPsC

Verificando-se que da tentativa de purificação dos NPsC obtidos a partir das AR-2F-16 por cromatografia em SiO₂, não ocorreu eluição dos NPsC, nem de quaisquer outros compostos com a mesma intensidade de luminescência, adiantando-se como justificação a eventual ocorrência de fortes interações dos nanomateriais com a sílica, sintetizaram-se materiais de sílica com NPsC (NPsC/SiO₂) conforme se descreve de seguida.

A síntese destes compósitos de sílica foi efetuada utilizando ca. 10 mL de dispersão aquosa de NPsC-AR-2F-17-XII-I à qual se adicionaram ca. 969 mg de sílica (ca. 10x a massa de NPsC). A suspensão obtida foi deixada sob agitação durante 30 minutos, sendo posteriormente filtrada e lavada sucessivas vezes até desaparecimento da fluorescência (controlo do filtrado por fluorescência), obtendo-se os respetivos compósitos como resíduo de membrana com forte coloração castanha devido à presença dos NPsC (NPsC/SiO₂-I). Ao filtrado obtido (ca. 50 mL) juntaram-se ca. 925 mg de sílica, notando-se fraca coloração nos compósitos daí isolados (NPsC-SiO₂-II), indicador de que grande parte dos NPsC teriam ficado “*embebidos*” na primeira mistura com a sílica. A Figura II.33 revela que os NPsC incorporaram a sílica, tornando-a fluorescente.

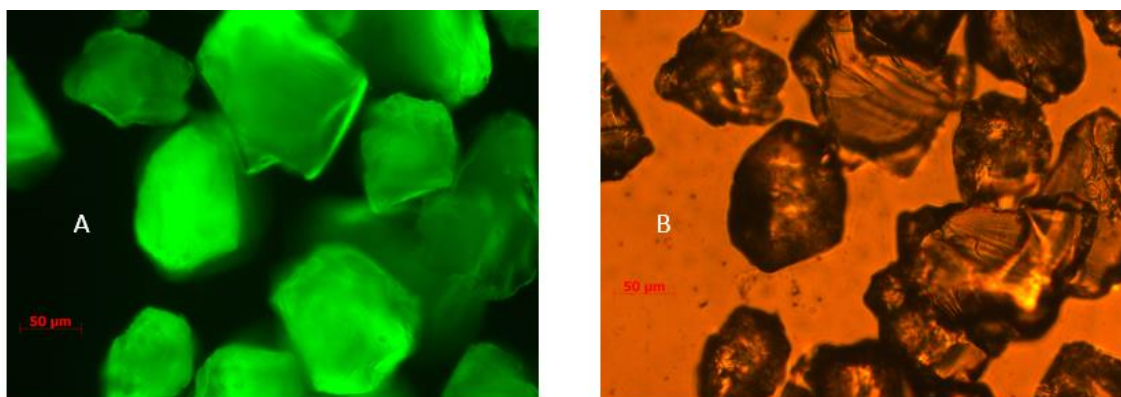


Figura II.33 - Imagens de microscopia de fluorescência obtidas para os compostos NPc/SiO₂-I. (A) Irradiação UV a 365 nm; (B) Irradiação com luz visível.

Wang *et al.*⁷⁸ sintetizaram compostos de sílica com NPc na forma de um pó na tentativa de eliminar a extinção de fluorescência dos NPc no estado sólido. Esta preparação foi utilizada para obter um filme usando lamelas de quartzo como suporte, sendo este posteriormente aplicado como material fluorescente no fabrico de um LED branco.

II.3.7 – Análise Térmica dos NPc

A estabilidade térmica dos NPc sintetizados foi avaliada recorrendo a análise de termogravimetria (TG). Os NPc (NPc-AR-2F-17-XII-I) foram aquecidos até 600°C durante 80 minutos (Figura II.34) e um segundo ensaio decorreu à mesma temperatura durante ca. 7h (Figura II.35).

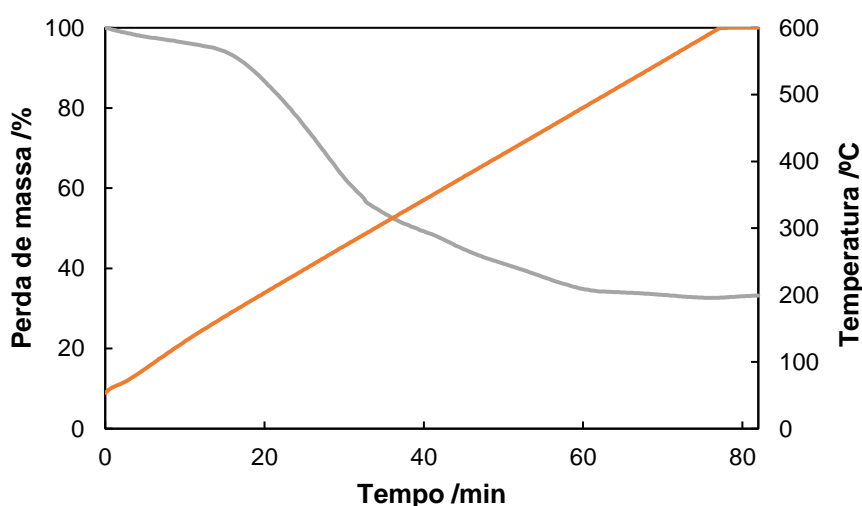


Figura II.34 - TG dos NPc-AR-2F-17-XII-I. Temperatura (linha laranja), perda de massa (linha cinzenta).

Da figura acima, verifica-se que até aos 240°C, ocorreu uma perda de massa de ca. 25.1%, conduzindo a uma massa residual de 33.22% quando atingiu os 600°C. Este resultado não corrobora o anteriormente obtido quando realizada a quantificação das cinzas destes nanomateriais.

No sentido de esclarecer este resultado, um segundo ensaio foi realizado à mesma temperatura, mas por um período mais longo (Figura II.35).

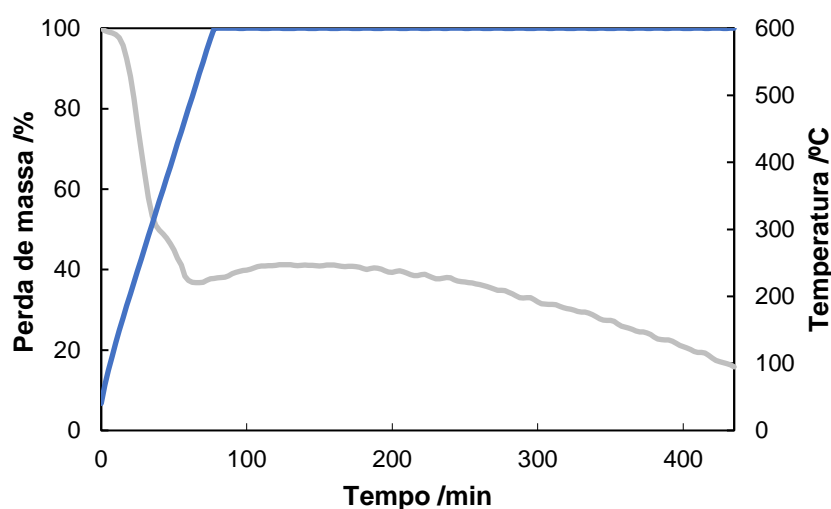


Figura II.35 - TG dos NPsC-AR-2F-17-XII-I. Temperatura (linha azul), perda de massa (linha cinzenta). O ganho de massa aparente a partir do minuto 70 advém de um artefacto do método/equipamento.

O termograma obtido revelou uma massa residual de ca. 15.39%, após o período de aquecimento a 600°C, valor muito aproximado do obtido para as cinzas destes NPsC.

II.4 – ESTUDO DE POTENCIAIS APLICAÇÕES

As áreas de aplicação dos NPsC são muito diversificadas, tendo sido apresentados alguns exemplos ilustrativos na Secção I.3.

Nesta dissertação, após a síntese e caracterização de NPsC obtidos por tratamento hidrotérmico de ARPIA de diferentes origens já descritas no capítulo dos Resultados e Discussão, serão de seguida apresentados os estudos realizados na aplicação destes nanomateriais (NPsC-AR-2F-16-III e NPsC-AR-2F-17-XII-I) como sensores fluorescentes de proteínas. Nos ensaios realizados utilizaram-se proteínas hémicas

(citocromo *c*, mioglobina e hemoglobina), tendo sido demonstrada sensibilidade às mesmas. Estudos paralelos revelaram ausência de resposta dos NPsC quando na presença de uma proteína não-hémica (lisozima).

A utilização de NPsC na detecção de proteínas hémicas encontra-se reportado, destacando-se a sua elevada sensibilidade na detecção de hemoglobina.^{79,80}

II.4.1 – Avaliação Sensorial

A avaliação da capacidade sensorial dos NPsC foi realizada para três proteínas hémicas, designadamente hemoglobina humana (Hb), citocromo *c* (Cyt *c*) e a mioglobina (Mio) (Figura II.36); e uma proteína não-hémica, a lisozima (Lys) (Figura II.37).

As proteínas hémicas caracterizam-se por ter cadeias polipeptídicas e um grupo prostético designado de grupo hemo, constituído por uma componente orgânica, o grupo porfirínico que na zona central possui um átomo de ferro, sendo este o grupo da Hb o responsável pelo transporte do oxigénio no sangue.⁸¹

A hemoglobina é uma proteína tetramérica contendo quatro grupos hemo, onde cada cadeia polipeptídica possui um grupo hemo, apresentando uma massa molar de 64.5 kDa e um *pI* de 6.8. A alteração dos níveis de Hb no sangue é indicador de diversas doenças, nomeadamente leucemia, anemia, doenças cardíacas entre outras.^{79,81}

A mioglobina é uma proteína relativamente pequena e compacta, com um peso molecular de 16.9 kDa e *pI* de 7.0. Esta é uma das proteínas mais simples que transporta oxigénio, sendo a responsável pelo armazenamento e fornecimento de oxigénio nos tecidos musculares e células de vertebrados.^{81,82}

O citocromo *c* é uma pequena proteína com uma massa molar de 12.4 kDa e um *pI* de 10.7. Está associada ao transporte de eletrões na cadeia respiratória mitocondrial dos mitocôndrios e na morte celular programada (apoptose).⁸²

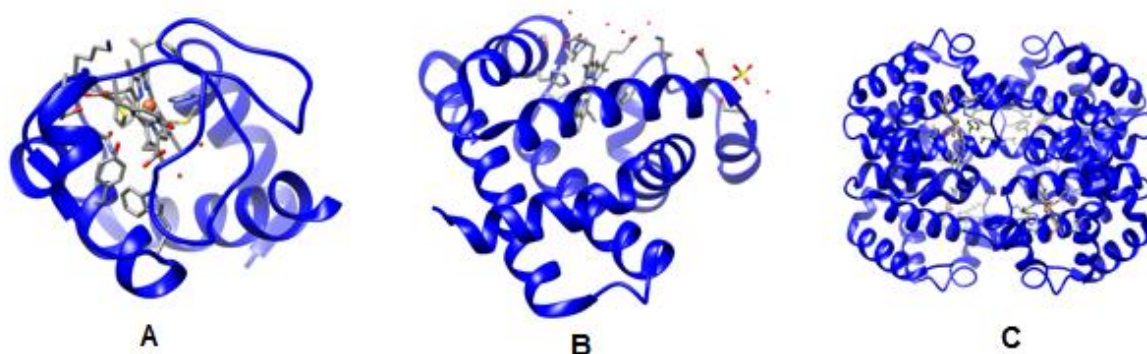


Figura II.36 - Estruturas tridimensionais do (A) Citocromo c (PDB id: 1HRC), da (B) Mioglobina (PDB id: 1YMB) do coração de cavalo e da (C) Hemoglobina humana (PDB id: 4HHB).⁸³

A Lys é uma proteína não-hémica com propriedades bactericidas, responsável pela degradação da parede celular de bactérias. Esta encontra-se abundantemente na clara de ovo e também na saliva e no leite humano, tendo um papel relevante na prevenção de infecções. Tem uma massa molecular de 14.3 kDa e um pI de 11.0.⁸²



Figura II.37 - Estrutura tridimensional da Lisozima da clara de ovo (PDB id: 1LYZ).⁸³

A avaliação da capacidade sensorial dos NPsC na deteção das proteínas foi efetuada com base em fenómenos de extinção de fluorescência, fenómenos esses que podem ser definidos por quaisquer processos que contribuam para a diminuição da intensidade de fluorescência dos nanomateriais. As interações moleculares entre os NPsC e a proteína que podem estar na origem dos processos de extinção podem ser diversificadas, nomeadamente ocorrência de reações no estado excitado, transferência de energia radiativa e não radiativa e transferência eletrónica.⁸⁴

Os processos de transferência de energia por ressonância (RET), fenômenos não radiativos, ocorrem entre um doador (fluoróforo) excitado e um aceitador (analito) no estado fundamental, sempre que se verifique a sobreposição do espectro de emissão do doador com o espectro de absorção do aceitador. As interações que ocorrem são do tipo dipolo-dipolo de média/longa distância. O processo de transferência de energia depende da distância entre doador e aceitador (r), do integral de sobreposição espectral entre a emissão do doador e a absorção do aceitador ($J(\lambda)$) e da distância crítica de Förster (R_0). Em R_0 , metade da energia de excitação do doador decai por RET e a outra metade decai por processos radiativos e não-radiativos, sendo a eficiência de transferência de energia (E) de 50%. Normalmente o valor de R_0 encontra-se entre 20-60 Å.^{84,85}

A velocidade de transferência de energia (k_T) é dada por:

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad \text{Equação II-1}$$

Sendo τ_D o tempo de vida do doador na ausência de qualquer analito ou outra qualquer interferência.⁸⁴

Em processos RET, pode definir-se E pela equação:⁸⁴

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad \text{Equação II-2}$$

Experimentalmente esta traduz-se por:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} \quad \text{Equação II-3}$$

Onde F e F_0 são as intensidades de fluorescência do doador na presença de analito e do doador sozinho, respetivamente.⁸⁴

O valor de R_0 é estimado através do $J(\lambda)$, rendimento quântico do doador (ϕ_F), índice de refração do meio (n) e do fator de orientação espacial dos dipolos (κ).⁸⁴

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-5} K^2 n^{-4} \Phi_F J(\lambda) \quad \text{Equação II-4}$$

Com $J(\lambda)$ a ser dado por:⁸⁴

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^4 d\lambda \quad \text{Equação II-5}$$

Sendo $F(\lambda)$ a intensidade de fluorescência do doador e $\varepsilon(\lambda)$ a absortividade molar do aceitador a um dado intervalo de comprimento de onda (λ).⁸⁴

A sobreposição espectral entre doador e aceitador também poderá indicar fenômenos de transferência de energia radiativa. Estes caracterizam-se pela absorção de um fóton emitido pelo doador por parte do aceitador e normalmente, é observado quando a distância entre ambos é superior ao comprimento de onda. Esta transferência não requer qualquer tipo de interação entre ambos, mas depende fortemente da sobreposição entre a emissão do doador e absorção do aceitador. Por outro lado, as transferências não-radiativas ocorrem a distâncias inferiores ao comprimento de onda (por exemplo RET).⁸⁴

A transferência radiativa é um processo em dois passos; o fóton é emitido pelo doador e absorvido pelo aceitador que é estruturalmente diferente ou igual. A Tabela II.25 ilustra as diferenças entre os dois tipos de transferência de energia.⁸⁴

Tabela II.25 - Tipos de transferência de energia nas propriedades de fluorescência do doador em que o aceitador é quimicamente diferente.⁸⁴

Características da emissão do doador	Transferência radiativa	Transferência não radiativa
Espetro de fluorescência	Modifica-se na zona de sobreposição espectral	Não se altera
Intensidade de fluorescência em estado estacionário	Decresce na região de sobreposição espectral	Decresce independentemente do comprimento de onda de emissão
Tempo de vida	Não se altera	Diminui

A transferência também pode ocorrer entre duas moléculas/partícula de doador (Tabela II.26).⁸⁴

Tabela II.26 - Tipos de transferência de energia nas propriedades de fluorescência do doador no caso de homotransferência.⁸⁴

Características da emissão do doador	Transferência radiativa	Transferência não radiativa
Espetro de fluorescência	Modifica-se na zona de sobreposição espectral	Não se altera
Intensidade de fluorescência em estado estacionário	Decresce na região de sobreposição espectral	Decresce independentemente do comprimento de onda de emissão
Tempo de vida	Abranda	Não se altera
Anisotropia de fluorescência em estado estacionário	Diminui	Decresce fortemente
Anisotropia de decaimento de fluorescência	Mais rápido	Muito mais rápido

A característica que mais influencia a eficiência destes dois processos de transferência de energia é a sobreposição espectral. Por outro lado, o comprimento de onda de emissão e excitação assim como a geometria, influenciam a eficiência de processos radiativos, o rendimento quântico de fluorescência, as distâncias entre doador e aceitador e a viscosidade do meio, influenciam a eficiência de processos não-radiativos. Sumariamente, os processos de transferência radiativa resultam no decréscimo de fluorescência na zona de sobreposição espectral, sendo esse efeito no do espectro de fluorescência chamado de efeito de filtro interno (IFE).⁸⁴

A extinção de fluorescência pode ocorrer por processos dinâmicos ou estáticos, dependendo do tipo de interação que ocorra entre o analito e o fluoróforo. Em processos dinâmicos, ocorre uma colisão entre a espécie emissora e o analito durante o tempo de vida do estado excitado do doador. Desta colisão ocorre transferência eletrônica, da qual resulta um retorno ao estado fundamental, sem emissão de fótons. Por seu turno, em processos estáticos, ocorre a formação de um complexo não-fluorescente entre o analito e a espécie emissora. Após irradiação, este complexo regressa de imediato ao estado fundamental sem emissão de fótons, significando que a emissão observada se deve a espécies emissoras não complexadas.^{84,85}

O formalismo de Stern-Volmer é apresentado pela Equação II-6 e quantifica a sensibilidade do fluoróforo quando na presença de um dado analito (Q).⁸⁴

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad \text{Equação II-6}$$

Na equação, F_0 e F são as intensidades de fluorescência no estado estacionário, na ausência e na presença de analito, respectivamente, K_{SV} é a constante de Stern-Volmer e $[Q]$ a concentração de Q . Geralmente, traça-se um gráfico F_0/F vs. Q ; se a variação for linear, o declive obtido é diretamente o valor de K_{SV} . A determinação dos tempos de vida dos fluoróforos é o método mais expedito para comprovar a ocorrência de um mecanismo dinâmico ou estático. Se o mecanismo for dinâmico observar-se-á uma diminuição do tempo de vida com o aumento da concentração do agente extintor (analito). Caso não ocorra qualquer alteração no valor do tempo de vida do sistema em consideração (par-fluoróforo-analito) o mecanismo será puramente estático.^{84,85} As equações seguintes definem as respectivas K_{SV} para mecanismos dinâmicos (Equação II-7) e estáticos (Equação II-8):

$$K_D = k_q \tau_0 \quad \text{Equação II-7}$$

$$K_S = \frac{[F][Q]}{[F][Q]} \quad \text{Equação II-8}$$

onde K_D e K_S são as constantes de Stern-Volmer dinâmica e estática, respectivamente; k_q é a constante de extinção bimolecular, τ_0 o tempo de vida do fluoróforo na ausência de Q , $[F]$ e $[Q]$ são as concentrações de fluoróforo e analito, respectivamente e $[FQ]$ é a concentração do complexo não fluorescente.⁸⁴

Mecanismos estáticos e dinâmicos podem concorrer entre si, resultando num desvio à linearidade na curva de Stern-Volmer.⁸⁴ As constantes de Stern-Volmer determinadas serão indicadas por K_{SV} (independentemente do mecanismo), que se virá a comprovar como sendo um mecanismo de extinção estático.

II.4.1.1 – Avaliação Sensorial em Solução

A avaliação sensorial dos NPsC na deteção de proteínas foi realizada por titulação de dispersões aquosas de fluoróforo (0.01 mg/mL) em tampão fosfato 50 mM (pH 7.2) com adição de concentrações conhecidas de proteína e um período de incubação de 10 minutos antes de cada leitura (UV-Vis e fluorescência).

Os espectros de emissão foram traçados à t.a. numa célula de quartzo de 1cm de passo ótico e com um varrimento de 300 nm até 700 nm, com geometria de 90° relativamente à excitação. O comprimento de onda de excitação será indicado caso a caso.

Os valores de K_{SV} apresentados correspondem à zona linear das curvas, tendo sido determinados pelo valor das áreas das respetivas curvas dos espectros de emissão de fluorescência.

II.4.1.1.1 – Detecção de Proteínas

A hemoglobina humana (Hb) foi a primeira proteína testada no presente estudo. Fizeram-se ensaios com hemoglobina humana Fe^{3+} (MetHb) e Fe^{2+} (OxyHb), citocromo *c* (Cyt *c*), mioglobina (Mio) e lisozima (Lys).

A avaliação da capacidade sensorial dos NPsC foi realizada por espectroscopia de fluorescência e quantificada pelo formalismo de Stern-Volmer (K_{sv}), parâmetro diretamente correlacionado com a sensibilidade sensorial do fluoróforo a um dado analito. A Figura II.38 exhibe o decréscimo da intensidade de fluorescência dos NPsC com as sucessivas adições de MetHb, com o máximo de emissão a ca. 406 nm.

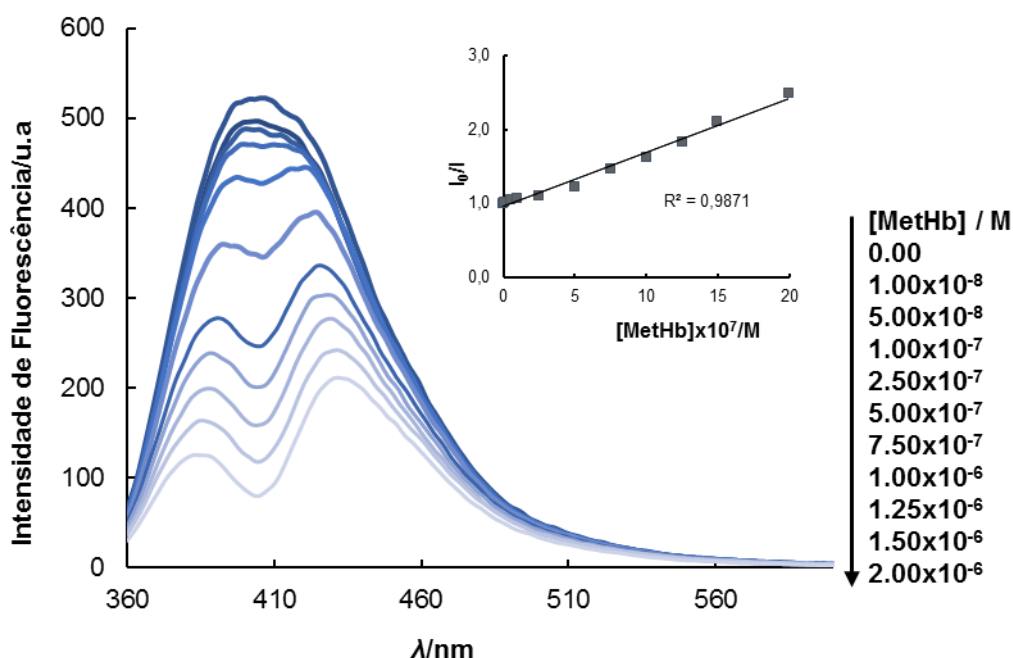


Figura II.38 - Espectros de emissão de dispersões aquosas de NPsC (0.01 mg/mL) na presença de quantidades crescentes de MetHb (pH=7.2) ($\lambda_{exc} = 340$ nm). *Inset*: Curva de Stern-Volmer.

Foi obtido um K_{SV} de $7.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ numa gama de concentração de Hb de 10 nM a 2 μM . A sensibilidade dos NPsC à OxyHb na mesma gama de concentração foi menos acentuada ($K_{sv} = 3.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) (Figura II.39), exibindo o seu máximo de emissão a 414 nm.

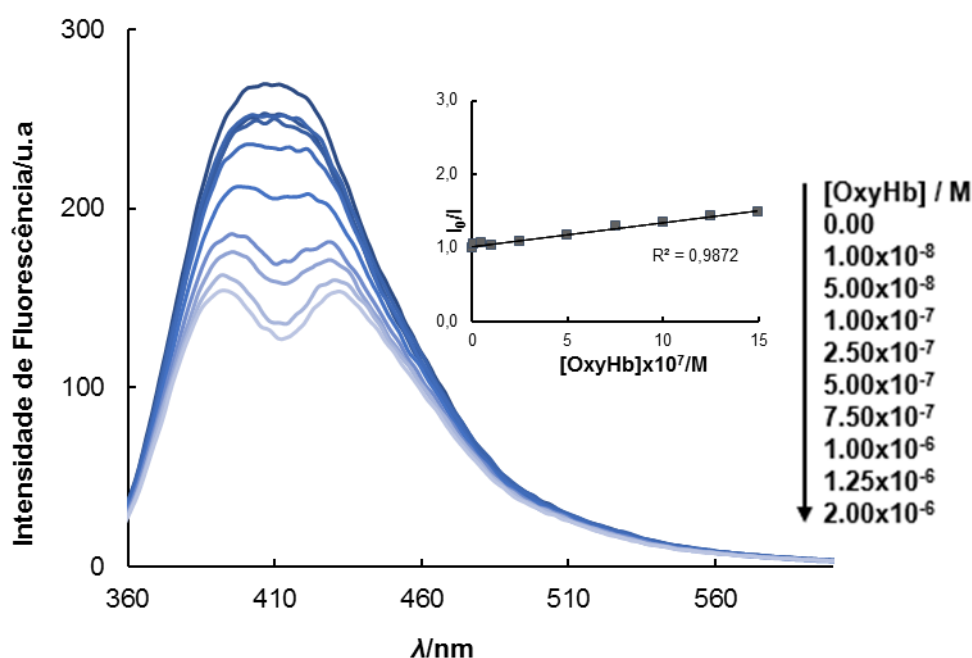


Figura II.39 - Espectros de emissão de dispersões aquosas de NPsC (0.01 mg/mL) na presença de quantidades crescentes de OxyHb (pH=7.2) ($\lambda_{exc} = 340 \text{ nm}$). *Inset*: Curva de Stern-Volmer.

No sentido de explorar o mecanismo envolvido no processo de extinção da fluorescência dos NPsC quando na presença das proteínas, foram avaliados os integrais de sobreposição dos espectros de emissão dos nanomateriais e os espectros de absorção dos analitos testados.

Verificou-se que os espectros de emissão dos NPsC se sobrepõem aos espectros de absorção de ambas as formas de Hb (Fe^{2+} e Fe^{3+}), com valores de integrais de sobreposição $J(\lambda)$ de $2.817 \times 10^{15} \text{ nm}^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para MetHb e $2.879 \times 10^{15} \text{ nm}^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para OxyHb, sendo previsível adiantar a ocorrência de um mecanismo RET na extinção de fluorescência. Assumindo que todos os outros parâmetros envolvidos no processo de transferência de energia são idênticos, nomeadamente a orientação relativa dos dipolos de transição (k^2) do doador (NPsC) e do aceitador (proteína), outros fatores estarão envolvidos dada a diferença observada nos valores de K_{SV} . Assim, efeitos

primários e secundários de filtro interno (IFEs) originados pelo analito poderão ser também os responsáveis pela redução de emissão dos NPsC e consequentemente, responsáveis pelos diferentes valores de K_{SV} obtidos. De fato, o aumento de concentração de proteína durante o ensaio, conduz a uma alteração do perfil de emissão dos NPsC (pico máximo inicial a ca. 407 nm), indicando claramente a ocorrência de IFEs secundários. Este efeito foi menos pronunciado na presença da OxyHb, cujo máximo de absorção se encontra mais desviado para o vermelho (414 nm), ajudando a explicar, pelo menos em parte, os diferentes valores de K_{SV} . Alterando o comprimento de onda de excitação no ensaio de *quenching* ($\lambda_{exc} = 380$ nm) (Figura II.40) foi obtido um menor valor de K_{SV} com MetHb (4.3×10^5 M⁻¹), observando-se um desvio batocrômico no máximo de emissão dos NPsC ($\lambda_{em\ max} = 437$ nm). Este resultado era expectável dado que apenas uma pequena proporção de luz emitida pelos NPsC foi absorvida pela MetHb, levando a uma menor contribuição dos IFEs para a extinção de fluorescência global.

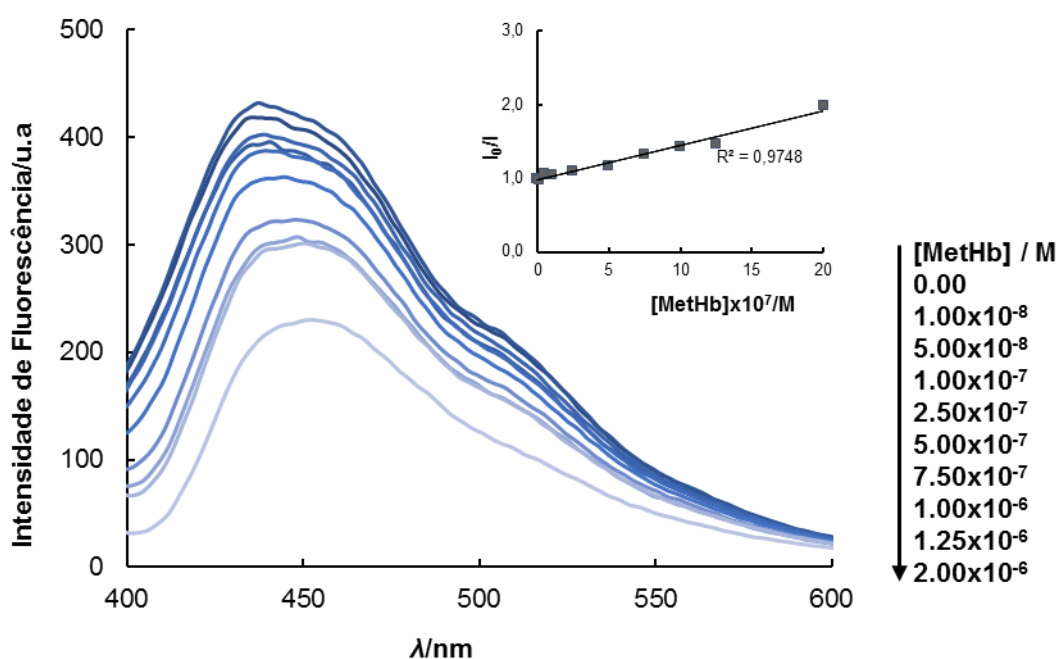


Figura II.40 - Espetros de emissão de dispersões aquosas de NPsC (0.01 mg/mL) na presença de quantidades crescentes de MetHb (pH=7.2) ($\lambda_{exc} = 380$ nm). *Inset*: Curva de Stern-Volmer.

Resultado similar foi obtido com a OxyHb como analito (Figura II.41) originando um K_{SV} de 2.3×10^5 M⁻¹.

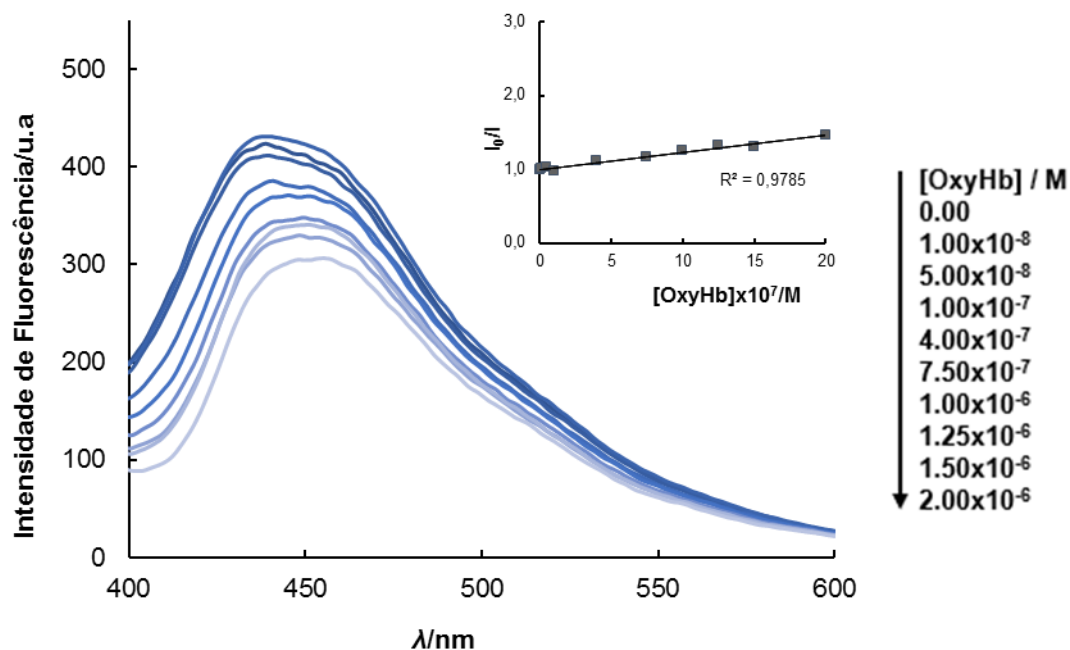


Figura II.41 - Espectros de emissão de dispersões aquosas de NPcC (0.01 mg/mL) na presença de quantidades crescentes de OxyHb (pH=7.2) ($\lambda_{exc} = 380$ nm). *Inset*: Curva de Stern-Volmer.

De modo a excluir a possibilidade de o decréscimo de intensidade de emissão de fluorescência se dever a interações não específicas estabelecidas entre os NPcC e as proteínas, levando à ocorrência de agregados/aglomerados de nanopartículas e *self-quenching*, foi realizado um ensaio de controlo nas mesmas condições dos ensaios anteriores utilizando uma proteína altamente básica (Lys), desprovida de qualquer grupo prostético. Como esperado, não ocorreu extinção de fluorescência com significado na emissão dos NPcC (Figura II.42).

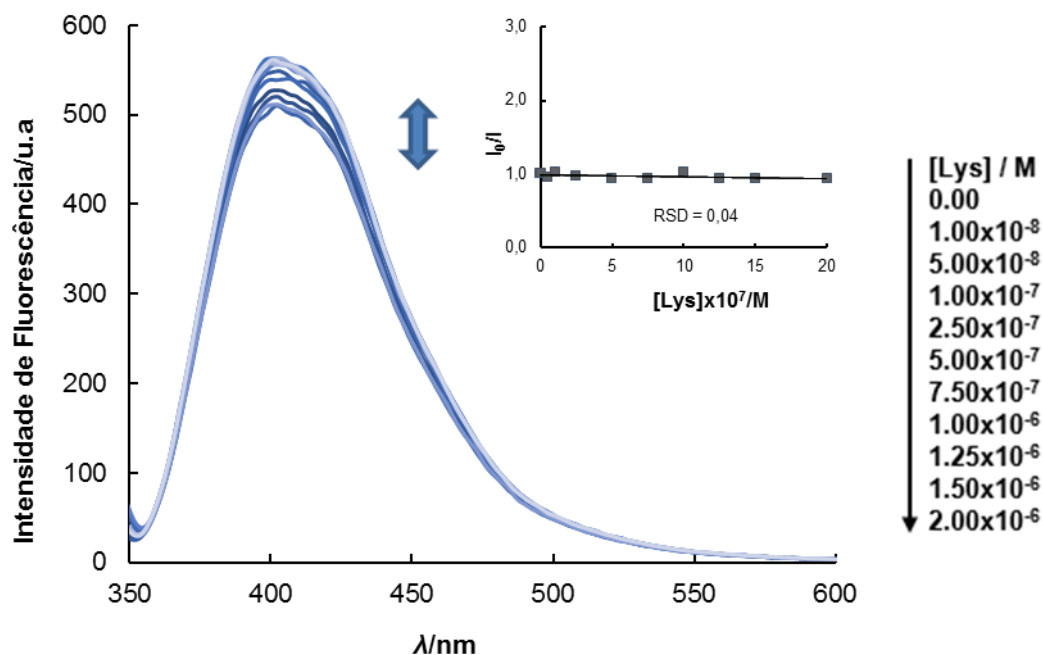


Figura II.42 - Espectros de emissão de dispersões aquosas de NPsC (0.01 mg/mL) na presença de quantidades crescentes de Lys (pH=7.2) ($\lambda_{exc} = 340$ nm). *Inset*: Curva de Stern-Volmer.

A sensibilidade dos NPsC a mioglobina e o citocromo *c* foi testada em condições idênticas às aplicadas nos ensaios com a hemoglobina. Os NPsC foram igualmente sensíveis a estas proteínas, embora com menores valores de K_{sv} , $3.6 \times 10^5 M^{-1}$ e $2.2 \times 10^5 M^{-1}$, respetivamente para Mio e Cyt *c* (Figura II.43 e Figura II.44).

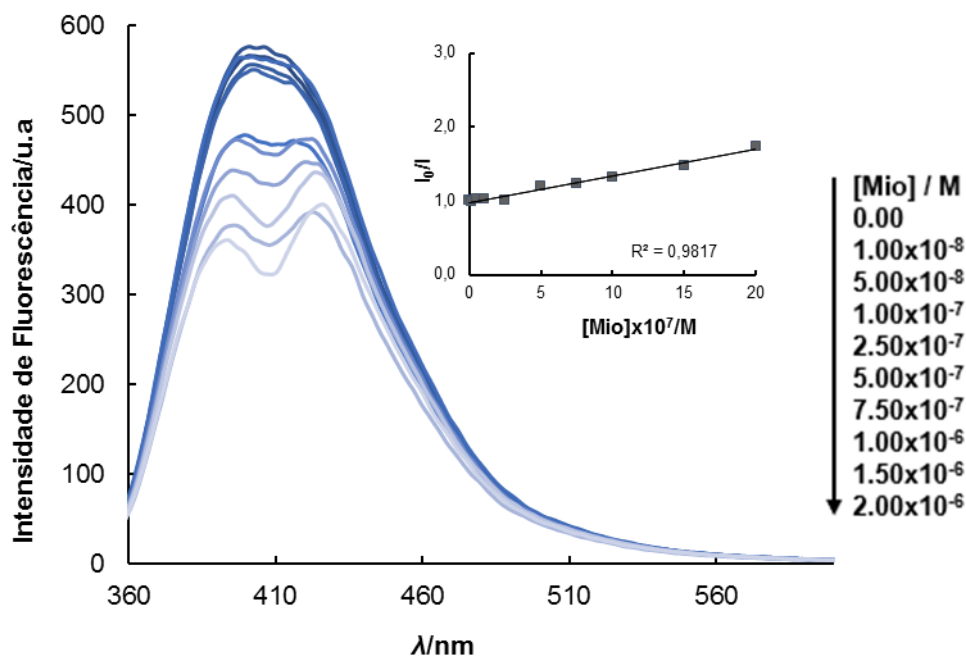


Figura II.43 - Espectros de emissão de dispersões aquosas de NPcC (0.01 mg/mL) na presença de quantidades crescentes de Mio (pH=7.2) ($\lambda_{exc} = 340$ nm). *Inset*: Curva de Stern-Volmer.

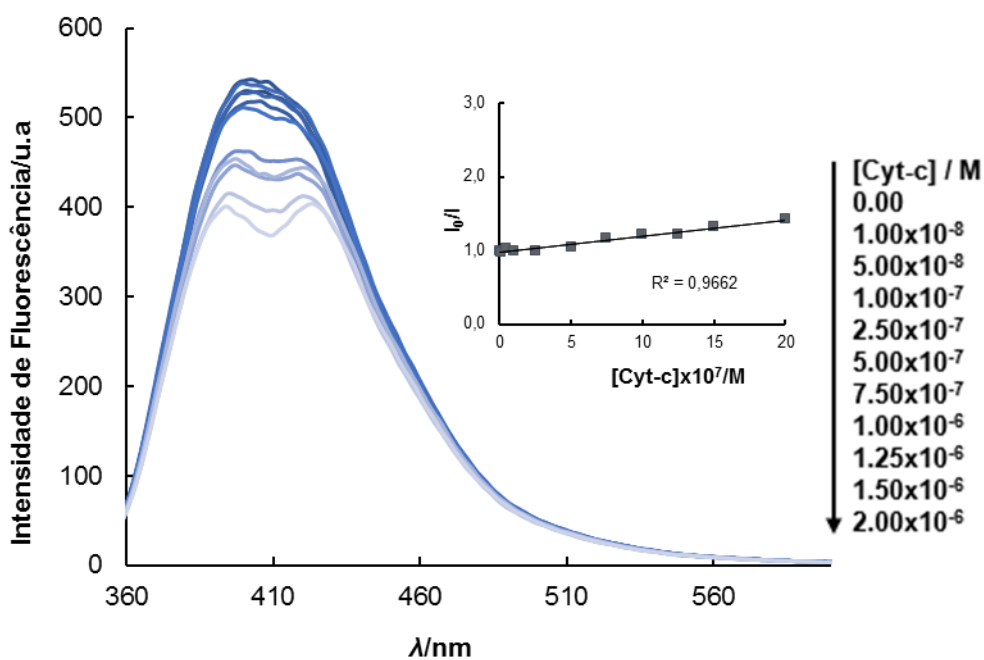


Figura II.44 - Espectros de emissão de dispersões aquosas de NPcC (0.01 mg/mL) na presença de quantidades crescentes de Cyt c (pH=7.2) ($\lambda_{exc} = 340$ nm). *Inset*: Curva de Stern-Volmer.

Uma particularidade interessante reside no facto de os NPsC serem aptos na deteção de Lys. Após a interação dos NPsC com a MetHb, ficou provado ocorrer extinção de fluorescência significativa na emissão do fluoróforo. Verificou-se que a adição progressiva de Lys à mistura NPsC-MetHb, resulta no aumento de fluorescência (*turn-on*) da emissão dos NPsC, quantificada mais uma vez, pelo formalismo de Stern-Volmer (Figura II.45).

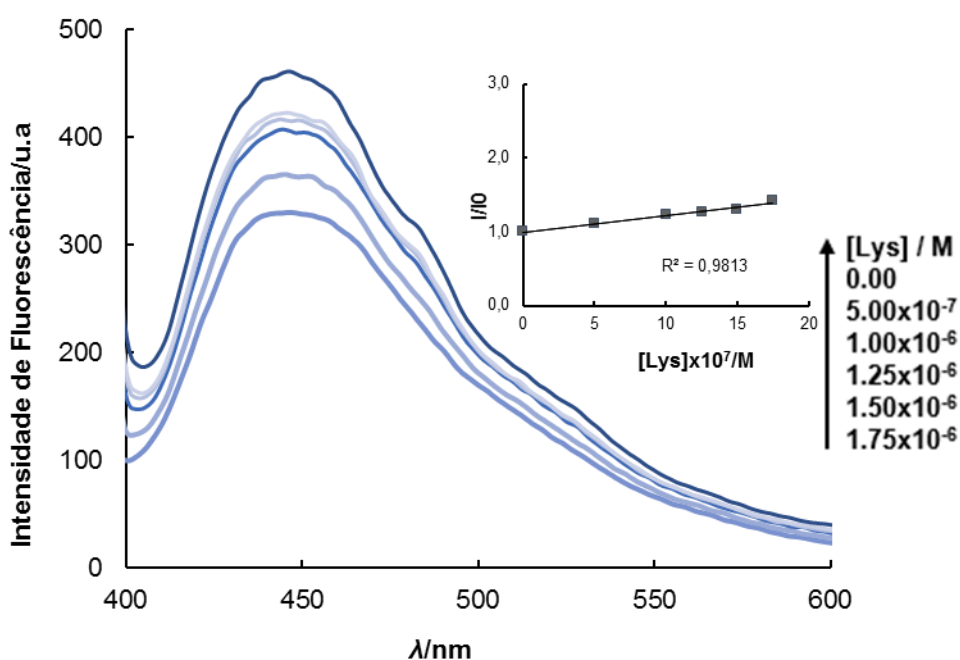


Figura II.45 - Espectros de emissão de dispersões aquosas de NPsC (0.01 mg/mL) na presença de MetHb (1nM) e quantidades crescentes de Lys (pH=7.2) ($\lambda_{exc} = 380$ nm). *Inset*: Curva de Stern-Volmer.

A comprovada sensibilidade dos NPsC obtidos a partir das AR-2F-16 quando na presença de MetHb, ficou demonstrada nos ensaios anteriores. Nesse sentido, foram realizados ensaios similares com MetHb e OxyHb utilizando os NPsC produzidos a partir das AR-2F-17 (NPsC-AR-2F-17-XII-I) (Figura II.46 e Figura II.47). Os ensaios foram realizados no estado estacionário e também um ensaio adicional de decaimento de fluorescência dos NPsC na presença de quantidades crescentes de MetHb, com o objetivo de clarificar o mecanismo de extinção predominante (mecanismo dinâmico ou apenas mecanismo estático).

Foram obtidos valores de K_{SV} $4.23 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e $2.23 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ respectivamente para MetHb e OxyHb, valores inferiores aos obtidos para os NPsC provenientes das AR-2F-16 (NPC-AR-2F-16-III). Este último resultado poderá ter origem no facto de este efluente ter originado NPsC com um máximo de emissão desviado para o vermelho ca. 35 nm, reduzindo os IFEs provenientes da MetHb e da OxyHb (consequentemente com um menor integral de sobreposição).

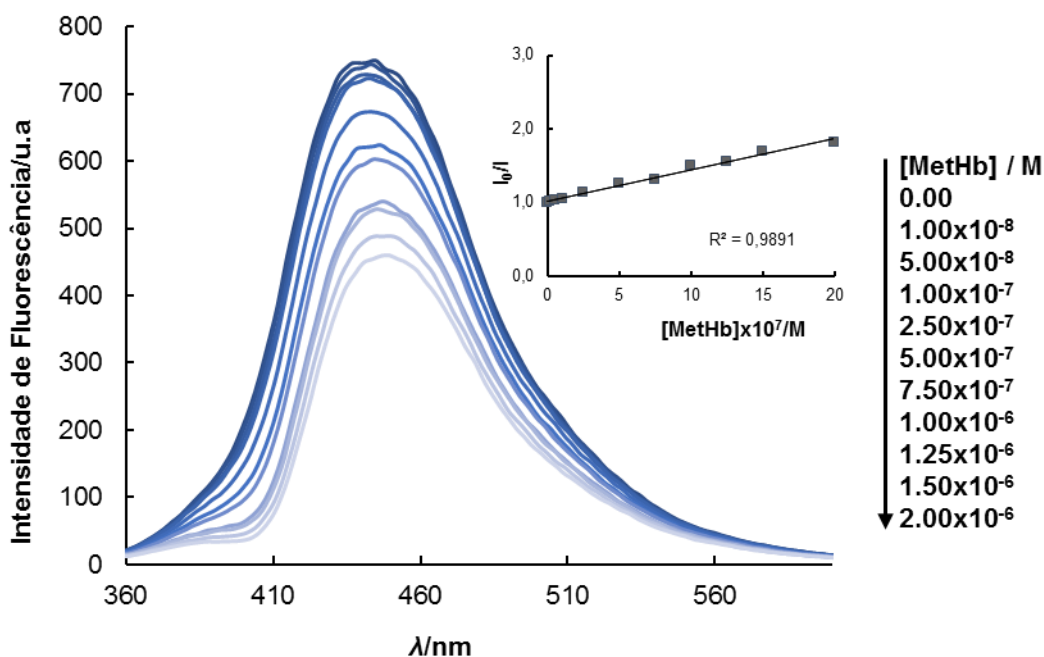


Figura II.46 - Espectros de emissão de dispersões aquosas de NPsC (0.01 mg/mL) na presença de quantidades crescentes de MetHb (pH=7.2) ($\lambda_{exc} = 340 \text{ nm}$). *Inset*: Curva de Stern-Volmer.

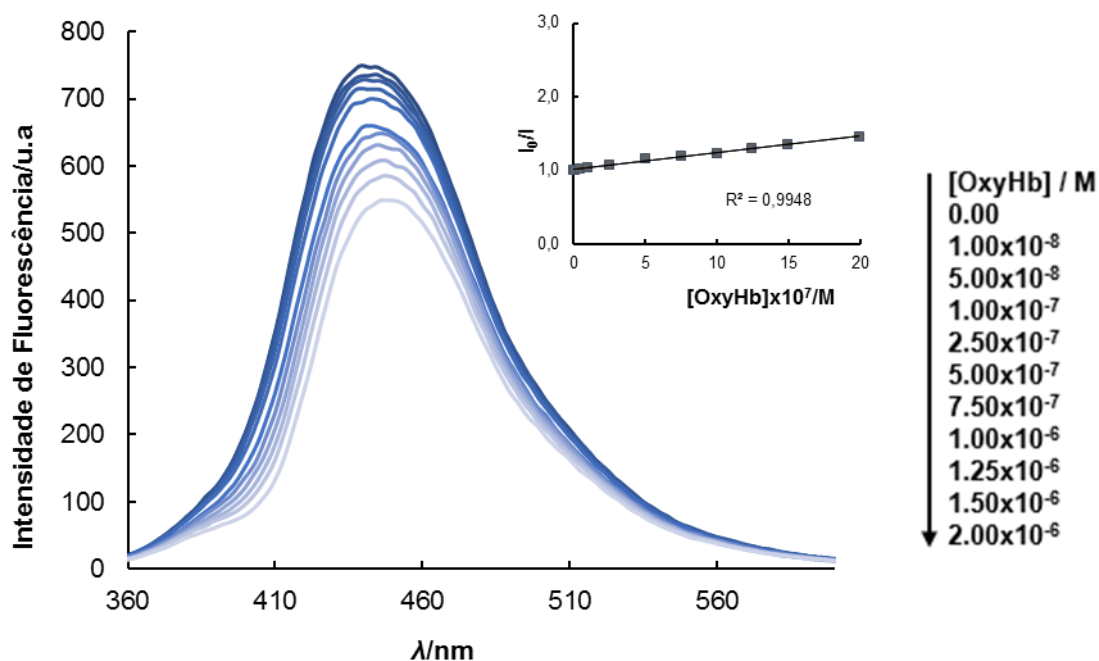


Figura II.47 - Espectros de emissão de dispersões aquosas de NPcC (0.01 mg/mL) na presença de quantidades crescentes de OxyHb (pH=7.2) ($\lambda_{exc} = 340$ nm). *Inset*: Curva de Stern-Volmer.

Os dados recolhidos através de medições de fluorescência resolvida no tempo e coligidos na Tabela II.27 mostram que não há alteração no tempo de vida do fluoróforo, o que permite adiantar que o mecanismo de extinção será estático, ocorrendo a formação de um complexo MetHb+NPcC que exibe um estado excitado não emissivo. Esta possibilidade é reforçada pelo resultado do ensaio realizado na presença de Lys, onde se observou um *turn-on* na emissão do fluoróforo, evidenciando a formação prioritária do complexo de Lys dada a afinidade desta proteína com a superfície dos NPcC, dado o valor do seu ponto isoelectrico (pI), sendo este complexo emissivo.

Tabela II.27 - Tempos de vida de dispersões aquosas de NPsC (NPsC-AR-2F-17-XII-I) (0.01 mg/mL) (pH=7.2) na presença de quantidades crescentes de MetHb (0 - 2×10^{-6} M).

MetHb/M	a_1 /%	τ_1 /ns	a_2 /%	τ_2 /ns	$\tau_{\text{média}}$ /ns
0	90.1	11	9.9	2	10
5×10^{-8}	89.8	11	10.2	2	10
2.5×10^{-7}	88.8	11	11.2	2	10
7.5×10^{-7}	89.0	11	11.0	2	10
1×10^{-6}	89.5	11	10.5	2	10
1.25×10^{-6}	89.0	11	11.0	2	10
1.5×10^{-6}	88.5	11	11.5	2	10
2×10^{-6}	89.2	11	10.8	2	10

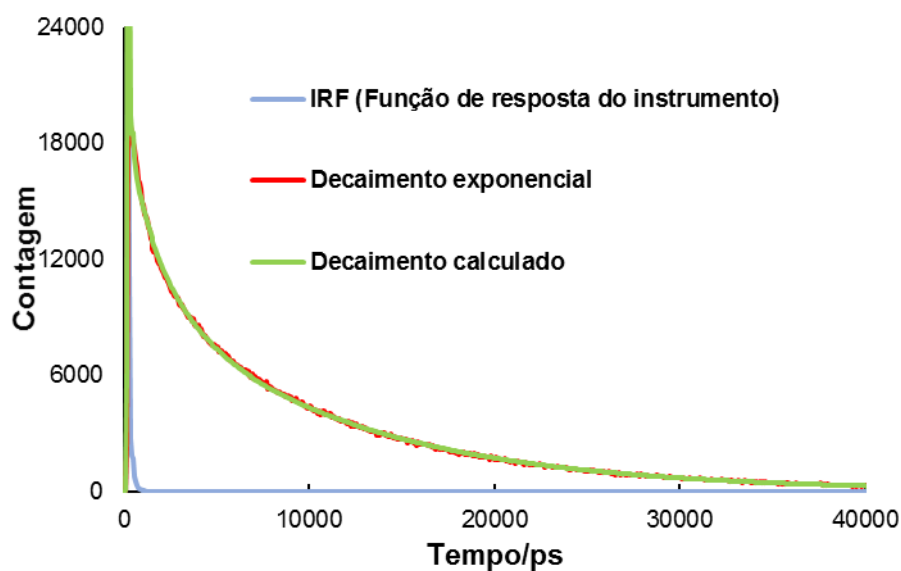


Figura II.48 - Decaimento da emissão de NPsC-AR-2F-17-XII-I [0.01 mg/mL] e Hb [2×10^{-6} M] (pH=7.2); ($\lambda_{\text{exc}}=340$ nm; $\lambda_{\text{em}}=440$ nm).

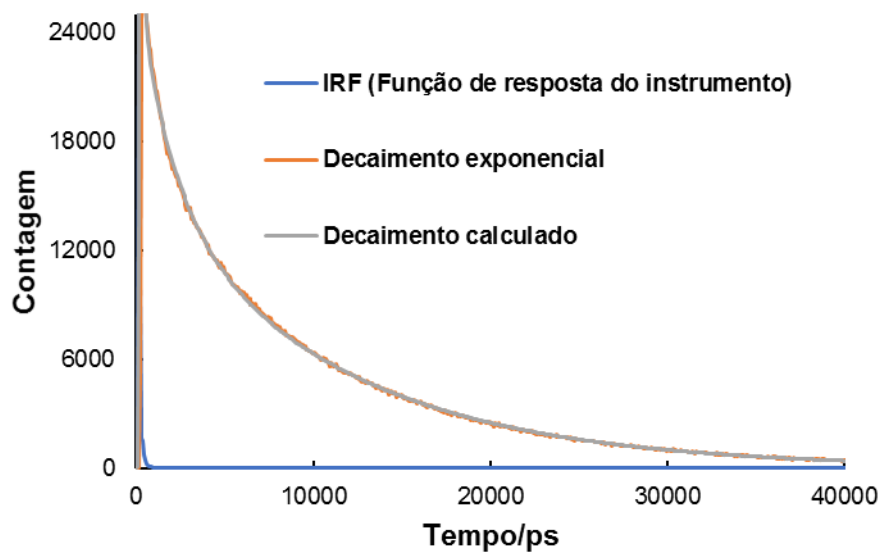


Figura II.49 - Decaimento da emissão de NPsC-AR-2F-17-XII-I [0.01 mg/mL] (pH=7.2); (λ_{exc} =340 nm; λ_{em} =440 nm).

III PARTE EXPERIMENTAL

III.1 – PREÂMBULO

A Parte Experimental englobará as seguintes Secções:

III.2 - Reagentes, Técnicas Gerais e Equipamento

III.3 - Caracterização das Águas Residuais do Processamento Industrial do Azeite (ARPIA)

III.4 - Síntese dos NPsC

III.2 – REAGENTES, TÉCNICAS GERAIS E EQUIPAMENTO

Os reagentes/solventes de pureza analítica foram utilizados na forma em que foram recebidos.

Os ensaios de síntese dos NPsC por tratamento hidrotérmico foram efetuados num reator de alta-pressão em aço inox (Parr, modelo 4560) de 300 mL de capacidade, equipado com sensores/controladores de pressão, temperatura e agitação (Parr modelo 4843).

Ao longo do texto serão descritos os métodos de processamento/isolamento dos produtos, sendo que o método empregue foi a filtração por membrana de celulose de 0.2 μm da Macherey-Nagel.

A diálise foi realizada com uma membrana Spectra/Por[®]6 Pre-wetted RC Tubing, MWCO 1000 Da, em água Millipore[®].

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram traçados num espectrofotómetro Brüker Vertex 70 com uma resolução de 2 cm^{-1} . Na descrição de cada espectro, os dados serão indicados da seguinte forma: $\nu_{\text{máx}}$ (estado da amostra: pastilha de KBr (brometo de potássio)); n° de onda (cm^{-1}) correspondente à frequência do máximo de absorção de uma banda, característica da banda (f, forte; m, média; fr, fraca; l, larga; o, ombro), atribuição de vibração a um agrupamento molecular.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de protão (RMN ^1H , 400 MHz) e de carbono desacoplado (RMN ^{13}C , 100 MHz) foram realizados num espectrómetro Brüker AVANCE II+ (400 MHz), utilizando D_2O ou MeOH-d_4 como solvente.

Os espectros de ultravioleta-visível (UV-Vis) foram traçados num espectrofotómetro de dicroísmo circular (Jasco, modelo J-815); as concentrações/solventes das soluções utilizadas serão indicadas caso a caso.

Os espectros de fluorescência no estado estacionário foram obtidos num espectrofluorímetro Perkin Elmer, modelo LS45, utilizando geometria a 90° . As condições de realização de cada ensaio serão apresentadas para cada caso. Todos os ensaios foram realizados a 25°C , utilizando células de quartzo de 1 cm.

A dinâmica relativa ao decaimento de intensidade de fluorescência em picosegundos foi obtida pelo método de temporização de fóton único com excitação a laser, utilizando um *set-up* descrito em Menezes et al.⁸⁶

Os rendimentos quânticos de fluorescência foram determinados em H₂O, utilizando sulfato de quinino em H₂SO₄ 0.01 M como padrão ($\phi_f = 0.54$,⁸⁷ em condições de equilíbrio com o ar e geometria a 90°), através do método do declive.⁸⁸

As análises de termogravimetria (TG) foram efetuadas num calorímetro Netzsch Luxx, modelo STA 409 PC, utilizando uma taxa de aquecimento de 7°C min⁻¹.

A microscopia eletrónica de transmissão (TEM) foi efetuada num microscópio Hitachi, modelo H-8100 (200 kV), utilizando uma grelha de cobre de 200 mesh com filme de Formvar Carbon. As dispersões aquosas foram depositadas no suporte e evaporadas naturalmente a 20°C.

A microscopia de fluorescência foi realizada num microscópio Zeiss, modelo Axiovert 40 CFL, equipado com lâmpada de vapor de mercúrio HBO de 100 W e conjunto de filtros nº 49 da Zeiss (excitação 365 nm). As imagens foram obtidas através de uma câmara digital acoplada.

A determinação do pH nas diversas soluções de NPsC foi realizada num aparelho de pH da marca Denver Instrument, modelo 215.

As análises elementares foram efetuadas no Serviço de Microanálise (C.A.C.T.I.) da Universidade de Vigo.

As leituras de condutividade foram efetuadas com um condutivímetro WTW-Multi 340i equipado com um elétrodo WTW Tetra Com[®] 325.

As proteínas utilizadas nos ensaios de deteção (citocromo *c* (>95%, SDS-PAGE) e mioglobina (>90%), ambos de coração de cavalo, lisozima (>90%) da clara de ovo, hemoglobina humana (pó liofilizado, (Hb)) e hemoglobina humana de ferro estabilizado A₀ (pó liofilizado, (oxyHb))) foram adquiridas à Sigma-Aldrich e foram utilizadas conforme recebidas.

As AR-2F utilizadas foram recolhidas de uma unidade industrial de extração de azeite na região de Santarém, Portugal, operando um processo de centrifugação 2 fases. Após serem recolhidas, as AR-2F foram guardadas a -15 °C em garrafas de polietileno até utilização. Antes de cada ensaio, as AR-2F foram estabilizadas à temperatura de ca. 20°C e homogeneizadas por agitação. As duas amostras de AR-2F foram recolhidas em novembro de 2016 (AR-2F-16) e em novembro de 2017 (AR-2F-17).

As AR-P sofreram o mesmo processo de conservação, estabilização e homogeneização que as AR-2F. Estas foram recolhidas numa unidade industrial na região de Santarém, Portugal, em novembro de 2016.

III.3 – CARACTERIZAÇÃO DAS ÁGUAS RESIDUAIS DO PROCESSAMENTO INDUSTRIAL DO AZEITE

III.3.1 – Quantificação de Sólidos Totais

Para a quantificação de sólidos totais nas ARPIA, evaporou-se uma amostra de 250mL à secura e o resíduo castanho obtido foi seco sob vácuo a 105°C durante duas horas.

III.3.2 – Quantificação de Fenóis Totais^{64,65}

A determinação dos fenóis totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu^{64,65}. Adicionou-se 1.5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (10% v/v) a uma alíquota de 200 µL de ARPIA (previamente diluída) e incubou-se durante 5 min. Decorrido esse período, adicionaram-se 1.5 mL de NaHCO₃ (60 g/L). Ao fim de 90 min de incubação, a 25°C, procedeu-se à leitura da absorvância a 725 nm. O conteúdo em fenóis totais foi quantificado com recurso a padrões de ácido gálico, ácido tânico e vanilina, numa gama de concentrações de 0 a 250 µg mL⁻¹. A determinação dos fenóis totais nas ARPIA foi feita em triplicado.

III.3.3 – Quantificação de Flavonóides Totais⁶⁷

O conteúdo de flavonóides presente nas ARPIA foi determinado por um método espectrofotométrico baseado na formação de complexos entre o alumínio e os flavonóides. A um alíquota de 1 mL de ARPIA (previamente diluída em H₂O), adicionaram-se 0.5 mL de uma solução de AlCl₃ (2% m/v) e 0.5 mL de H₂O. Agitou-se e após 10 min de incubação, a 25°C, procedeu-se à leitura da absorvância a 427 nm. A análise quantitativa foi efetuada usando quercetina como padrão, numa gama de concentrações de 0 a 75 µg mL⁻¹. As leituras referentes às ARPIA foram efetuadas em triplicado.

III.3.4 – Quantificação de Taninos⁶⁸

A 20 mL de ARPIA adicionaram-se 1.3 g de pó de pele cromado, mantendo-se sob agitação durante 30 min. Filtrou-se a suspensão por funil de Büchner, obtendo-se um filtrado límpido. De seguida, o filtrado foi sujeito a um método colorimétrico, onde uma alíquota de 200 µL de filtrado foi utilizada no método de Folin-Ciocalteu, tal como descrito anteriormente. A diferença entre fenóis totais nas ARPIA e no filtrado corresponde à fração de taninos. Todas as determinações foram feitas em triplicado.

III.3.5 – Quantificação de Açúcares Totais⁶⁹

A uma alíquota de 0.5 mL de ARPIA (previamente diluída) adicionaram-se 0.5 mL de uma solução de fenol (80% m/m). De seguida adicionaram-se, rapidamente, 2.5 mL de H₂SO₄ 96% diretamente sobre a superfície da solução anterior. A solução resultante foi devidamente agitada e deixada em repouso durante 25 min a 25°C. Ao fim deste período procedeu-se à leitura da absorvância a 488 nm. A curva de calibração foi traçada utilizando *D*-glucose como padrão, numa gama de concentrações de 0 a 50 µg mL⁻¹. As leituras referentes às ARPIA foram como anteriormente efetuadas em triplicado.

III.3.6 – Quantificação de Cloretos⁷⁰

Na determinação de cloretos pelo método de Mohr, uma alíquota de 2.8 de ARPIA foi diluída em 50 mL de H₂O e à solução resultante foi adicionado 1 mL de K₂CrO₄ (5% m/m). Procedeu-se à titulação com AgNO₃ 0.1 M até ao aparecimento permanente da cor vermelha resultante da formação de Ag₂Cr₂O₄. As determinações foram efetuadas em triplicado.

III.3.7 – Quantificação de Cinzas⁷³

Os ensaios foram realizados em triplicado. Os cadinhos de porcelana, previamente secos a 105°C durante uma hora, foram colocados numa mufla a 550°C durante 4 horas. Após este período, foram arrefecidos num exsiccador durante 1 hora. Quantificou-se a amostra colocada em cada cadinho (NPsC ou ARPIA) e colocou-se na mufla a 550°C. Após um período de ca. 12/24 horas, arrefeceu-se em exsiccador até peso constante e quantificou-se o sólido cinzento resultante.

III.3.8 – Quantificação de Nitratos⁷²

A uma alíquota de 100 µL de ARPIA (previamente diluída) adicionou-se 0.4 mL de solução de ácido salicílico 5% (m/v) em H₂SO₄, agitou-se e deixou-se em repouso à t.a. durante 20 min. Concluído este período, adicionaram-se 9.5 mL de NaOH 2N, agitou-se e procedeu-se à leitura da absorvância a 415 nm. A curva de calibração foi traçada com NaNO₃ como padrão, numa concentração de 0 a 250 µg mL⁻¹. A determinação de nitratos nas ARPIA foi efetuada em triplicado.

III.3.9 – Quantificação de Lípidos

Uma amostra de ca. 250 mL de ARPIA foi extraída com 3x100 mL de n-hexano. As fases orgânicas juntas foram secas com sulfato de magnésio, filtradas por gravidade, evaporadas a T<40°C e secas sob vácuo a 40°C. No final, quantificou-se o total de lípidos extraído com n-hexano. O ensaio foi realizado em duplicado.

III.3.10 – Quantificação de Proteínas

A uma alíquota de 1 mL de ARPIA (previamente diluída) adicionou-se 1 mL de solução de azul brilhante de coomassie (G250 \geq 0.06% (m/m) em HCl (0.6 N)), agitou-se e deixou-se em repouso durante 2 min. Decorrido esse período procedeu-se à leitura da absorvância a 620 nm. A curva de calibração foi traçada com BSA (Bovine Serum Albumin) como padrão, numa gama de concentrações de 0 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A determinação de proteínas nas ARPIA foi efetuada em triplicado.

III.3.11 – Determinação de CQO e CBO

As determinações de CQO e CBO foram efetuadas através de métodos reportados.⁷⁵

III.4 – SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DOS NPSC

Na síntese dos NPSC por tratamento hidrotérmico foram utilizadas três fontes de carbono, todas provenientes de ARPIA, mas obtidas por processos de extração do azeite distintos: centrifugação de duas fases (AR-2F-16 e AR-2F-17) e extração por prensa.

III.4.1 – Síntese dos NPSC derivados das AR-2F-16

Tipicamente, 120 mL (ou 60 mL) de AR-2F-16 e uma dada quantidade de ED, foram colocadas no reator de aço inox, sendo este devidamente selado e as condições do ensaio programadas. As condições reacionais de cada ensaio são apresentadas na Secção II.3.1.1. Os NPSC obtidos com melhor rendimento quântico são designados por NPSC-AR-2F-16-III no capítulo dos Resultados e Discussão.

III.4.2 – Síntese dos NPSC derivados das ARPIA

Uma amostra de ARPIA foi diluída em AR-2F-16 até perfazer um volume de 120 mL. A esta mistura juntou-se uma determinada proporção de ED, transferindo a m.r. resultante para o reator de aço inox, sendo este devidamente selado e as condições do ensaio programadas. As condições reacionais estão apresentadas na Secção II.3.2.1, sendo o ensaio com melhor rendimento quântico designado por NPSC-ARP-III.

III.4.3 – Síntese dos NPSC derivados das AR-2F-17

Tipicamente, 120 mL de AR-2F-17 e uma determinada quantidade de ED, foram colocadas no reator de aço inox, sendo este devidamente selado e as condições do ensaio programadas. De seguida, desarejou-se a m.r. introduzindo N_2 (pressão até 2 bar), libertando depois este último abrindo a válvula de saída do sistema, sendo o procedimento realizado três vezes. Posteriormente, fez-se passar N_2 continuamente durante 3 min. Após este período deixou-se a m.r. sob pressão positiva de azoto (ca. 2 bar). As condições reacionais de cada ensaio estão discutidas na Secção II.3.3.1, sendo

o ensaio com melhor rendimento quântico designado NPsC-AR-2F-17-XII. Os NPsC derivados deste efluente e obtidos em atmosfera oxidativa (*cf.* ensaios de AR-2F-16), serão tratados ao longo da Secção II.3.3.1.

III.4.4 – Purificação dos NPsC por Extração líquido-líquido

Uma amostra de 100 mL de NPsC foi extraída com 2x75 mL de CH₂Cl₂ e com 2x75 mL de AcOEt, obtendo no final uma fase aquosa e duas orgânicas. As fases orgânicas foram secas com sulfato de magnésio, filtradas por gravidade, evaporadas a T<50°C e secas sob vácuo a 50°C. A fase aquosa foi colocada sob vácuo de forma a retirar restos de solvente orgânico proveniente da extração e guardada tal e qual sob atmosfera inerte.

III.4.5 – Purificação de NPsC por Sephadex G75

Uma amostra de 18 mL de NPsC-AR-2F-16-XV (*ca.* 25.2 mg) foi carregada numa coluna cromatográfica com Sephadex G75, previamente preparado (descrição *cf.* segue), e recolhidas várias frações.

Previamente, 2.5 mg de Sephadex G75 foram suspensos em 150 mL de água Millipore® e a suspensão aquecida a 90°C, com agitação, durante três horas. A suspensão foi mantida em repouso durante quatorze dias. Recolheu-se o sobrenadante e lavou-se o gel com água Millipore® (três vezes), levando ao ultrasons. Transferiu-se o gel para uma coluna cromatográfica (d= 1cm; h=20 cm) e deixou-se repousar durante 24h. Após a eluição, o Sephadex é reutilizado após sucessivas lavagens com água Millipore® (controlo da eficiência da lavagem recorrendo à medição da condutividade do eluato).

IV CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

O desenvolvimento dos novos nanopontos de carbono utilizando como fonte de carbono águas residuais do processamento industrial do azeite (ARPIA) foi conseguido com rendimentos quânticos significativos. A aplicação destes nanomateriais como sensores altamente sensíveis e seletivos de proteínas hémicas, nomeadamente hemoglobina, foi demonstrada.

O processo sustentável desenvolvido para a valorização deste efluente por uma via termoquímica revelou-se como uma alternativa a ter em conta nos processos de aproveitamento de resíduos aquosos provenientes da indústria do azeite. Em estudos posteriores deverá ser dada particular atenção ao reaproveitamento do resíduo sólido obtido após síntese dos NPsC.

Para além das aplicações demonstradas nesta dissertação, existe uma vasta diversidade de aplicações nas quais os NPsC sintetizados poderão ser desejavelmente testados. Destas destacam-se a sua utilização como sensores químicos e biológicos, quer em dispersões aquosas quer suportados em matrizes diversas, em bioimagemologia, e em fotocatalise. Estudos referentes às três aplicações referidas estão já actualmente em curso no grupo de investigação onde esta tese foi realizada.

V Bibliografia

- ¹Kroto, H. W., Heath, J. R., O'Brien, S. C., Curl, R. F., Smalley, R. E., *Nature*, **1985**, 318, 162.
- ²Lijima, S., *Nature*, **1991**, 354, 56.
- ³Novoselov, K. S., Geim, A. K., Morozov, S. V., Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S. V., Grigorieva, I. V., Firsov, A. A., *Science*, **2004**, 306, 666.
- ⁴Georgakilas, V., Perman, J. A., Tucek, J., Zboril, R., *Chem. Rev.*, **2015**, 115 (11), 4744.
- ⁵Xu, X., Ray, R., Gu, Y., Ploehn, H. J., Gearheart, L., Raker, K., Scrivens, W. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 12736.
- ⁶Liu, W., Li, C., Ren, Y., Sun, X., Pan, W., Li, Y., Wang, J., W., *J. Mater. Chem. B*, **2016**, 4, 5772.
- ⁷Hola, K., Zhang, Y., Wang, Y., Giannelis, E. P., Zboril, R., Rogach, A. L., *Nano Today*, **2014**, 9, 590.
- ⁸Li, H., Kang, Z., Liu, Y., Lee, S.-T., *J. Mater. Chem.*, **2012**, 22, 24230.
- ⁹Zuo, P., Lu, X., Sun, Z., Guo, Y., He, H., *Microchim. Acta*, **2016**, 183, 519.
- ¹⁰Song, Y., Zhu, S., Shao, J., Yang B., *Polym.Chem.*, **2017**, 55, 610.
- ¹¹Zhu, S., Song, Y., Zhao, X., Shao, J., Zhang, J., Yang, B., *Nano Res.*, **2015**, 8 (2), 355.
- ¹²Lim, Y. S., Shen, W., Gao, Z., *Chem. Soc. Ver.*, **2015**, 44, 362.
- ¹³Chen, W., Lv, G., Hu, W., Li, D., Chen, S., Dal, Z., *Nanotechnol Rev.*, **2018**, 7 (2), 157.
- ¹⁴Sun, T.-P., Zhou, B., Lin, Y., Wang, W., Fernando, K. A. S., Pathak, P., Mezziani, M. J., Harruf, B. A., Wang, X., Wang, H., Luo, P.G., Yang, H., Kose, M. E., Chen, B., Veca, L. M., Xie, S. Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 7756.
- ¹⁵Lu, J., Yang, J., Wang, J., Lim, A., Wang, S., Loh, K., *ACS Nano*, **2009**, 3, 2367.
- ¹⁶Choi, Y., Choi, Y., Kwon, O-H., Kim B-S., *Chem. Asian J.*, **2018**, 13, 586.
- ¹⁷Zhu, S., Meng, Q., Wang, L., Zhang, J., Song, Y., Jin, H., Zhang, K., Sun, H., Wang, H., Yang, B., *Angew. Chem.*, **2013**, 125, 4045.
- ¹⁸Yang, Y., Cui, J., Zheng, M., Hu, C., Tan, S., Xiao, Y., Yang, Q., Liu, Y., *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 380.
- ¹⁹Kumar, D., Sinh, K., Verma, V., Bhatti, H.S., *J. Bionosci*, **2014**, 8, 274.
- ²⁰Du, F., Zhang, M., Li, X., Li, J., Jiang, X., Li, Z., Hua, Y., Shao, G., Jin, J., Shao, Q., Zhou, M., Gong, A., *Nanotechnology*, **2014**, 25, 315702.
- ²¹Zhang, X., Jiang, M., Niu, N., Chen, Z., Li, S., Liu, S., Li, J., *Chem. Sus. Chem.*, **2018**, 11, 11.

-
- ²²Zhu, H., Wang, X., Li, Y., Wang, Z., Yang, F., Yang, X., *Chem. Commun.*, **2009**, 34, 5118.
- ²³Qu, D., Zheng, M., Zhang, L., Zhao, H., Xie, Z., Jing, X., Haddad, R. E., Fan, H., Sun, Z., *Sci. Rep.*, **2014**, 4, 5294.
- ²⁴Kim, D., Choi, Y., Shin, E., Jung, Y. K., Kim, B.S., *RSC Adv.*, **2014**, 4, 23210.
- ²⁵Choi, Y., Kang, B., Lee, J., Kim, S., Kim, G. T., Kang, H., Lee, B. R., Kim, H., Shim, S. H., Lee, G., Kwon, O. H., Kim, B. S., *Chem. Mater.*, **2016**, 28, 6840.
- ²⁶Choi, Y., Kim, S., Choi, M. H., Ryoo, S. R., Park, J., Min, D. H., Kim, B. S., *Adv. Funct. Mater.*, **2014**, 24, 5781.
- ²⁷Das, S. K., Liu, Y., Yeom, S., Kim, D. Y., Richards, C. I., *Nano Lett.*, **2014**, 14, 620.
- ²⁸Song, Y., Zhu, S., Zhang, S., Fu, Y., Wang, L., Zhao, X., Yang, B., *J. Mater. Chem.*, **2015**, 3, 5976.
- ²⁹Tao, S., Zhu, S., Feng, T., Xia, C., Song, Y., Yang, B., *Materials Today Chemistry*, **2017**, 6, 13.
- ³⁰Fu, M., Ehrat, F., Wang, Y., Milowska, Z. K., Reckmeier, C., Rogach, L. A., Stolarczyk, K. J., Urbahn, S. A., Feldmann, J., *Nano Lett.*, **2015**, 15, 6030.
- ³¹Pan, D. Y., Guo, L., Zhang, J. C., Xi, C., Xue, Q., Huang, H., Li, J. H., Zhang, Z. W., Yu, W. J., Chen, Z. W., Li, Z., Wu, M. H., *J. Mater. Chem.*, **2012**, 22, 3314.
- ³²Wei, W., Xu, C., Wu, L., Wang, J., Ren, J., Qu, X., *Sci Rep.*, **2014**, 4, 3564.
- ³³Yan, F., Zou, Y., Wang, M., Mu, X., Yang, N., Chen, L., *Sens. Actuators, B*, **2014**, 192, 488.
- ³⁴Lim, Y. S., Shen, W., Gao, Z., *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, 44, 362.
- ³⁵Sharma, V., Tiwari, P., Mobin, M. S., *J. Mater. Chem. B*, **2017**, 5, 8904.
- ³⁶Wu, G., Feng, M., Zhan, H., *RSC Adv.*, **2015**, 5, 44636.
- ³⁷Lin, B., Yan, Y., Guo, M., Cao, Y., Yu, Y., Zhang, T., Huang, Y., Wu, D., *Food Chemistry*, **2018**, 245, 1176.
- ³⁸Yu, C., Li, X., Zeng, F., Zheng, F., Wu, S., *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 403.
- ³⁹Zhang, J., Yu, S-H., *Materials Today*, **2016**, 19 (7), 382.
- ⁴⁰Qu, F., Liu, D., You, J., *Anal. Chim. Acta*, **2016**, 921, 59.
- ⁴¹Wang, H., Zhuang, J., Velado, D., Wei, Z., Matsui, H., Zhou, S., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2015**, 7, 27703.
- ⁴²Dong, Y., Chen, C., Zheng, X., Gao, L., Cui, Z., Yang, H., Guo, C., Chi, Y., Li, M. C., *J. Mater. Chem.*, **2012**, 22, 8764.
- ⁴³Yuan, F., Li, S., Fan, Z., Meng, X., Fan, L., Yang, S., *Nano Today*, **2016**, 11, 565.
- ⁴⁴Mirtchev, P., Henderson, J. E., Soheilnia, N., Yip, M. C., Ozin, A. G., *J. Mater. Chem.*, **2012**, 22, 1265.

-
- ⁴⁵Internacional Olive Council (IOC), 2018; <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/132-world-table-olive-figures>; último acesso em 22 julho, 2018.
- ⁴⁶Portuguese Olive Oil Association, 2018; <http://www.casadoazeite.pt/en/Home/Data/Production>; último acesso a 22 julho, 2018.
- ⁴⁷Rádio Condestável; <http://radiocondestavel.pt/radio/index.php/noticias/23679-vila-de-rei-municipio-entrega-731-oliveiras-nos-731-anos-de-foral>; último acesso a 24 de outubro, 2018.
- ⁴⁸Tsagaraki, E., Lazarides, H. N., Petrotos, K. B., *Olive Mill Wastewater Treatment, in Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*, Oreopoulou, V., Russ, W. (Eds.); Springer, New York, 2007; Ch. 8.
- ⁴⁹Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., Michaud, P., *Process Biochemistry*, **2013**, 48, 1532.
- ⁵⁰Paraskeva, P., Diamadopoulos, E., *J. Chem. Techn. Biotechnol.*, **2006**, 81, 1475.
- ⁵¹Hajjouji, H. E., Bailly, J. R., Winterton, P., Merlina, G., Revel, J. C., Hafidi, M., *Bioresour. Technol.*, **2008**, 99, 4958.
- ⁵²Bene, D. C., Pellegrino, E., Debolini, M., Silvestri, N., Bonari, E., *Soil Biology & Biochemistry*, **2013**, 56, 21.
- ⁵³Paredes, C., Cegarra, J., Roig, A., Sánchez-Monedero, M. A., Bernal, M. P., *Bioresour. Technol.*, **1999**, 67, 111.
- ⁵⁴Ignat, I., Volf, I., Popa I. V., *Food Chem.*, **2011**, 126, 1821.
- ⁵⁵Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységu, L., *Angew. Chem. Int, Ed.*, **2011**, 50, 586.
- ⁵⁶Valta, K., Aggeli, E., Papadaskalopoulou, C., Panaretou, V., Sotiropoulos, A., Malamis, D., Moustakas, K., Haralambous, K.-J., *Biomass. Valor.*, **2015**, 6, 913.
- ⁵⁷Nassar, N. N., Arar, L. A., Marei, N. N., Ghanim, M. M. A., Dwekat, M. S., Sawalha, S. H., *Environ. Nanotechnol. Monitoring & Management*, **2014**, 1-2, 14.
- ⁵⁸Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de agosto de 1998.
- ⁵⁹Al-Malah, K., Azzam, M. O.J., Abu-Lail, N. I., *Separ. Purif. Technol.*, **2000**, 20, 225.
- ⁶⁰Nieto L. M., Hodaifa, G., Rodríguez, S., Giménez, J. A., Ochando, J., *Chemical Engineering Journal*, **2011**, 173, 503.
- ⁶¹Hodaifa, G., Ochando-Pulido, J. M., Rodríguez-Vives, S., Martínez-Ferez, A., *Chemical Engineering Journal*, **2013**, 220, 117.
- ⁶²Lafi, W. K., Shannak, B., Al-Shannag, M., Al-Anber, Z., Al-Hasan, M., *Separ. Puri. Technol.*, **2009**, 70, 141.
- ⁶³Chowdhury, A. K. Md. M. B., Akratos, C. S., Vayenas, D. V., Pavlov, S., *International Biodeterioration & Biodegradation*, **2013**, 85, 108.

-
- ⁶⁴Singleton, V. L., Rossi, J. A., *Am. J. Enol. Viticulture*, **1965**, 16, 144.
- ⁶⁵Hajimahmoodi, M., Moghaddam, G., Ranjbar, A. M., Khazani, H., Sadeghi, N., Oveisi, M. R., Jannat, B., *Am. J. Plant Sci.*, **2013**, 4, 1815.
- ⁶⁶Capasso, R., Arienzo, M., *J. Agric. Food Chemistry*, **2000**, 48, 1405.
- ⁶⁷Pekal, A., Pyrynska, K., *Food Anal. Methods*, **2014**, 7, 1776.
- ⁶⁸McCandlish, D. (Ed.), International Society of Leather Trades Chemists, Tannin Analysis, *Analyst*, **1942**, 67, 197.
- ⁶⁹DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F., *Anal. Chem.*, **1956**, 28, 350.
- ⁷⁰Nielsen, S.S., *Food Analysis*, 4th ed., Springer, New York, **2010**.
- ⁷¹Sedmak, J. J., Grossberg, S. E., *Anal. Biochem.*, **1977**, 79, 544.
- ⁷²Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrader, L.E., Youngs, V.L., *Commun. Soil Science and Plant Analysis*, **1975**, 6, 71.
- ⁷³Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., *Determination of Ash in Biomass*, Technical Report NREL/TP-510-42622, National Renewable Energy Laboratory, USA, **2008**.
- ⁷⁴Aggoun M., Arhab R., Cornu A., Portelli J., Barkat M., Graulet B., *Food Chemistry*, **2016**, 209, 72.
- ⁷⁵Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation, **1997**; CQO e CBO₅ foram determinados pelos procedimentos descritos nas secções 5220B e 5210B, respetivamente.
- ⁷⁶Lai, C.W., Hsiao, Y.H., Peng, Y.K., Chou, P.T., *J. Mater. Chem.*, **2012**, 22, 14403.
- ⁷⁷Miller, F. A., Wilkins, C. H., *Anal. Chem.*, 1952, 24, 1253.
- ⁷⁸Wang, J., Zhang, F., Wang, Y., Yang, Y., Liu, X., *Carbon*, **2018**, 126, 426.
- ⁷⁹Huang, S., Wang, L., Huang, C., Xie, J., Su, W., Sheng, J., Xiao, Q., *Sens. Actuators. B.*, **2015**, 221, 1215.
- ⁸⁰Bui, T. T., Park, S-Y., *Green Chem.*, **2016**, 18, 4245.
- ⁸¹Voet, D., Voet, J. G., Pratt, C. W., *Fundamentals of bio-chemistry: life at the molecular level*, Wiley, Hoboken, NJ, 4th ed, 2013.
- ⁸²Nelson, D. L., Cox, M. M., *Lehninger - Principles of Biochemistry*, 5th ed, W. H. Freeman and Company, New York, 2008.
- ⁸³As estruturas tridimensionais das proteínas foram obtidas do Protein Data Bank na Europa como um ficheiro pdb sendo diretamente geradas no software UCSF Chimera, www.cgl.ucsf.edu/.
- ⁸⁴Valeur, B., *Molecular Fluorescence Principles and Applications*, Wiley-VCH, Germany, 2002.

⁸⁵Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, New York, 2006.

⁸⁶Menezes, F., Fedorov, A., Baleizão, C., Valeur, B., Berberan-Santos, M.N., *Meth. Appl. Fluoresc.*, **2013**, 1, 015002.

⁸⁷Wilkinson, F., Kelly, G. P., *Handbook of Organic Photochemistry*, Vol. II, CRC Press, USA, 1989.

⁸⁸ Annon, 2018. *A Guide to Recording Fluorescence Quantum Yields*, Horiba Scientific. <http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/Fluorescence/quantumyieldstrad.pdf>, Data de acesso: 20 de abril de 2018.