

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTENOLOGIA

ELYSSON DAVID DE SANTANA LIMA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES ANALÍTICAS DE PONTOS  
QUÂNTICOS (*QUANTUM DOTS*) EM AMOSTRAS DE INTERESSE CLÍNICO  
E AMBIENTAL.**

MACEIÓ/AL  
2018

ELYSSON DAVID DE SANTANA LIMA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES ANALÍTICAS DE PONTOS QUÂNTICOS (*QUANTUM DOTS*) EM AMOSTRAS DE INTERESSE CLÍNICO E AMBIENTAL.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia do Instituto de Química e Biotecnologia - IQB, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor, outorgado pela Universidade Federal de Alagoas - UFAL.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Josué Carinhanha Caldas Santos

MACEIÓ/AL  
2018

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 - 661

- L732s Lima, Elysson David de Santana.  
Síntese, caracterização e aplicações analíticas de pontos quânticos (*quantum dots*) em amostras de interesse clínico e ambiental / Elysson David de Santana Lima. – 2018  
109 f.: il.
- Orientador: Josué Carinhanha Caldas Santos.  
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia, Maceió, 2018.
- Bibliografia: f 106-108.  
Apêndices: f. 109.
1. Pontos quânticos. 2. Quantum dots. 3. Sondas Fluorescentes. 4. Cr(VI).  
5. Timorosal I. Título.

CDU: 543.06



PPGQB

Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone: (82) 3214-1144  
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **ELYSSON DAVID DE SANTANA LIMA** intitulada: “**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES ANALÍTICAS DE PONTOS QUÂNTICOS EM AMOSTRAS DE INTERESSE CLÍNICO E AMBIENTAL**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, no dia 21 de junho de 2018, às 14h na Sala de Reuniões do IQB/UFAL.

### COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Josué Carinhonha Caldas Santos  
(Orientador – PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti  
(PPGQB/IQB/UFAL)

Profa. Dra. Daniela Santos Anunciação  
(PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Paulo dos Santos Roldan  
(IQB/UFAL)

Profa. Dra. Camila Braga Dornela  
(CS/ICBS)

*“Devemos estar dispostos a nos livrar da vida que planejamos para poder viver a vida que nos espera”.*

(Joseph Campbell)

*Dedico este trabalho, em especial, aos meus primeiros educadores que, embora não sejam professores, ensinaram-me os principais valores para a vida: meus pais Edson Lima e Suely Santana.*

*E a minha esposa, Patrícia Costa, que me mostrou que o mundo era bem maior do que eu pensava.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus.

Aos meus pais Edson e Suely, pelo amor e apoio incondicional.

À minha esposa Patrícia Costa, pelo amor, companheirismo e apoio incondicional.

À minha irmã Elyne e ao meu cunhado Feliciano, pelo apoio, confiança e amizade.

Ao meu irmão Everthon e à minha cunhada Ramona, pelo apoio, confiança e amizade.

Ao meu orientador Josué Carinhanha, pela oportunidade, apoio e orientação, nesses meses de trabalho.

Aos meus amigos Alysson, Felipe, João, Guimarães, Raphael e Wood, pela amizade construída nesses anos.

Aos meus amigos Jaelson e Janaina, pela ajuda no desenvolvimento do trabalho.

A todos os professores e amigos do IQB/LINQA, que nesses 12 anos de UFAL contribuíram com suas amizades e incentivo durante a minha graduação, mestrado e doutorado.

E a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para mais esta conquista na minha vida.

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam a muito”.*

“Chico Xavier”

## RESUMO

Este trabalho trata-se da aplicação de pontos quânticos (*quantum dots*) como sondas fluorescentes para determinação de espécies orgânicas e inorgânicas em amostras clínicas e ambientais. No desenvolvimento do trabalho foram desenvolvidos dois trabalhos, o primeiro aborda sobre a aplicação de pontos quânticos de carbono (*carbon quantum dots*) como sondas fluorescentes para determinação de Cr(VI) em amostras ambientais (água e solo), os pontos quânticos de carbono (CDots) foram preparados por pirólise da mistura dos precursores moleculares ácido cítrico e glutatona reduzida. O CDots sintetizados apresentou um rendimento quântico fotoluminescência de 69,4% e tamanho de partícula de cerca de 2,5 nm. Na investigação dos parâmetros de interação entre os CDots e o Cr(VI), foi observado que o mecanismo de *quenching* estático, com a formação de um complexo supramolecular no estado fundamental. Para o estudo de possíveis interferentes ao método, Pb(II), Ba(II), Fe(II), Al(III) e Fe(III) foram considerados interferentes ao método. Após a otimização dos principais parâmetros analíticos, o método apresentou faixa linear de 0,10 – 12 mg mL<sup>-1</sup> com limite de detecção (LOD) de 0,03 mg mL<sup>-1</sup> (pH 7), e recuperações de 90 – 105% e 99,5 – 107% para amostras de água e solo, respectivamente. Assim, o método mostrou-se sensível, rápido e versátil para aplicações em diversas amostras ambientais. O segundo trabalho aborda sobre aplicação de pontos quânticos (*quantum dots*) de ZnS como sondas fluorescentes para determinação de timerosal em amostras de vacinas. Os QDs de ZnS foram sintetizados a partir de solução de sulfeto de sódio (0,1 mol L<sup>-1</sup>) com acetado de zinco (0,1 mol L<sup>-1</sup>) usando como agente ligante de superfície a *N*-acetil-cisteína. O nanomaterial sintetizado apresentou  $\lambda_{ex} = 290$  nm e  $\lambda_{em} = 440$  nm, com diâmetro médio em suspensão de 4,40 nm. Ao realizar a otimização dos parâmetros analíticos, na avaliação do pH e do sistema tampão, se observou que em pH 7 utilizando tampão ácido cítrico/fosfato foi obtida a melhor resposta para interação do QDs de ZnS com Timerosal. Na avaliação do mecanismo de *quenching* se observou que com aumento da temperatura ocorreu diminuição os valores de  $K_{sv}$  e  $K_b$ , indicando que o mecanismo preferencial de *quenching* é estático. Com base nos parâmetros termodinâmicos, a interação do QDs de ZnS com timerosal é um processo espontâneo, exotérmico e que o valor negativo da entropia pode ser resultado do acúmulo de timerosal na superfície dos QDs. O método proposto apresentou faixa linear de 10 a 90 µg L<sup>-1</sup> com LOD de 4,59 µg L<sup>-1</sup>, sendo concordante com outros trabalhos na literatura para determinação de mercúrio, uma vez que não existem sistemas similares com timerosal. Ao realizar o ensaio de recuperação nas amostras de vacinas comercializadas nos postos de saúde na cidade de Maceió a recuperação variou de 79,24 a 104,5%, indicando a exatidão do método.

**Palavras – chave:** Pontos quânticos (*quantum dots*), sondas fluorescentes, Cr(VI), timerosal.



## ABSTRACT

This work deals with the application of quantum dots as fluorescent probes for the determination of organic and inorganic species in clinical and environmental samples. In the development of the work, two projects were developed, the first one was based on the application of carbon quantum dots (CDots) as fluorescent probes for determination of Cr(VI) in environmental samples (water and soil). CDots were prepared by pyrolysis of a mixture of molecular precursors citric acid and reduced glutathione. The synthesized CDots had a photoluminescent quantum yield of 69.4% and a particle size of about 2.5 nm. In the investigation of the interaction parameters between CDots and Cr(VI), it was observed the mechanism of static quenching with the formation of a supramolecular complex in the fundamental state. For the study of possible interferents to the method, Pb(II), Ba(II), Fe(II), Al(III) and Fe(III) were considered interfering to the method. After optimization of the main analytical parameters, the method presented a linear range of 0.10 – 12 mg mL<sup>-1</sup> with limit of detection (LOD) of 0.03 mg mL<sup>-1</sup> (pH 7), and recoveries of 90 – 105% and 99.5 - 107% for water and soil samples, respectively. Thus, the method proved to be sensitive, fast and versatile for applications in several environmental samples. The second project was based on the application of quantum dots of ZnS as fluorescent probes for the determination of thimerosal in vaccine samples. The ZnS QDs were synthesized from sodium sulfide solution (0.1 mol L<sup>-1</sup>) with zinc acetate (0.1 mol L<sup>-1</sup>) using N-acetyl-cysteine as the surface binding agent. The synthesized nanomaterial presented  $\lambda_{\text{ex}} = 290$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 440$  nm, with mean suspension diameter of 4.40 nm. In the optimization of the analytical parameters, pH and buffer system evaluation, it was observed that citric acid / phosphate buffer at pH 7 showed best response for the interaction of ZnS QDs with Thimerosal. In the evaluation of the quenching mechanism, it was observed that with increasing temperature, the values of  $K_{\text{sv}}$  and  $K_{\text{b}}$  decreased, indicating that the preferential mechanism of quenching is static. Based on the thermodynamic parameters, the interaction of ZnS QDs with thimerosal is a spontaneous, exothermic process and the negative entropy value may be a result of the accumulation of thimerosal on the surface of the QDs. The proposed method presented a linear range from 10 to 90  $\mu\text{g L}^{-1}$  with LOD of 4.59  $\mu\text{g L}^{-1}$ , agreeing with other studies in the literature for the determination of mercury, since there are no similar systems with thimerosal. When performing the recovery test on samples of vaccines from market health centers in the city of Maceió, recovery ranged from 79,24 to 104,5%, indicating the accuracy of the method.

**Key words:** quantum dots, fluorescent probes, Cr (VI), thimerosal.

## LISTA DE FIGURAS

### Introdução

Figura 1	Diagrama parcial de energia de um sistema fotoluminescente	17
Figura 2	Esquema geral de funcionamento de espectrofotômetro de fluorescência que utiliza lâmpada de xenônio como fonte de excitação	19
Figura 3	Esquema do processo de excitação e emissão do QD	21
Figura 4	Gráfico do número de publicações indexadas na base de dados Web of Science para o período dos últimos 10 anos (2008-2018). A) Com base nos termos “Quantum dots” e B) “Quantum dots; Sensor” e “Quantum dots; fluorescence” A pesquisa foi realizada em junho/2018.	22
Figura 5	Ilustração de pontos quânticos de carbonos.	23
Figura 6	Gráfico do número de publicações indexadas na base de dados Web of Science para o período dos últimos 10 anos (2008-2018) com base nos termos “carbon quantum dots” e “Carbon quantum dots; determinat”. A pesquisa foi realizada em junho/2018	24

### Capítulo I. Aplicação de pontos quânticos de carbono (*carbon quantum dots*) como sondas fluorescentes para determinação de Cr(VI) em amostras ambientais.

Figura 1	A) Espectro de UV-vis da amostra de CDots derivadas de ácido cítrico e glutathione, obtidos por pirólise a 270°C; B) Espectros de fotoluminescência dos CDots excitados em diferentes comprimentos de onda; C) Curva de decaimento do tempo de vida do estado excitado para a amostra de CDots; D) Área integrada de fotoluminescência em função da absorbância para cálculo do rendimento quântico de fotoluminescência dos CDots sintetizados. A curva de menor inclinação corresponde do sulfato de quinino ( $\Phi_f = 54\%$ ).	39
Figura 2	Espectro infravermelho dos CDs derivados de ácido cítrico com incorporação de glutathione, obtidos por pirólise a 270°C.	41
Figura 3	A) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão da amostra de CDots obtidos por pirólise em atmosfera inerte a 270°C. B) Histograma de distribuição de tamanho dos CDots.	42
Figura 4	Difratogramas de raios X dos precursores. (A) CA (ácido cítrico), (B) GSH (glutathione) e (C) CDots derivados de ácido cítrico com incorporação de glutathione, obtidos por pirólise a 270°C.	43
Figura 5	Princípio de determinação de Cr(VI) explorando CDots como sonda fluorescente	43
Figura 6	Efeito do pH no quenching de CDots em diferentes concentrações de Cr(VI), empregando tampão Britton–Robinson 0,04 M.	44
Figura 7	(A) Efeito do pH na fluorescência do CDots por diferentes concentrações de Cr(VI). (B) Estruturas moleculares dos sistemas tampão avaliados e seus respectivos valores de pKa ( $n = 3$ ).	45
Figura 8	Influência da concentração de tampão Tris na sensibilidade do método a pH 7 ( $n = 3$ ).	46
Figura 9	Avaliação da concentração de CDots a pH 7 ( $n = 3$ ).	47

Figura 10	Avaliação da força iônica no sistema CDots e Cr(VI) a pH 7 ( $n = 3$ ).	48
Figura 11	Avaliação da cinética reacional para A) solução de referência; B) soluções contendo 2,5 e 10 mg L <sup>-1</sup> de Cr(VI).	49
Figura 12	A) Espectros de absorção UV-vis (1) Cr(VI) e (2) CDots, (3) o espectro de excitação de CDots a $\lambda_{em} = 418$ nm e o espectro de emissão (4) de CDots a $\lambda_{ex} = 350$ nm. B) Fluorescência normalizada de CDots na ausência e presença de Cr(VI) a 10 mg L <sup>-1</sup> , respectivamente.	50
Figura 13	Gráfico de Van't Hoff	52
Figura 14	A) Espectros de fluorescência de CDots na ausência e presença de diferentes concentrações de Cr(VI). B) Faixa linear ( $I_0 - I_F$ ) / $I_F$ vs Cr(VI) para 0,1-12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a pH 7.	53
Figura 15	Avaliação da seletividade do método contra possíveis interferentes. A concentração de Cr(VI) foi de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (90,5 $\mu\text{M}$ ) no ensaio. Valores de concentração limite de Cr(III), Cu(II), Ca(II), Mg(II), K(I), Zn(II), Ni(II), Cd(II), Sn(II), Sr(II), ácido cítrico, fluoreto, EDTA, borato, silicato e iodato foram 1000 $\mu\text{M}$ . Para Ba(II) e Al(III) foram 500 $\mu\text{M}$ , enquanto Fe(II) e Pb(II) foram 100 $\mu\text{M}$ e, finalmente, Fe(III) foi 50 $\mu\text{M}$ .	54
Figura 16	Reversibilidade da resposta analítica de CDots na presença de Cr (VI) e ácido ascórbico.	56

**Capítulo II.** Aplicação de pontos quânticos (quantum dots) de ZnS como sondas fluorescentes para determinação de timerosal em amostras de vacinas.

Figura 1	Estrutura química do timerosal (TM) e seus respectivos produtos de degradação: ácido tiosalicílico (ATS) e etil-mercúrio (EtHg <sup>+</sup> ).	81
Figura 2	(A) Espectro normalizado referente a absorção no UV-vis e emissão e excitação de fluorescência do QD-ZnS e (B) Espectro de fluorescência do QDs de ZnS excitado em diferentes comprimentos de onda.	88
Figura 3	Tamanho das nanopartículas sintetizadas. (A) <i>Quantum dot</i> de ZnS, (B) <i>Quantum dot</i> ZnS na presença de timerosal.	89
Figura 4	Estudo do pH com tampão Britton-Robinson (pH 2-10). (A) Intensidade de fluorescência <i>versus</i> pH e (B) Relação de $(F_0 - F)/F_0$ <i>versus</i> pH.	91
Figura 5	Sensibilidade em função concentração do QD-ZnS.	92
Figura 6	Cinética racional. (A) Estabilidade fotoluminescente do QD-ZnS. (B) cinética da interação do QDs - Zn com timerosal (100 $\mu\text{g L}^{-1}$ ).	94
Figura 7	(A) Espectro de fluorescência normalizada (B) Espectro de UV-vis do timerosal e do QDs - ZnS na presença e ausência de timerosal (100 $\mu\text{g L}^{-1}$ ).	96
Figura 8	Gráfico de Van't Hoff para o processo de interação entre QDs - ZnS e timerosal.	97
Figura 9	Mecanismo de interação do QDs de CdTe para determinação de ácido salicílico, proposto por Bunkoed & Kanatharana (2015).	98
Figura 10	Mecanismo proposto da interação do QDs de ZnS com timerosal.	99
Figura 11	Reação base do método de Ellman para determinação de compostos tiólicos	100

Figura 12	Reação do DNTB com os reagentes do método proposto	101
Figura 13	Interação do QDs – ZnS com as espécies de mercúrio. A) Curva analítica, B) Sensibilidade das interações dos QDs – ZnS com as espécies de mercúrio.	102
Figura 14	(A) Espectros de emissão de fluorescência do QD-ZnS na ausência e presença de concentrações crescente de timerosal. (B) Curva analítica $(F_0 - F) / F_0$ vs timerosal.	103

## LISTA DE TABELAS

**Capítulo I.** Aplicação de pontos quânticos de carbono (*carbon quantum dots*) como sondas fluorescentes para determinação de Cr(VI) em amostras ambientais.

Tabela 1	Parâmetros de ligação do processo de interação entre CDots e Cr(VI).	51
Tabela 2	Comparação de métodos para a determinação de Cr(VI) com pontos quânticos de carbono e detecção por fluorescência.	56
Tabela 3	Caracterização das amostras de solos..	58
Tabela 4	Concentração de Cr(VI) adicionadas e quantificadas em amostras de água e solo pelo método proposto para CDots ( $n = 3$ ).	59
Tabela S1	Principais características das vibrações de grupos funcionais em superfície de CDots no espectro infravermelho.	64
Tabela S2	Efeito do pH na fluorescência do CDots por diferentes concentrações de Cr (VI).	64
Tabela S3	Influência da concentração do tampão Tris na sensibilidade do método a pH 7 ( $n = 3$ ).	64
Tabela S4	Avaliação da concentração de CDots a pH 7 ( $n = 3$ ).	65
Tabela S5	Avaliação da força iônica no sistema CDots e Cr(VI) a pH 7 ( $n = 3$ ).	65

**Capítulo II.** Aplicação de pontos quânticos (quantum dots) de ZnS como sondas fluorescentes para determinação de timerosal em amostras de vacinas.

Tabela 1	Programa aplicado para digestão das amostras de vacina em sistema fechado e radiação microondas.	87
Tabela 2	Análise de EDX das nanopartículas sintetizada de ZnS.	90
Tabela 3	Resultado da influência do sistema tampão na interação do QDs - ZnS com timerosal.	92
Tabela 4	Avaliação da força iônica na interação do QD-ZnS com timerosal.	93
Tabela 5	Parâmetros de ligação para o processo de interação do QDs com timerosal.	95
Tabela 6	Parâmetros termodinâmicos para o processo de interação do QDs com timerosal.	97
Tabela 7	Trabalhos publicados na literatura para determinação de timerosal, utilizando diferentes técnicas.	104
Tabela 8	Resultados do ensaio de recuperação e da determinação do timerosal pelo método proposto e por AFS. Amostras foram diluídas 4000 vezes.	105
Tabela S1	Avaliação da concentração do QDs - ZnS.	111

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC/F	Tampão ácido cítrico/fosfato
AFS	Espectroscopia de fluorescência atômica
CDots	<i>Carbon Quantum Dots</i>
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DLS	Dispersão de luz dinâmica
DLS	Dispersão de luz dinâmica
DRX	Difração de raios X
EDX	Fluorescência de raios X por Energia Dispersiva
FAAS	espectrometria de absorção atômica com chama
FTIR	Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ICP MS	Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica em Plasma Indutivamente Acoplado
$K_b$	Constante de ligação
$K_{SV}$	Constante de Stern-Volmer
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
NAC	<i>N</i> -acetil-cisteína
nm	Nanômetro
QDs	<i>Quantum Dots</i>
RSD	Desvio padrão relativo
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TM	Timerosal
WHO	Organização Mundial de Saúde
$\eta$	Índice de refração
$\lambda$	Comprimento de onda
$\Phi$	Rendimento quântico

## SUMÁRIO

<b>Introdução geral</b>	16
<b>1. O fenômeno de fluorescência</b>	16
1.1 Instrumentação em fluorescência	18
<b>2. Pontos Quânticos</b>	20
2.1 Pontos Quânticos semicondutores – <i>Quantum dots</i>	20
2.2 Pontos Quânticos de carbono ( <i>carbono quantum dots</i> )	22
<b>3. Referências</b>	25

**Capítulo I.** Aplicação de pontos quânticos de carbono (*carbon quantum dots*) como sondas fluorescentes para determinação de Cr(VI) em amostras ambientais.

Resumo	28
Abstract	29
<b>1 Introdução</b>	30
<b>2 Objetivos</b>	32
2.1 Objetivo Geral	32
2.2 Objetivos Específicos	32
<b>3 Experimental</b>	33
3.1 Reagentes e soluções	33
3.2 Síntese dos <i>Carbon quantum dots</i> - CDots	33
3.3 Caracterização do CDots	34
3.4 Determinação de Cr(VI) empregando CDots	35
3.5 Preparo das amostras de água e solo	36
<b>4 Resultados e Discussões</b>	38
4.1 Caracterização dos CDots	38
4.2 Otimização dos parâmetros analíticos	43
4.2.1 Avaliação do pH	44
4.2.2 Avaliação do sistema tampão	45
4.2.3 Avaliação da concentração do tampão	46
4.2.4 Avaliação da concentração do CDots	46
4.2.5 Avaliação da força iônica	47
4.2.6 Avaliação da cinética reacional	48
4.3 Avaliação do mecanismo de quenching e parâmetros termodinâmicos	49
4.3.1 Mecanismo de interação entre os CDots e Cr(VI)	49
4.3.2 Avaliação dos parâmetros termodinâmicos	51
4.4 Figuras de méritos	52
4.5 Ensaio de interferentes	53
4.6 Estudo da reversibilidade do CDots	57
4.7 Análise das amostras reais	58
<b>5 Conclusão</b>	60

<b>6</b>	<b>Referências</b>	61
<b>7</b>	<b>Anexos</b>	64

**Capítulo II.** Aplicação de pontos quânticos (quantum dots) de ZnS como sondas fluorescentes para determinação de timerosal em amostras de vacinas.

	Resumo	78
	Abstract	79
<b>1</b>	<b>Introdução</b>	80
<b>2</b>	<b>Objetivos</b>	83
	2.1 Objetivo geral	83
	2.2 Objetivos específicos	83
<b>3</b>	<b>Experimental</b>	84
	3.1 Reagentes e soluções	84
	3.2 Síntese do <i>quantum dot</i> de ZnS	84
	3.3 Caracterização do QD-ZnS	84
	3.4 Determinação de timerosal empregando QDs-ZnS	85
	3.5 Preparo das amostras de vacina	86
	3.5.1 Preparo das amostras de vacina para determinação de timerosal pelo método proposto.	86
	3.5.2 Preparo das amostras de vacina para determinação de mercúrio por espectrometria de fluorescência atômica.	86
<b>4</b>	<b>Resultados e Discursões</b>	88
	4.1 Caracterização dos <i>Quantum Dots</i> - ZnS	88
	4.1.1 Características de absorção e fluorescência dos QDs – ZnS	88
	4.1.2 Dispersão de luz dinâmica (DLS) e Espectrômetro de fluorescência de raios X por Energia Dispersiva (EDX)	88
4.2	Otimização dos parâmetros analíticos	90
	4.2.1 Avaliação do pH	90
	4.2.2 Avaliação do sistema tampão	91
	4.2.3 Avaliação da concentração do <i>quantum dots</i> no sistema racional	92
	4.2.4 Avaliação do força iônica	93
	4.2.5 Avaliação da cinética reacional	93
	4.3 Estudo da interação do QD de ZnS com timerosal	94
	4.3.1 Avaliação do tipo de quenching	94
	4.3.2 Parâmetros termodinâmicos	96
	4.3.3 Proposta do mecanismo de interação	98
	4.3.4 Resposta do QD – ZnS frente as diferentes espécies de mercúrio	101
4.4	Validação do método	102
	4.4.1 Figuras de méritos	102
	4.4.2 Análise das amostras de vacinas	105
<b>5</b>	<b>Considerações finais</b>	107
<b>6</b>	<b>Referências</b>	108
<b>7</b>	<b>Anexos</b>	112



## Introdução geral

Este trabalho trata-se da aplicação de pontos quânticos (*quantum dots*) como sondas fluorescentes para determinação de espécies orgânicas e inorgânicas em amostras clínicas e ambientais. Neste projeto, foram desenvolvidos dois estudos, os quais estão apresentando como capítulo I, abordando sobre a aplicação de pontos quânticos de carbono (*carbon quantum dots*) como sondas fluorescentes para determinação de Cr(VI) em amostras ambientais (água e solo) e capítulo II, que apresenta a síntese, caracterização e aplicação de pontos quânticos (*quantum dots*) de ZnS como sondas fluorescentes para determinação de timerosal, um composto orgânico de mercúrio, em amostras de vacinas.

Para melhor entendimento do estudo desenvolvido, serão tratados nos tópicos a seguir os princípios básicos relacionados a fluorescência, ao *quantum dots* (QDs) e aos *quantum dots* de carbono (CDtos).

### 1. O fenômeno de fluorescência.

A luminescência molecular caracteriza-se pela emissão de radiação eletromagnética (na região do UV-vis) proveniente de moléculas ou espécies que foram excitadas, e em seguida, retornam ao seu estado fundamental. Esse fenômeno é denominado de fotoluminescência, quando a absorção de fótons é o responsável pela excitação da molécula, elevando os elétrons de valência de um orbital de menor conteúdo energético para um orbital (ou condição) de maior energia (SHINDE et al., 2012).

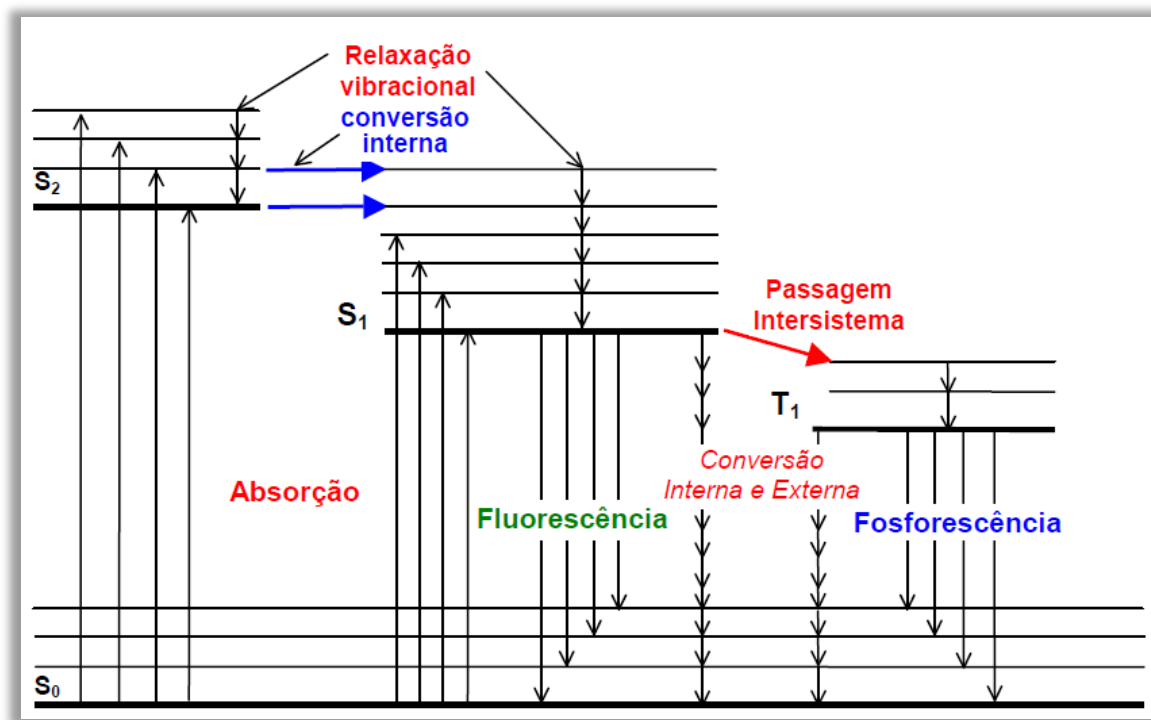
A luminescência molecular é formalmente dividida em fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado envolvido no processo. Se o estado excitado envolvido é singleto, onde o *spin* do elétron no orbital excitado mantém sua orientação original, tem-se o processo de fluorescência (LAKOWICZ, 2006). Por outro lado, na fosforescência, a orientação do elétron que foi promovido ao estado excitado é invertida (estado excitado tripleto).

Em consequência da retenção da orientação original, o retorno de uma população de moléculas/espécies que se encontra no estado excitado singleto para o estado fundamental (que tem caráter singleto), é permitido e ocorre muito rapidamente. Assim, a fluorescência é intrinsecamente um fenômeno luminescente mais comum que a fosforescência, competindo eficientemente com processos de desativação não-radiativos do estado excitado. Como consequência direta disso, é possível observar facilmente

fluorescência na temperatura ambiente e diretamente em solução, o que torna o procedimento experimental fluorimétrico mais simples (LAKOWICZ, 2006).

O princípio da fluorescência é a base da fluorimetria, que engloba o conjunto de técnicas analíticas baseadas na detecção dos fótons emitidos por moléculas excitadas de caráter singlete quando estas retornam para o estado fundamental, como ilustrado na Figura 1.

**Figura 1.** Diagrama parcial de energia de um sistema fotoluminescente.



Fonte: Adaptado, (CESAR; ALVES, 2009)

No processo de desativação do estado excitado uma molécula pode voltar ao seu estado fundamental por uma combinação de várias etapas de mecanismo. Duas destas etapas, fluorescência e fosforescência, envolvem a emissão de um fóton de radiação. As outras etapas de desativação: relaxação vibracional, conversão interna, conversão externa e cruzamento intersistemas, são processos não-radiativos. A trajetória favorecida para o estado fundamental é aquela que minimiza o tempo de vida do estado excitado. Assim, se a desativação por fluorescência é rápida em relação aos processos sem radiação, tal emissão é observada (SHINDE et al., 2012).

A relaxação vibracional ocorre devido às colisões entre moléculas excitadas e o solvente, sendo um processo de desativação bastante eficiente pois o tempo de vida médio

de uma molécula excitada vibracionalmente é de  $10^{-12}$ s. Uma consequência da eficiência da relaxação vibracional é o fato de a banda de fluorescência para uma dada transição eletrônica estar deslocada para comprimentos de onda maiores em relação à banda de absorção (deslocamento Stokes).

A conversão interna é particularmente eficiente quando dois níveis eletrônicos de energia estão próximos o suficiente para que haja uma superposição de níveis de energia vibracionais. A conversão interna pode resultar no fenômeno da pré-dissociação, em que a molécula vai de um nível eletrônico superior para um nível vibracional superior de um estado eletrônico mais baixo, no qual a energia vibracional é grande o suficiente para causar ruptura de uma ligação. A pré-dissociação deve ser diferenciada da dissociação, na qual a energia absorvida excita um cromóforo diretamente a um nível vibracional alto o suficiente para causar uma ruptura da ligação cromofórica; a conversão interna não está envolvida (SHINDE et al., 2012).

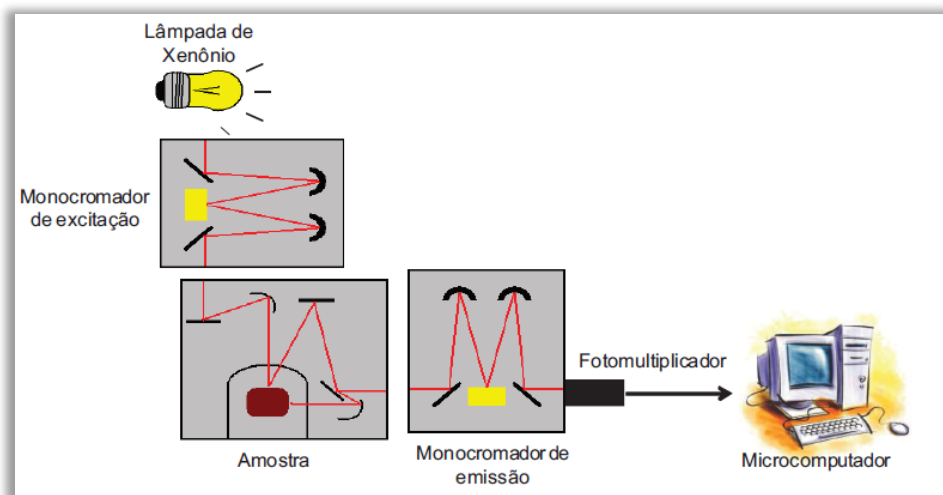
Pode também ocorrer uma conversão externa, em que a desativação de um estado eletrônico excitado envolve interação e transferência de energia entre a molécula excitada e o solvente ou outros solutos.

No cruzamento intersistemas ocorre alteração do spin do elétron do estado excitado, alterando a multiplicidade (singlete para triplete). Esse processo ocorre com maior frequência quando há sobreposição de níveis vibracionais e em moléculas com átomos pesados, como iodo e bromo (LAKOWICZ, 2006).

### **1.1 Instrumentação em fluorescência**

A instrumentação para as medidas de fluorescência (Figura 2), comporta uma fonte de luz para excitar a amostra, um monocromador para selecionar o comprimento de onda de excitação, um compartimento para a amostra, um segundo monocromador para isolar e analisar a emissão fluorescente proveniente da amostra, um sistema de detecção com um fotomultiplicador e, finalmente, um registrador para determinar a intensidade da emissão de fluorescência (GOMES, 2011).

**Figura 2.** Esquema geral de funcionamento de espectrofotômetro de fluorescência molecular que utiliza lâmpada de xenônio como fonte de excitação.



Fonte: Adaptado, (GOMES, 2011)

A amostra é colocada no equipamento, que emite luz em um determinado comprimento de onda, específico para a molécula/espécie que se quer avaliar. Antes de atingir a amostra, esta luz passa por um monocromador, responsável pela separação da luz que atingirá a amostra. Através de uma série de espelhos adequadamente posicionados, a luz chega até a amostra e provoca excitação das moléculas/espécies, que emitem luz em um outro comprimento de onda maior que o de excitação, que também passa por um monocromador e é captado pelo fotomultiplicador e convertido em sinal.

Com o desenvolvimento da técnica de fluorescência, muitas moléculas/compostos fluorescentes passaram a ser utilizadas como sondas analíticas para a investigação de diferentes sistemas visando informações de natureza físico-química, bioquímica e biológica, entre esses compostos se destacam os *quantum dots*, que últimos anos, tem sido apresentada por diferentes autores como uma possível alternativa a esses métodos convencionais (NSIBANDE; FORBES, 2016).

Os pontos quânticos (QDs) são nanomateriais cristalinos semicondutores que possuem propriedades eletrônicas e ópticas únicas devido aos efeitos de confinamento quântico. Eles possuem várias propriedades atraentes que os tornam adequados como sensores analíticos. Através de estratégias de modificação de superfícies, eles encontraram várias aplicações em várias disciplinas (NSIBANDE; FORBES, 2016).

## 2. Pontos Quânticos

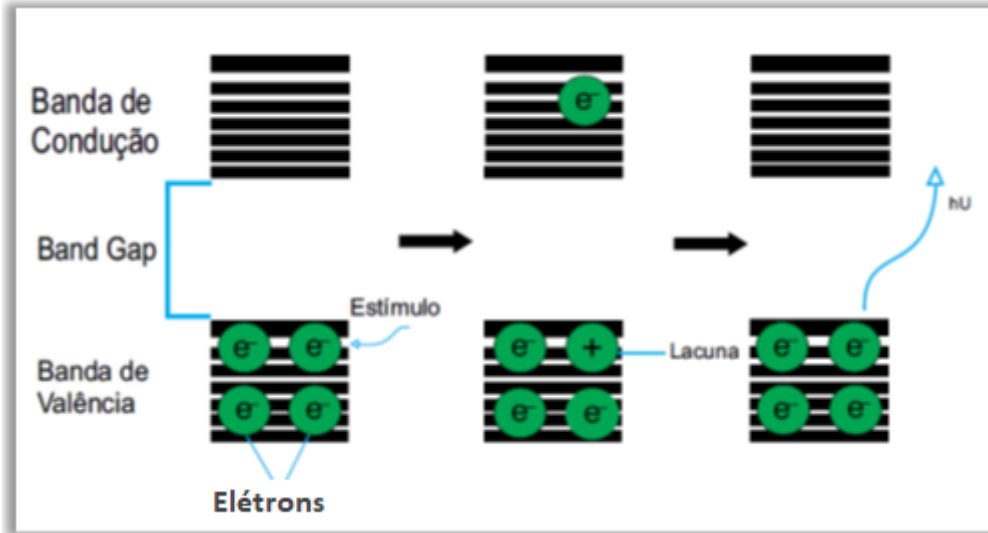
### 2.1 Pontos Quânticos semicondutores – *Quantum dots*

Pontos quânticos ou *quantum dots*, comumente formados por materiais semicondutores nanocristalinos coloidais, são descritos como sendo nanopartículas em suspensão, com diâmetros que variam de 2 a 20 nm, de vários materiais semicondutores e que apresentam efeito de confinamento quântico (SAMANTA et al., 2013).

Uma das razões principais que tem tornado estas partículas tão atrativas para as mais diversas áreas, desde a saúde até a optoeletrônica, é a sua capacidade de emitir luz visível após excitação, e principalmente o fato desta emissão de luz variar devido a interações dos *quantum dots* com outras moléculas com as quais reage ou interage (JO; MAGALH, 2014)

Como material cristalino semiconductor que são, os *quantum dots* apresentam na sua estrutura química uma banda de valência, de menor energia, equivalente ao conjunto das orbitais ligantes moleculares e uma banda de condução, de energia superior, correspondente ao conjunto dos orbitais antiligantes (Figura 3). Entre estas duas bandas existe uma região denominada *band-gap*, correspondente a níveis de energia “proibidos”, cujo diferencial energético corresponde à energia mínima necessária para promover a passagem de um elétron da banda de valência para a banda de condução. Quando se faz incidir nestes materiais fótons de energia superior à energia de *band-gap*, o fóton interage com um elétron da camada de valência, promovendo a sua migração para a camada de condução, ao mesmo tempo que deixa, na camada de valência, uma lacuna (orbital semipreenchido) com carga positiva. A interação de natureza eletrostática entre o elétron negativo, na banda de condução e a lacuna, de carga igual à do elétron, mas de sinal oposto, na banda de valência, dá origem a uma quasi-partícula, o éxciton. Este éxciton tem um período curto de vida acabando por perder a energia que absorveu. O processo de libertação da energia absorvida pode ocorrer de dois modos: perda não radiativa, em que a energia é dissipada pela ocorrência de choques ou geração de vibrações (este fenômeno é mais comum nos semicondutores macroscópicos), ou por meio da emissão de fótons com energia inferior aos fótons incidente, e, portanto, a um comprimento de onda maior que o do fótons absorvido. A Figura 3, mostra um esquema ilustrativo do processo de excitação e emissão dos QD (DRBOHLAVOVA et al., 2009; JO; MAGALH, 2014; MENEZES, 2007; TOMCZAK et al., 2009).

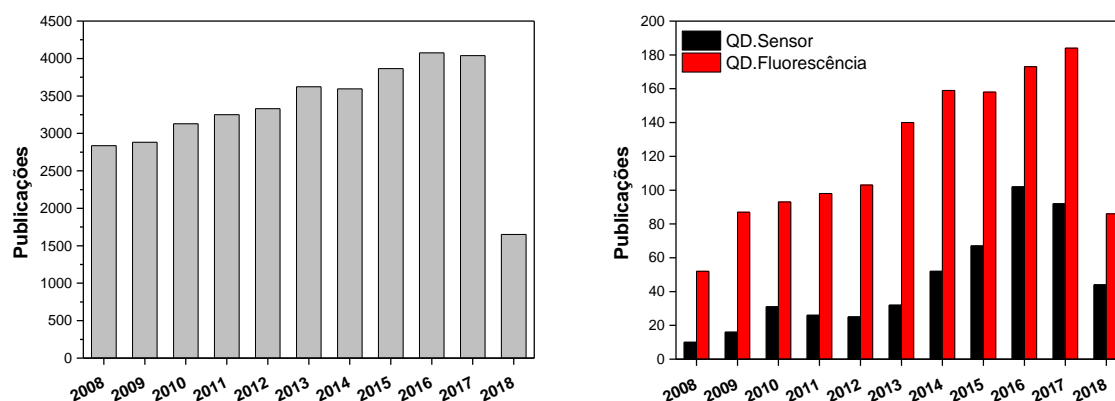
**Figura 3.** Esquema do processo de excitação e emissão do QD.



Fonte: Adaptado de Jo & Magalh, 2014.

Em um contexto histórico, os pontos quânticos inicialmente foram propostos como marcadores luminescentes para aplicações biológicas (FRIGERIO et al., 2012). Contudo, desde que Chen e Rosenzweig (2002) empregaram pela primeira vez QDs de CdS modificados por diferentes ligantes como sondas luminescentes para quantificação de íons cobre e zinco em meio aquoso, as pesquisas empregando QDs como sensores químicos para determinação de cátions, ânions e compostos orgânicos aumentaram significativamente (DUAN et al., 2011). A Figura 4 mostra o número de publicações nos últimos 10 anos relacionadas a *Quantum Dots*. Onde a Figura 4A mostra todas as publicações com QDs e a Figura 4B mostra o número de publicações relacionando o QDs com fluorescência e utilização de QDs como sensor.

**Figura 4.** Gráfico do número de publicações indexadas na base de dados *Web of Science* para o período dos últimos 10 anos (2008-2018). A) Com base nos termos “Quantum dots” e B) “Quantum dots; Sensor” e “Quantum dots; fluorescence” A pesquisa foi realizada em junho/2018.



Fonte: Autor, 2018.

Assim, novas aplicações, principalmente no campo da Química Analítica Aplicada, explorando as propriedades fotoluminescentes dos QDs estão sendo exploradas visando o monitoramento de espécies de interesse ambiental, farmacêutico, clínico e de controle de qualidade de alimentos (ALGARRA et al., 2012).

Além, dos *quantum dots* semicondutores, uma classe diferente de QDs feita de materiais de carbono emergiu recentemente e está encontrando aplicação na detecção analítica, este material vem se destacando por ser formando a base de carbono, material que é abundante e de fácil obtenção

## 2.2 Pontos Quânticos de carbono (*carbono quantum dots*)

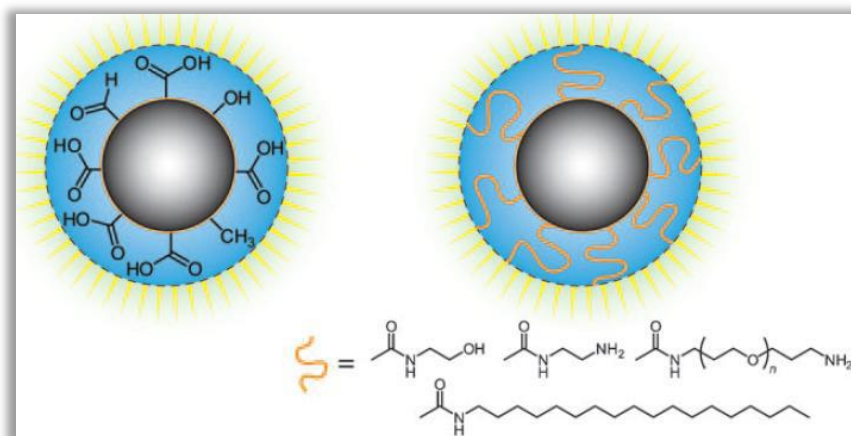
Os pontos quânticos de carbono (*carbon quantum dots*) foram descobertos acidentalmente pela primeira vez em 2004 durante a purificação de nanotubos de carbono de parede única pelo método eletroforético. Desde então, os pontos quânticos de carbono têm chamado bastante a atenção devido a fácil obtenção e propriedades espectroscópicas fascinantes (MIRTCHEV et al., 2012). Os pontos quânticos de carbono têm se tornado gradualmente uma importante classe de materiais da família nano devido à sua fonte de preparação ser derivada de materiais carbonosos, os quais, na maioria das vezes, são abundantes e baratos (R. VAZ, K. VIEIRA, C. MACHADO, J. FERRARI, 2015).

Por definição geral os pontos quânticos de carbono são partículas de tamanho nanométrico constituídos por um núcleo hibridizado de carbono  $sp^2$ , funcionalizadas com grupos orgânicos, em sua superfície, a qual é geralmente composta por grupos funcionais

orgânicos contendo átomos de carbono, oxigênio, nitrogênio e enxofre, como por exemplo:  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$  e  $-\text{SO}_3\text{H}$ , os quais os tornam solúveis e estáveis, do ponto de vista coloidal, em água e solventes orgânicos polares (LIM; SHEN; GAO, 2015; MIRTICHEV et al., 2012; ZHAO et al., 2015).

A Figura 5 mostra a ilustração de pontos quânticos de carbonos com superfície passivada com grupos oxigenados (esquerda) e com superfície passivada com moléculas orgânicas (direita).

**Figura 5.** Ilustração de pontos quânticos de carbonos.



Fonte: Adaptado de (MIRANDA, 2014)

Em comparação aos semicondutores tradicionais e os corantes orgânicos, os pontos quânticos de carbono são superiores em termos de solubilidade (sobretudo, em meio aquoso), estabilidade química, baixa citotoxicidade, biocompatibilidade, fácil funcionalização e alta resistência à fotodegradação (MACHADO et al., 2015).

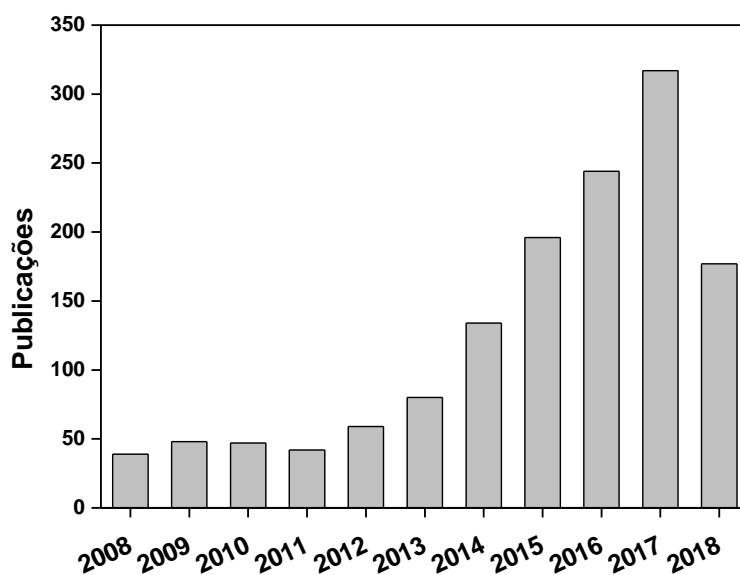
Embora a origem da fluorescência dos pontos quânticos de carbono ainda não esteja completamente estabelecida, alguns estudos relatam que a emissão de fluorescência destes nanomateriais pode ser atribuída ao efeito de confinamento quântico e as diferentes armadilhas emissivas na superfície das nanopartículas (BAKER; BAKER, 2010; LI et al., 2012).

Assim, tem sido relatado que as diferentes armadilhas (sítios ativos) presentes na superfície dos pontos quânticos de carbono são formadas principalmente como resultado da oxidação da região superficial do nanocrystal, servindo como centros de captura dos éxcitons, permitindo assim a sua fluorescência característica. Nesse aspecto, quanto maior o grau de oxidação na região superficial, maior o número de regiões ativas (armadilhas de superfície) (BAO et al., 2015).



Graças às extraordinárias propriedades ópticas que possuem, os pontos quânticos de carbonos estão sendo aplicados em diversas áreas tais como nanossensores, optoeletrônica, imagiologia para investigação biomédica, foto-catálise, entre outras. Como pode ser observado na Figura 6 que relata o crescimento do número de publicações relacionada a pontos quânticos de carbono, evidenciando assim sua importância para diversas áreas.

**Figura 6.** Gráfico do número de publicações indexadas na base de dados *Web of Science* para o período dos últimos 10 anos (2008-2018) com base nos termos “carbon quantum dots” e “Carbon quantum dots; determination”. A pesquisa foi realizada em junho/2018.



Fonte: Autot, 2018.

Dentre as diversas aplicações que os CDots apresentam, o seu uso como sensores fluorescentes tem ganhado bastante interesse devido à ausência de espécies metálicas potencialmente tóxicas em sua estrutura, boa solubilidade em água e fotoestabilidade. Neste sentido, o uso de CDots para a detecção de metais potencialmente tóxicos é de extrema importância, devido aos impactos que estes podem causar ao meio ambiente e os eventuais prejuízos à saúde humana. A aplicação de CDots como sensores fluorescente inclui a detecção de Cu(II), Fe(II), Pb(II), Ag(I), Cr(VI) e Hg(II), por exemplo, através da supressão da fluorescência intrínseca dos CDots na presença destes íons metálicos.

Desta forma, este trabalho explorou dois sistemas distintos baseados em nanopartículas com emissão de radiação como nanosondas fluorescentes para quantificação direta de Cr(VI) e timerosal.

### 3. Referências

ALGARRA, M. et al. Thiolated DAB dendrimers and CdSe quantum dots nanocomposites for Cd(II) or Pb(II) sensing. **Talanta**, v. 88, p. 403–407, 2012.

BAKER, S. N.; BAKER, G. A. Luminescent carbon nanodots: Emergent nanolights. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, n. 38, p. 6726–6744, 2010.

BAO, L. et al. Photoluminescence-tunable carbon nanodots: Surface-state energy-gap tuning. **Advanced Materials**, v. 27, n. 10, p. 1663–1667, 2015.

CESAR, J.; ALVES, L. Aplicação de métodos quimiométricos de calibração de segunda ordem e transferência de calibração na determinação simultânea de misturas de fármacos utilizando espectroscopia de fluorescência molecular em fase sólida. 2009.

DRBOHLAVOVA, J. et al. Quantum dots - characterization, preparation and usage in biological systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 2, p. 656–673, 2009.

DUAN, J. et al. Facile synthesis of N-acetyl-L-cysteine capped ZnS quantum dots as an eco-friendly fluorescence sensor for Hg<sup>2+</sup>. **Talanta**, v. 85, n. 4, p. 1738–1743, 2011.

FRIGERIO, C. et al. Application of quantum dots as analytical tools in automated chemical analysis: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 735, p. 9–22, 2012.

GOMES, C. Z. Utilização da espectroscopia de fluorescência para mensuramento de moléculas autofluorescentes em indivíduos diabéticos. p. 1–56, 2011.

JO, M.; MAGALH, M. Síntese e modificação da superfície de nanocristais semicondutores para aplicação como sondas fluorescentes em meio não-aquoso. 2014.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy Principles of Fluorescence Spectroscopy**. [s.l: s.n.].

LI, H. et al. Carbon nanodots: synthesis, properties and applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 46, p. 24230, 2012.

LIM, S. Y.; SHEN, W.; GAO, Z. Carbon quantum dots and their applications. **Chem. Soc. Rev.**, v. 44, n. 1, p. 362–381, 2015.

MACHADO, C. E. et al. Pontos Quânticos de Carbono: Síntese Química, Propriedades e Aplicações. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1306–1346, 2015.

MENEZES, F. D. Síntese e Caracterização de Nanocristais Luminescentes Baseados em Semicondutores II-VI para Fins de Aplicação como Biomarcadores. 2007.

MIRANDA, J. E. B. Carbon Dots: Nanopartículas de carbono fluorescentes para marcação e visualização de células. p. 113, 2014.

MIRTCHEV, P. et al. Solution phase synthesis of carbon quantum dots as sensitizers for nanocrystalline TiO<sub>2</sub> solar cells. **J. Mater. Chem.**, v. 22, n. 4, p. 1265–1269, 2012.

NSIBANDE, S. A.; FORBES, P. Fluorescence detection of pesticides using quantum dot materials – A review. 2016.

R. VAZ, K. VIEIRA, C. MACHADO, J. FERRARI, M. S. Preparação de pontos de carbono e sua caracterização óptica: um experimento para introduzir nanociência na graduação. v. 35, n. 9, p. 1758–1762, 2015.

SAMANTA, A. et al. A perspective on functionalizing colloidal quantum dots with DNA. **Nano Research**, v. 6, n. 12, p. 853–870, 2013.

SHINDE, K. N. et al. Phosphate Phosphors for Solid-State Lighting. v. 174, p. 41–60, 2012.

TOMCZAK, N. et al. Designer polymer-quantum dot architectures. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 34, n. 5, p. 393–430, 2009.

ZHAO, A. et al. Recent advances in bioapplications of C-dots. **Carbon**, v. 85, n. December, p. 309–327, 2015.

# Capítulo I

*Aplicação de pontos quânticos de carbono (carbon quantum dots) como sondas fluorescentes para determinação de Cr(VI) em amostras ambientais*

## Resumo

Neste trabalho foram sintetizados pontos quânticos de carbono (CDots) como sensores fluorescentes para determinação de Cr(VI). Os CDots foram preparados por pirólise da mistura dos precursores moleculares ácido cítrico e glutatona reduzida. A pirólise revelou ser um procedimento simples que forneceu CDots com um rendimento quântico de fotoluminescência de 69,4% e tamanho de partícula de cerca de 2,5 nm. Para explorar a potencialidade analítica do nanomaterial produzido, os CDots foram aplicados como sensores fluorescentes para determinar Cr(VI) em amostras de água e solo. Na investigação dos parâmetros de interação entre os CDots e o Cr(VI), a constante de ligação ( $K_b$ ) obteve uma diminuição com o aumento da temperatura, evidenciando assim o processo de *quenching* estático, com a formação de um complexo supramolecular no estado fundamental. Adicionalmente, o processo de supressão da fluorescência está relacionado ao *inner filter effect*. Os valores negativos da variação da entalpia e entropia levam a um processo com interações sendo realizadas preferencialmente por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals. Foram avaliados 30 possíveis interferentes ao método, onde Pb(II), Ba(II), Fe(II), Al(III) e Fe(III) foram considerados interferentes ao método. Após a otimização dos principais parâmetros analíticos, o método apresentou faixa linear de 0,10 - 12 mg mL<sup>-1</sup> com limite de detecção (LOD) de 0,03 mg mL<sup>-1</sup> (pH 7) e recuperações de 90 - 105% e 99,5 - 107% para amostras de água e solo, respectivamente. Assim, o método mostrou-se sensível, rápido e versátil para aplicações em amostras de água e solo.

**Palavras-chave:** *carbon quantum dots; Cr(VI); quenching de fluorescência; águas; solos.*

### Abstract

In this work carbon quantum dots (CDots) were synthesized as fluorescent sensors for Cr(VI) determination. The CDots were prepared by pyrolysis of the mixture of precursors formed by citric acid and reduced glutathione. Pyrolysis proved to be a simple procedure which provided CDots with a photoluminescence quantum yield of 69.4% and particle size of approximately 2.5 nm. To explore the analytical potential of the nanomaterial, the CDots were applied as fluorescent sensors to determine Cr(VI) in water and soil samples. In the investigation of the interaction parameters between the CDots and the Cr(VI), the binding constant ( $K_b$ ) decreased as the temperature increase, thus demonstrating the static quenching process, with the formation of a supramolecular complex in the steady state. In addition, the fluorescence suppression process is related to the inner filter effect. The negative values of enthalpy change and entropy lead to a process with interactions being performed preferably by hydrogen bonds and van der Waals forces. It was evaluated 30 possible interferences to the method, where Pb(II), Ba(II), Fe(II), Al(III) and Fe(III) were considered interfering with the method. After optimization of the main analytical parameters, the method presented a linear range of 0.10 - 12 mg mL<sup>-1</sup> with limit of detection (LOD) of 0.03 mg mL<sup>-1</sup> (pH 7), and recoveries of 90 - 105% and 99.5 - 107% for water and soil samples, respectively. Thus, the method proved to be sensitive, fast and versatile for applications in water and soil samples.

**Keywords:** *Carbon quantum dots; Cr(VI); fluorescence quenching; waters; soils.*

## 1. Introdução

Os materiais luminescentes vêm sendo aplicados com grande vigor em diversos campos de pesquisa (MIRTCHEV et al., 2012; RAY et al., 2009; SHEN et al., 2012; LI et al., 2010). Os *Carbon Dots* (CDots) têm sido considerados como uma nova atração dos materiais luminescentes, devido as suas propriedades associadas a estabilidade química, solubilidade em água e em solventes orgânicos, resistência à fotodegradação, biocompatibilidade e baixa toxicidade. As aplicações potenciais destes materiais abrangem áreas como bioimageamento, fotocatalise, células solares, LEDs, sensores fluorescentes, entre outros (YANG et al., 2013; SUN et al., 2014).

Por definição geral, os CDots são partículas de tamanho nanométrico constituídos por um núcleo hibridizado de carbono  $sp^2$ , funcionalizadas com grupos orgânicos, em sua superfície. A superfície dos CDots é geralmente composta por grupos funcionais orgânicos contendo átomos de carbono, oxigênio, nitrogênio e enxofre, como por exemplo:  $-CO_2H$ ,  $-NH_2$ ,  $-OH$  e  $-SO_3H$ , os quais os tornam solúveis e estáveis, do ponto de vista coloidal, em água e solventes orgânicos polares (ZHAO et al., 2015; LIM et al., 2015).

Os componentes fundamentais na constituição dos CDots são: carbono, hidrogênio e oxigênio. A quantidade destes elementos é distinta nos diferentes CDots reportados na literatura, sendo a quantidade de cada um deles dependentes do material de partida utilizado na síntese, bem como a rota sintética utilizada (QIAN et al., 2014; XU et al., 2013; DONG et al., 2013; CHANDRA et al., 2013). A introdução de heteroátomos vem sendo reportada no ajuste da posição das bandas de energia dos CDots, uma vez que heteroátomos também podem afetar o rendimento quântico de fotoluminescência ( $\Phi_f$ ) (ZHAI et al., 2012; JIANG et al., 2012; DING et al., 2012). Por conseguinte, umas das principais razões dos CDots atraírem grande atenção dos pesquisadores é devido suas propriedades de emissão de luz visível. Na literatura, há relatos de valores de rendimento quântico de fotoluminescência ( $\Phi_f$ ) de 3,8 a 88%, dependendo do método de preparação e do precursor utilizado (HSU et al., 2012; ZENG et al., 2013).

Os CDots podem ser utilizados como sensores fluorescentes devido à ausência de espécies metálicas em sua estrutura, solubilidade em água e fotoestabilidade. A detecção de metais com comprovada toxicidade, como crômio, mercúrio e chumbo, é de extrema importância, devido aos impactos que estes podem causar ao meio ambiente e os eventuais prejuízos à saúde humana. A aplicação de CDots como sensores fluorescentes incluem a detecção de  $Cu(II)$ ,  $Fe(II)$ ,  $Pb(II)$ ,  $Ag(I)$ ,  $Cr(VI)$  e  $Hg(II)$ , por exemplo, através

da supressão da fluorescência intrínseca dos CDots na presença dos íons metálicos em determinadas condições otimizadas (LIM et al., 2015).

Em especial, o crômio pode ser encontrado com diversos estados de oxidação sendo, mais comuns Cr(II), Cr(III) e Cr(VI). O crômio hexavalente Cr(VI) tem sido utilizado em diversas aplicações na indústria de eletrônicos, como: tubos de raios catódicos, painéis de circuitos integrados e blindagem, além do emprego na fabricação de corantes e pigmentos (DIMA et al., 2015). O Cr(VI) provoca danos quando ingerido ou inalado por seres humanos, podendo até gerar tumores. A Organização Mundial de Saúde (WHO) limita a ingestão do consumo humano de Cr(VI) em  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ , porém não foram encontrados estudos que comprovem a quantidade mínima de Cr(VI) que possa provocar doenças, quando ingerido (WHO, 2011).

Alguns trabalhos relatam a detecção de Cr(VI) empregando CDots de diferentes formas. M. Zheng et al. (2013) descreveram a determinação de Cr(VI) utilizando CDots como sensores fluorescentes. Os CDots foram sintetizados a partir do ácido cítrico como fonte de material carbonoso e dietilenotriamina como sensibilizador de superfície das nanopartículas. Os CDots sintetizados apresentaram intensa luminescência no azul do espectro eletromagnético, além de um elevado  $\Phi_f$  (88,6%). A constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) para o processo de interação foi de  $6,9 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$  correspondente à faixa linear de  $0,52\text{-}2600 \text{ ng L}^{-1}$ , a qual atende o limite delimitado pela WHO. Alternativamente, Y. Liu et al. (2015) descreveram a quantificação de Cr(VI) em amostras de água utilizando CDots preparados a partir de fuligem de vela e polietilenoimina como material adsorvente para concentração de Cr(VI). Os CDots provaram sua eficácia na adsorção de Cr(VI) com fator de enriquecimento de 30 vezes e limite de detecção de  $0,21 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  empregando FAAS como sistema de detecção. Desta forma, CDots mostram-se versáteis quanto a diferentes aplicações analíticas para determinação de Cr(VI).

Até agora, uma grande variedade de procedimentos e variados precursores foram utilizados na preparação dos CDots. Tais variações sintéticas geram nanomateriais diferentes, e como as propriedades de fluorescência dos CDots estão diretamente ligadas ao material de partida e grupos funcionais incorporados em sua superfície, ocorre dificuldade na normalização e para estabelecer um mecanismo efetivo no desenvolvimento de sensores analíticos à base de CDots. Portanto, este trabalho visa desenvolver um método analítico para quantificar Cr(VI) em diferentes amostras de água e solo explorando o processo de interação do Cr(VI) com CDots sintetizado com ácido cítrico e glutamina.



## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Aplicação analítica de pontos quânticos de carbono (*carbon quantum dots* - CDots) sintetizados com ácido cítrico e glutatona, como sonda fluorescente para determinação de Cr(VI) em amostras de água e solo.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito do pH na interação do CDots e Cr(VI);
- Realizar a otimização dos parâmetros químicos e físicos do sistema para a determinação de Cr(VI);
- Avaliar a cinética de reação e estabilidade fotoquímica dos CDots;
- Determinar os parâmetros de ligação e termodinâmicos dos CDots e Cr(VI);
- Realizar o estudo das possíveis espécies interferentes e estabelecer as figuras de mérito do método proposto;
- Validar o método por meio de ensaio de recuperação em amostras de água e solo.

### 3. Experimental

#### 3.1 Reagentes e soluções

Para todos os experimentos se empregou reagentes de grau analítico de pureza e água tipo II (condutividade elétrica menor que  $1 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) foi utilizada durante o processo de síntese e quantificação do Cr(VI). Os reagentes utilizados na síntese dos CDots foram glutathiona cristalizada na forma reduzida (Sigma,  $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$  a 98%) e ácido cítrico anidro P.A. (Vetec,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  a 99,5%). Os reagentes utilizados não foram submetidos a nenhum procedimento de purificação. Solução estoque  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de Cr(VI) foi preparada dissolvendo 2,81 mg de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (Merck), previamente seco à temperatura de  $120^\circ\text{C}$ , em 10 mL de água. As soluções de trabalho foram preparadas a partir de diluições adequadas da solução estoque. Tampão Britton-Robinson de pH 2-10 foram preparadas a partir da mistura de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Merck),  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Sigma) e ácido acético (Sigma), todos a  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , sendo o pH final ajustado com NaOH ou HCl  $1 \text{ mol L}^{-1}$ . Os tampões 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol (Tris, Vetec), ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico (HEPES, Sigma) e ácido 1,4-piperazinadietanosulfônico (PIPES, Sigma) foram utilizados na avaliação dos diferentes sistemas tampão. Uma solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Merck) foi utilizada para extração seletiva de Cr(VI) das amostras de solo. Na análise de possíveis interferentes, todos os reagentes empregados foram de grau e pureza analítica.

#### 3.2 Síntese dos *carbon quantum dots* - CDots

Para a preparação dos CDots a partir de ácido cítrico e glutathiona reduzida, utilizou-se a seguinte metodologia: pesou-se 1,5 g de ácido cítrico e 0,5 g de glutathiona reduzida. Após a pesagem, os sólidos foram misturados até formarem uma mistura homogênea visualmente. Em seguida, a mistura dos sólidos foi levada a um forno tubular de alumina para tratamento térmico, os precursores foram aquecidos empregando uma taxa de  $10^\circ\text{C min}^{-1}$ , e mantido durante 120 min à  $270^\circ\text{C}$ . Após a carbonização, o produto foi triturado até a obtenção de um pó finamente dividido. Posteriormente, o pó foi transferido para um béquer e adicionados 100 mL de água. O sistema foi colocado em banho de ultrassom durante 30 min, a fim de extrair as nanopartículas, uma vez que, após a pirólise elas podem estar adsorvidas pelo carvão formado durante a síntese. Em seguida, a mesma foi submetida à agitação e aquecimento por 30 min, a temperatura de  $100^\circ\text{C}$  para auxiliar no processo de extração dos CDots. Por fim, o sistema foi centrifugado a

3600 rpm por 15 min e filtrada em membrana PVDF com poros de 0,22  $\mu\text{m}$  (Micropore), descartando-se o precipitado.

A síntese e caracterização do nanomaterial foi realizada pelo grupo do Prof. Marco Schiavon da Universidade Federal de São João del-Rei (MG).

### 3.3 Caracterização do CDots

Os espectros de absorção foram registrados em um espectrofotômetro de duplo feixe com um detector do tipo tubo fotomultiplicador (UV-2550, Shimadzu). As medidas foram realizadas na região de 200 a 900 nm, utilizando-se água como solvente de referência e células de quartzo (Hellma) de 10 mm de caminho óptico. Os espectros de emissão foram obtidos em um espectrofluorímetro (RF-5301PC, Shimadzu). Os espectros foram registrados na faixa de 330 a 650 nm em células de quartzo de 10 mm de caminho óptico. Uma lâmpada de xenônio de 150 W foi empregada como fonte de excitação, com fendas de 3 nm para emissão e excitação, respectivamente. As medidas de tempo de vida do estado excitado foram registradas utilizando um espectrofluorímetro Horiba Fluorolog-3 Jobin-Yvon. A excitação foi realizada utilizando uma nanoled pulsado com comprimento de onda de excitação de 341 nm,

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier da Perkin Elmer modelo Spectrum GX. Foram registrados espectros na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , usando resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e acúmulo de 64 espectros. As amostras foram dispersas em KBr e pastilhadas com auxílio de uma prensa hidráulica com o uso de 10 toneladas de pressão de compactação.

As amostras de CDots foram caracterizadas em um microscópio (Jem 2100, FEG-TEM) operando em 200 kV. As amostras foram preparadas adicionando-se, com auxílio de uma seringa, uma gota dos materiais dispersos em água, sobre uma grade de cobre de 300 mesh com *Holey Carbon* e uma fina camada de carbono.

A estrutura cristalina dos precursores e dos materiais obtido após o tratamento térmico foi analisada por difração de raios X (DRX), utilizando um difratômetro (Shimadzu) com radiação,  $K\alpha$  do Cu,  $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ , monocromador de grafite e varredura de 0,02 graus, entre  $2\theta = 10^\circ$  a  $80^\circ$ ).

Para determinação do rendimento quântico de fotoluminescência foram preparadas uma solução padrão de um corante e uma suspensão de CDots. Os materiais foram excitados em 355 nm. Espectros de absorção do nanomaterial e padrão foram obtidos, tendo como referência a intensidade de absorção no comprimento de onda de

excitação. Assim, se obteve um gráfico de área integrada de fotoluminescência vs intensidade de absorbância. O coeficiente angular dos gráficos obtidos foi utilizado para determinar os valores de rendimentos quânticos de acordo com a equação 1.

$$\Phi_f = \Phi_{ST} \left( \frac{m_S}{m_{ST}} \right) \left( \frac{\eta_S^2}{\eta_{ST}^2} \right) \quad \text{Equação (1)}$$

Neste caso, os subscritos S e ST representam a amostra teste e a substância padrão, respectivamente. O termo  $m$  corresponde ao coeficiente angular obtido a partir da regressão linear do gráfico intensidade de fluorescência integrada vs absorbância e,  $\eta$  é o índice de refração da solução da amostra teste e substância padrão. A substância padrão usada para determinar o  $\Phi_f$  deve apresentar emissão e absorção em uma região similar à da amostra que se deseja determinar este parâmetro. Por essa razão, o sulfato de quinino foi utilizado como substância padrão ( $\Phi_{ST} = 54\%$ ) para determinação dos  $\Phi_f$  dos CDots.

As curvas de tempo de vida de decaimento radiativo auxiliam na caracterização de diferentes centros de emissão dos nanomateriais. A excitação foi realizada utilizando um *nanoled* pulsado com comprimento de onda de excitação de 341 nm. As curvas foram obtidas fixando as emissões para os CDots em 431 nm a temperatura ambiente. A curva de tempo de vida no estado excitado foi melhor ajustada com a ajuda de uma curva mono exponencial representada pela equação 2:

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad \text{Equação (2)}$$

Onde  $I$  e  $I_0$ , corresponde a intensidade e intensidade inicial, respectivamente,  $t$  o tempo em ns e  $\tau$  corresponde ao tempo de meia vida.

### 3.4 Determinação de Cr(VI) empregando CDots

No procedimento padrão, 100  $\mu\text{L}$  de uma solução 0,13  $\text{mg L}^{-1}$  dos CDots e 100  $\mu\text{L}$  do tampão Tris 60  $\text{mmol L}^{-1}$  (pH 7) foram misturados com volumes crescentes da solução estoque do analito perfazendo concentrações final de Cr(VI) na faixa de 0,10 - 12  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (1,92 - 230  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Em seguida, adicionou-se água até 1,0 mL e aguardou-se 20 min a temperatura ambiente antes das medições espectrofluorimétricas ( $\lambda_{\text{ex}} = 350$  nm). A intensidade de fluorescência máxima obtida em 418 nm foi utilizada para a quantificação de Cr(VI). Para otimização dos parâmetros analíticos utilizou-se a sensibilidade (*slope*) em função da equação:

$$\left[ \frac{I_0 - I_F}{I_F} \right] = aC_{Cr(VI)} + b \quad \text{Equação (3)}$$

onde  $I_0$  e  $I_F$  correspondem a intensidade de fluorescência inicial dos CDots e após adição do Cr(VI), respectivamente, e  $C_{Cr(VI)}$  é a concentração de cromo ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A sensibilidade analítica e o coeficiente linear são representados por  $a$  e  $b$ , respectivamente. Todas as curvas analíticas apresentaram um mínimo de cinco pontos com medidas em triplicata ( $n = 3$ ).

As figuras de mérito do método proposto foram determinadas conforme procedimentos já estabelecidos (ELLISON et al., 2009). Os parâmetros avaliados foram LOD (limite de detecção), LOQ (limite de quantificação) e RSD (desvio padrão relativo), com dois pontos da curva preparados e medidos dez vezes ( $n = 10$ ). Os cálculos relativos aos limites de detecção ( $3\sigma$ ) e de quantificação ( $10\sigma$ ) foram realizados de acordo com as seguintes equações:

$$LOD = \frac{3sb}{a_c} + C_{branco} \quad \text{Equação (4)}$$

$$LOQ = \frac{10 sb}{a_c} + C_{branco} \quad \text{Equação (5)}$$

onde  $C_{branco}$  = concentração relativa ao sinal do branco,  $sb$  equivale ao desvio padrão do branco analítico ( $n = 10$ ), enquanto  $a_c$  corresponde ao coeficiente angular da curva analítica empregada. O desvio padrão relativo (RSD) foi calculado de acordo com a equação:

$$RSD = \frac{sp}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação (6)}$$

onde  $sp$  equivale ao desvio padrão referente a um determinado padrão analítico dentro da faixa linear e  $\bar{x}$  corresponde ao valor médio encontrado para este padrão ( $n = 10$ ).

### 3.5 Preparo das amostras de água e solo

O método proposto foi utilizado para a quantificação de Cr(VI) em amostras de água e solo. Foram utilizadas quatro amostras diferentes de água para quantificação e avaliação da recuperação de Cr(VI), incluindo água salobra do complexo estuarino Mundaú-Manguaba ( $9^{\circ}35'24''\text{S } 35^{\circ}47'26''\text{W}$ ) e água doce do Rio Catolé ( $9^{\circ}35'24''\text{S } 35^{\circ}47'26''\text{W } 341^{\circ}\text{N}$ ), ambas do município de Maceió (Alagoas, Brasil), além de água mineral comercial e potável. As amostras de água foram filtradas com membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  (ésteres de celulose) e, percoladas por uma coluna de troca iônica Dowex<sup>®</sup> 50-X8 (10

cm de comprimento,  $id = 5$  mm, contendo 2,5 g de resina), para remoção de possíveis interferentes catiônicos. Amostras de solo de cultura de alface e turfa foram caracterizadas e avaliadas quanto a concentração e ensaio de recuperação do Cr(VI). Para extração seletiva do Cr(VI) das amostras de solo seguiu-se procedimento descrito por Panichev et al. (2003), onde 5,0 g da amostra de solo foram levado a estufa a 500 °C durante 10 h, em seguida foi adicionado a 250 mg da amostra 25 mL da solução  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 mol L<sup>-1</sup> e levado a chapa de aquecimento onde permanece durante 10 min após entrar em ebulição, para então a solução ser centrifugada durante 15 min (4000 rpm) e filtrada.

## 4 Resultados e Discussões

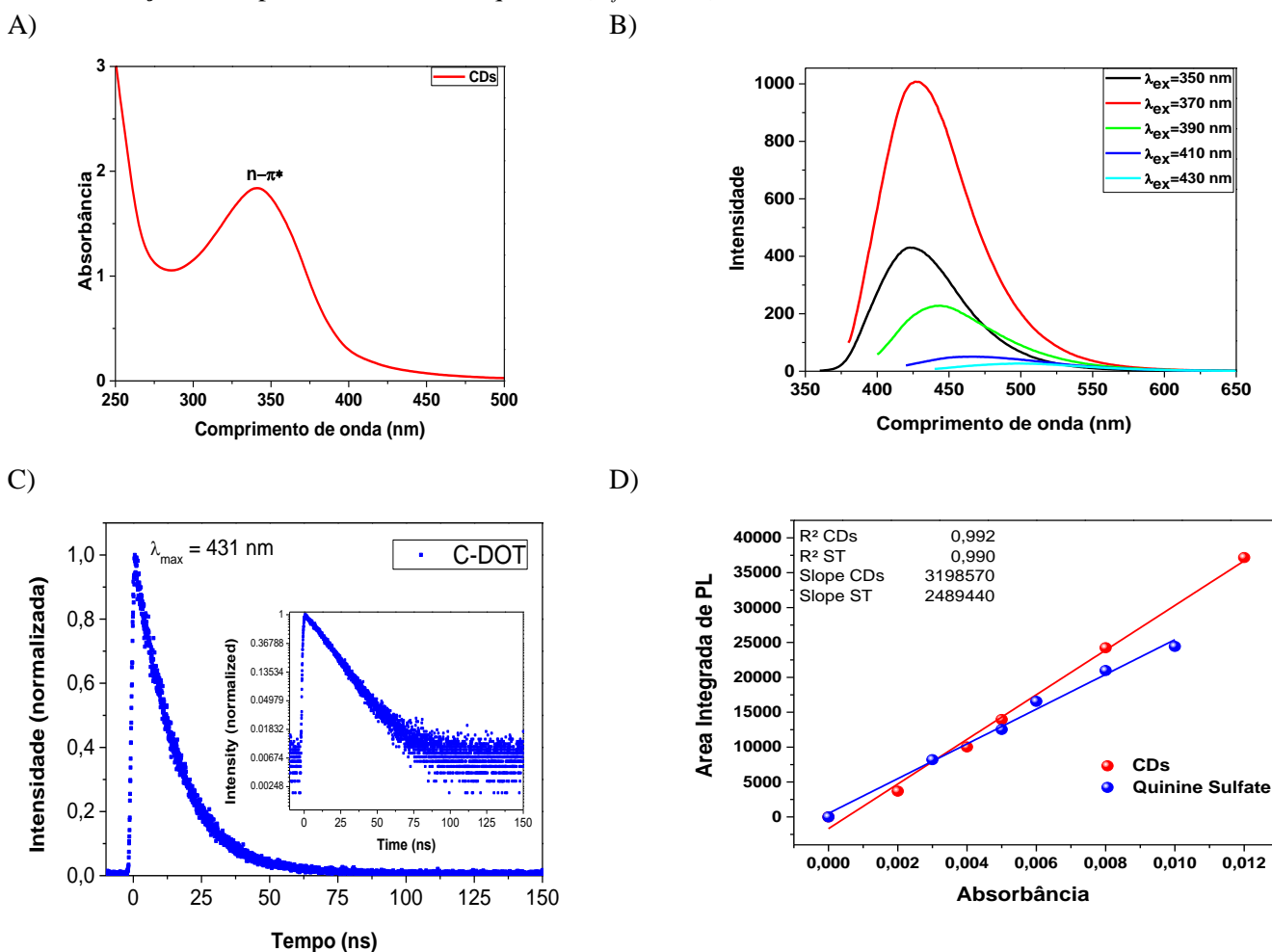
### 4.1 Caracterização dos CDots

A Figura 1A apresenta o espectro de absorção na região do ultravioleta visível dos CDots. O material apresentou ampla absorção na faixa do ultravioleta se estendendo até o visível do espectro eletromagnético com uma banda em 341 nm. Diferentemente dos CDots apresentados na literatura que exibem duas bandas de transição, os CDots preparados apresentam apenas uma banda correspondendo a transições do tipo C-O e C=O devido a transições  $n \rightarrow \pi^*$ , de grupos carboxílicos, localizada em 341 nm. Uma possível explicação para o fato pode estar ligado aos grupos remanescentes da glutatona estarem localizados na superfície dos CDots, blindando eficazmente o núcleo onde estão situado carbonos do tipo  $sp^2$  referentes a transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  (LI et al., 2014; DONG et al., 2012; SAHU et al., 2012).

A Figura 1B apresenta os espectros de emissão CDots preparados e excitados em diferentes comprimentos de onda. Foi observado que as amostras apresentam a banda máxima de emissão na região do azul do espectro eletromagnético, sendo possível observar o deslocamento das bandas para a região do vermelho no espectro com o aumento do comprimento de onda de excitação. Esse deslocamento é devido à grande variedade de grupos orgânicos na superfície dos CDots, tais grupos geram estados intermediários entre os orbitais HOMO e LUMO do material, gerando emissão em maiores intervalos do espectro eletromagnético. Os CDots preparados a partir do ácido cítrico com incorporação de glutatona apresentam sua maior intensidade de emissão quando excitados em 370 nm (LI et al., 2014; VAZ et al., 2015). A dispersão dos CDots apresenta estabilidade coloidal em meio aquoso e são translúcidas quando não estão sob irradiação de luz. A irradiação de luz ultravioleta e a emissão de cor azul é a primeira evidência de formação dos CDots conforme mostrado na figura da Figura 1B (parte interna), quando irradiadas a 365 nm.

A Figura 1C apresenta a curva de decaimento do tempo de vida do estado excitado dos CDots, a curva pôde ser ajustada para um modelo mono exponencial. O tempo de vida dos CDots foi  $\tau = 14,58$  ns. O decaimento mono exponencial pode estar relacionado com a dopagem dos CDots com glutatona, a qual proporciona níveis de energia adicionais aos CDots (ZHUO et al., 2015; ZENG et al., 2015). Devido ao curto tempo de vida e a rápida transferência de elétrons os CDots estes apresentam potencial para serem utilizados em dispositivos optoeletrônicos (SALAM et al., 2015).

**Figura 1.** A) Espectro de UV-vis da amostra de CDots derivadas de ácido cítrico e glutaciona, obtidos por pirólise a 270°C; B) Espectros de fotoluminescência dos CDots excitados em diferentes comprimentos de onda; C) Curva de decaimento do tempo de vida do estado excitado para a amostra de CDots; D) Área integrada de fotoluminescência em função da absorbância para cálculo do rendimento quântico de fotoluminescência dos CDots sintetizados. A curva de menor inclinação corresponde do sulfato de quinino ( $\Phi_f = 54\%$ ).



Fonte: Elaborado por Marco Schiavon, 2017.

A Figura 1D mostra as curvas correspondentes ao cálculo do rendimento quântico de fotoluminescência. Os CDots incorporados com glutaciona apresentam  $\Phi_f$  69,38%. O elevado valor do  $\Phi_f$ , pode ser atribuído à introdução de novos estados intermediários de energia, provocados pelos átomos de nitrogênio e enxofre no material, uma vez que o precursor de ácido cítrico isoladamente possui apenas carbono, hidrogênio e oxigênio em sua composição (ZHUO et al., 2015; MACHADO et al., 2015). O elevado valor de  $\Phi_f$  mostra que o método de pirólise em atmosfera inerte é altamente eficaz na produção de CDots, além de ser simples e barato (VAZ et al., 2015).



Yongqiang Dong et al. (2012), prepararam CDots por carbonização do precursor de ácido cítrico, com tamanho de 15 nm, medidos por microscopia de força atômica. Os CDots foram classificados de acordo com seu grau de carbonização, completa ou incompleta. Os CDots com carbonização completa apresentam emissão dependente do comprimento de onda de excitação, deslocando o máximo de emissão com o aumento da radiação incidente, com  $\Phi_f$  de 9,0%. Os CDots que sofreram carbonização incompleta exibem emissão independente do comprimento de onda de excitação, o valor de  $\Phi_f$  calculado foi de 2,2%. Ambos  $\Phi_f$  foram calculados utilizando sulfato de quinino como padrão.

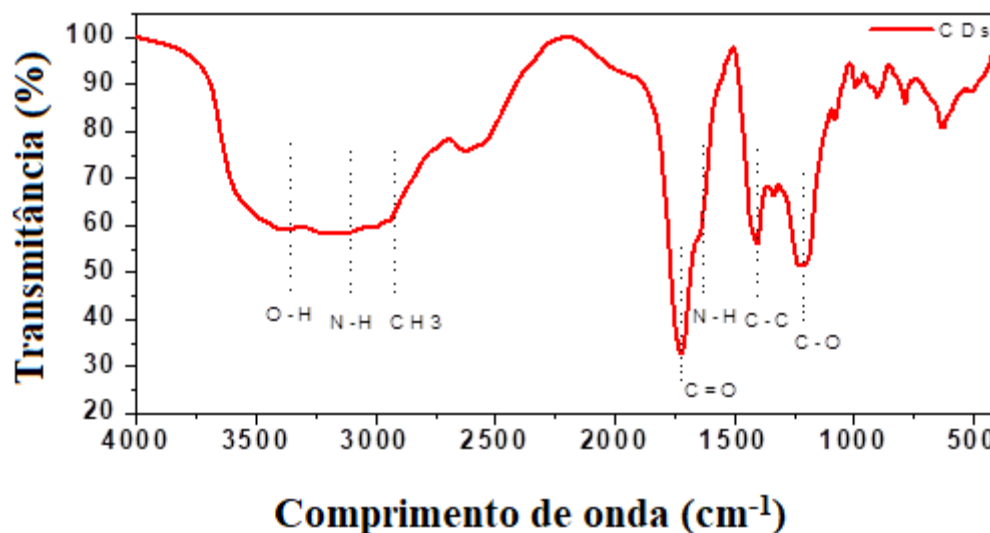
Sahu et al. (2012), descrevem a preparação de CDots utilizando suco de laranja como precursor, um material sem toxicidade e de fácil acesso, por uma rota hidrotermal simples. Os CDots apresentam grupos funcionais C-OH, C-C, C=O e C-H em sua superfície, as nanopartículas exibem luminescência dependente do comprimento de onda de excitação, o autor atribui a emissão a defeitos criados na estrutura gerados pelos grupos funcionais. O  $\Phi_f$  foi de 26%, um dos mais altos valores, encontrados para CDots com precursores de baixo custo.

A incorporação da glutatona no ácido cítrico já havia sido reportada na literatura com  $\Phi_f$  de 80,3%, por rota hidrotérmica. De acordo com o Zhuo et al. (2015), os CDots preparados utilizando ácido cítrico e glutatona por tal rota apresentam emissão independente do comprimento de onda de excitação. Tal fato pode estar ligado a rota de preparação dos CDots, uma vez que via pirólise, utiliza-se temperatura de preparação mais elevada.

A espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para a caracterização dos CDots, para se obter informações sobre os grupos funcionais presentes nas nanopartículas. A Figura 2 apresenta o espectro de FTIR dos CDots. O material sintetizado possui uma banda de vibração de hidroxilas entre 3500-3200  $\text{cm}^{-1}$ . O estiramento simétrico de carbonila situado em 1711  $\text{cm}^{-1}$ , somados aos estiramentos de hidroxila e carboxila leva-se a concluir que a nanopartícula possui o grupo ácido carboxílico em sua superfície. Os CDots apresentam vibrações de estiramento assimétrico de N-H em aproximadamente em 3152  $\text{cm}^{-1}$  e dobramento de N-H em 1630  $\text{cm}^{-1}$ . Essas vibrações são típicas de grupos aminas provenientes da glutatona, onde foi possível observar que a incorporação desse grupo foi efetiva e tais grupamentos podem melhorar o  $\Phi_f$  das nanopartículas. As vibrações de C-H e C-C podem ser

observadas em 2921 e 1400  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente (DONG et al., 2015) (SAHU et al., 2012) (PAVIA, 2010).

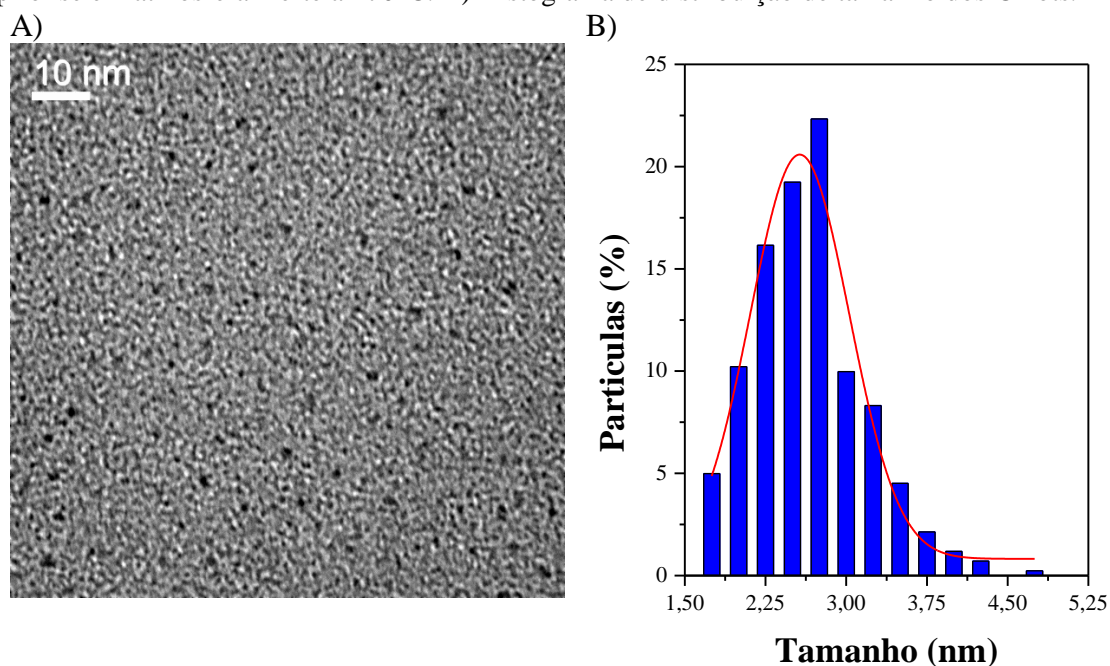
**Figura 2.** Espectro infravermelho dos CDs derivados de ácido cítrico com incorporação de glutatona, obtidos por pirólise a 270°C.



Fonte: Elaborado por Marco Schiavon, 2017.

A Figura 3A apresenta micrografias de TEM dos CDots preparados. É possível observar que as nanopartículas apresentam morfologia quasi-esférica, conforme já relatados por outros autores (SHEN et al., 2012; ZHAO et al., 2015; MACHADO et al., 2016). Além disso, na Figura 3B é apresentado um histograma com a distribuição de tamanhos das partículas em que é possível verificar que o tamanho médio é de 2,5 nm, com dispersão de tamanhos variando de 1,75 a 4,75 nm.

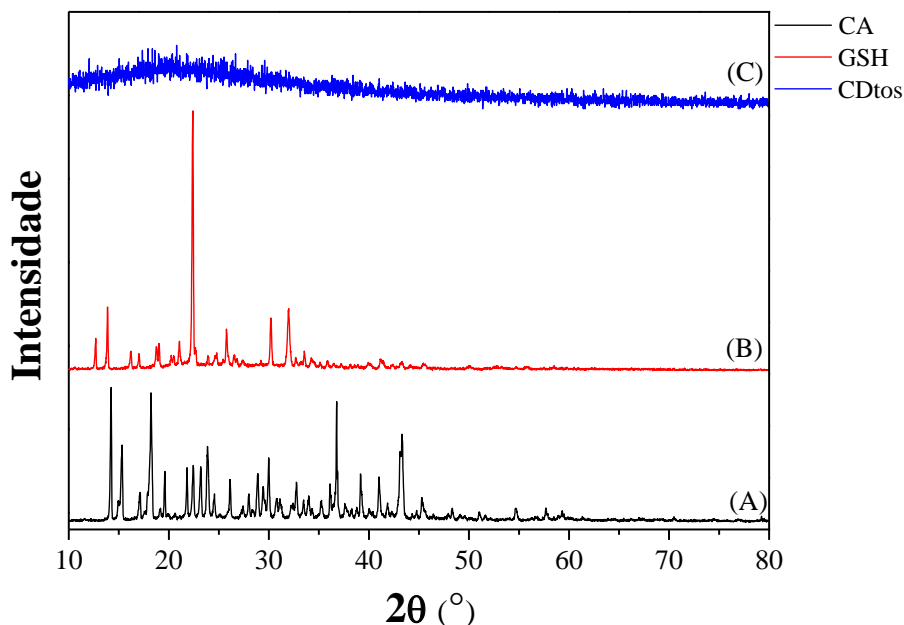
**Figura 3.** A) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão da amostra de CDots obtidos por pirólise em atmosfera inerte a 270°C. B) Histograma de distribuição de tamanho dos CDots.



Fonte: Elaborado por Marco Schiavon, 2017.

Foi observado que as amostras apresentaram caráter tipicamente não cristalino, uma vez que imagens de alta resolução não puderam ser obtidas. Além disso, a difração de elétrons não indicou a presença de planos cristalográficos. A ausência de cristalinidade das nanopartículas também foi confirmada por DRX, conforme apresentado na Figura 4, uma vez que não foram observados planos cristalinos, corroborando assim com os resultados de DRX. A Figura 4 apresenta as análises de DRX dos precursores e do CDots obtido. É possível observar que os precursores de ácido cítrico e glutatona reduzida apresentam elevada cristalinidade, diferentemente do CDots preparados via pirólise que apresentam um caráter tipicamente não cristalino, com um halo típico de materiais carbonosos amorfos em  $2\theta = 22^\circ$  (SHEN et al., 2012; LIM et al., 2015; SAHU et al., 2012). Uma possível explicação para a falta de cristalinidade é que os precursores ao serem submetidos a elevada temperatura se degradam de forma incompleta formando as nanopartículas fluorescentes.

**Figura 4.** Difratomogramas de raios X dos precursores. (A) CA (ácido cítrico), (B) GSH (glutaciona) e (C) CDots derivados de ácido cítrico com incorporação de glutaciona, obtidos por pirólise a 270°C.

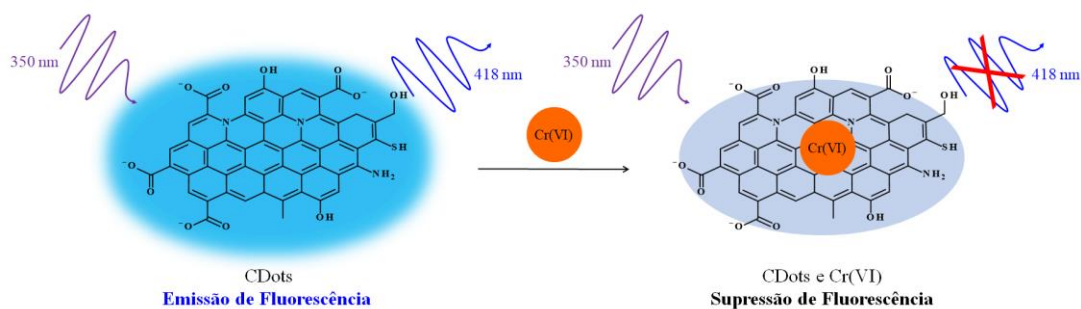


Fonte: Elaborado por Marco Schiavon, 2017.

## 4.2 Otimização dos parâmetros analíticos

Os CDots produzidos em meio aquoso apresentam emissão de fluorescência no azul ( $\lambda_{em} = 418 \text{ nm}$ ) e na presença de Cr(VI) essa intensidade de fluorescência é rapidamente diminuída proporcional a quantidade de Cr(VI) presente no meio (Figura 5). Para explorar de forma eficiente os CDots produzidos como sonda fluorescente para determinação de Cr(VI) alguns parâmetros analíticos foram otimizados.

**Figura 5.** Princípio de determinação de Cr(VI) explorando CDots como sonda fluorescente.

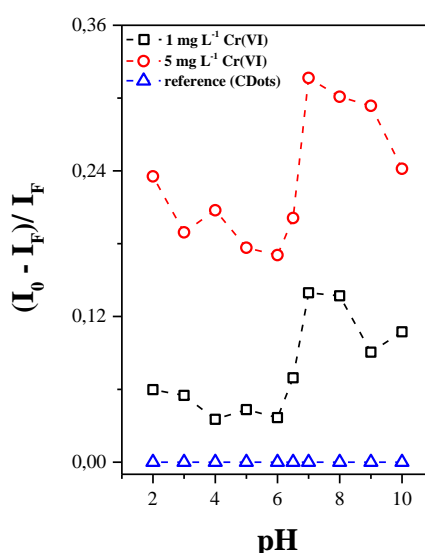


Fonte: Autor, 2017.

### 4.2.1 Avaliação do pH

A avaliação do pH do meio é um importante parâmetro para a otimização do método, visto que pode influenciar na intensidade de fluorescência, eficiência do processo de *quenching* e distribuição das espécies de Cr(VI). Inicialmente, o pH do sistema foi avaliado utilizando o tampão Britton-Robinson (pH 2-10) (Figura 6).

**Figura 6.** Efeito do pH no quenching de CDots em diferentes concentrações de Cr(VI), empregando tampão Britton–Robinson 0,04 M.



Fonte: Autor, 2017.

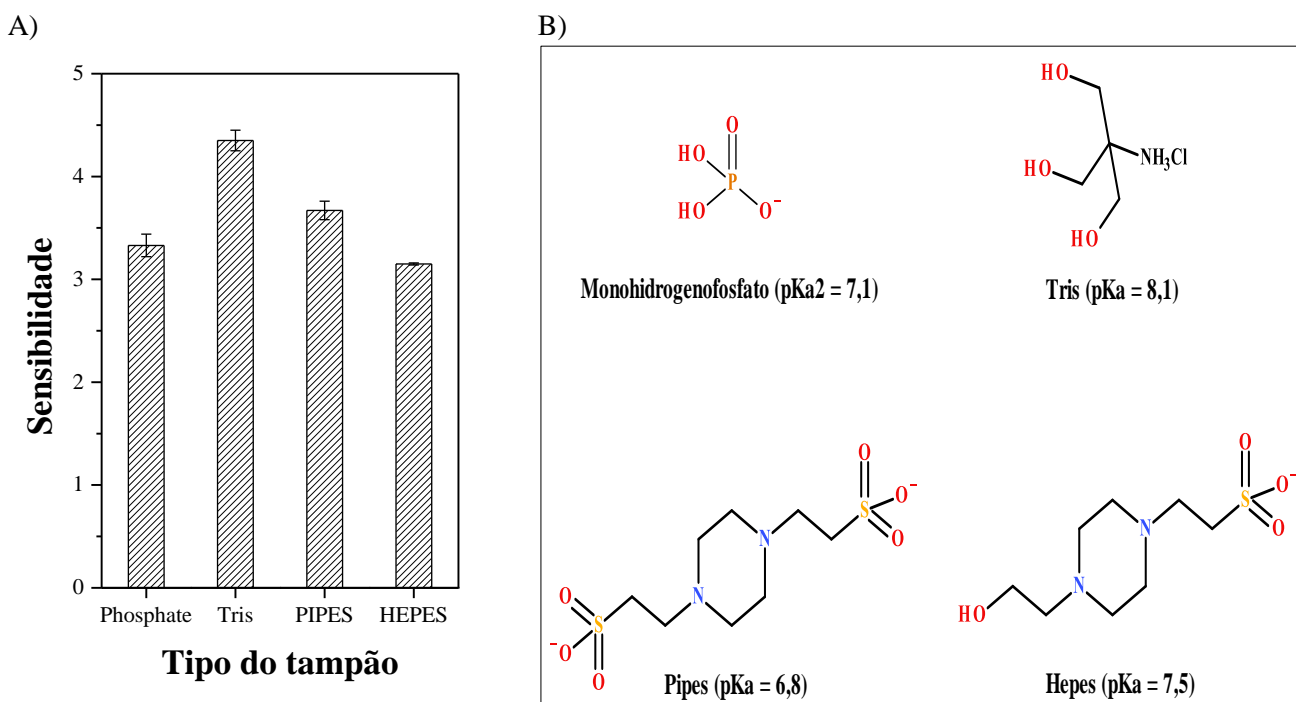
Em função do perfil obtido, a maior variação do sinal utilizando diferentes concentrações de Cr(VI) foi observada em pH 7,0 em relação à solução de referência. O efeito do pH no processo de *quenching* pode estar relacionada com as formas existentes dos grupos na superfície do sensor e da distribuição de espécies de Cr(VI) em solução. Como descrito por Chen et al. (2015), o Cr(VI) em meio aquoso apresenta equilíbrio pH dependente:  $2\text{CrO}_4^{2-} + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Cr}_2\text{O}_7^{2-} + 2\text{H}_2\text{O}$ . Em meio ácido, o Cr(VI) existe predominantemente como dicromato, que pode ter uma menor eficiência de *quenching* em relação ao cromato ao interagir com o sensor. Desta maneira, o Cr(VI) na forma de  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  não poderia diminuir a intensidade de fluorescência eficientemente do sensor em meio mais ácido. Considerando que ambos ânions ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  e  $\text{CrO}_4^{2-}$ ) possuem a mesma carga, o

dicromato por ser mais volumoso, apresenta uma densidade eletrônica menor que o cromato, tornando sua interação menos efetiva. Adicionalmente, em soluções alcalinas, os grupos funcionais contendo oxigênio do sensor estão desprotonados, levando ao aumento da carga negativa da superfície dos CDots. Esse efeito desfavorece a interação entre o sensor e o cromato negativamente carregado. Como resultado, a eficiência de *quenching* diminui com o aumento do valor de pH da solução.

#### 4.2.2 Avaliação do sistema tampão

Uma vez definido pH 7 como condição ótima se avaliou o efeito do tipo de tampão no sistema, sendo selecionados tampão fosfato, Tris, PIPES e HEPES (Figura 7A). O tampão Tris apresentou maior sensibilidade do que os outros sistemas (aumento de 16%) avaliados. Este perfil decorre do fato de que em pH 7 o Tris pode auxiliar de forma mais efetiva na interação do Cr(VI) com os CDots em comparação aos outros sistemas, visto que estaria com uma carga positiva, diferentemente dos outros tampões (Figura 7B)

**Figura 7.** (A) Efeito do pH na fluorescência do CDots por diferentes concentrações de Cr(VI). (B) Estruturas moleculares dos sistemas tampão avaliados e seus respectivos valores de pKa ( $n = 3$ ).

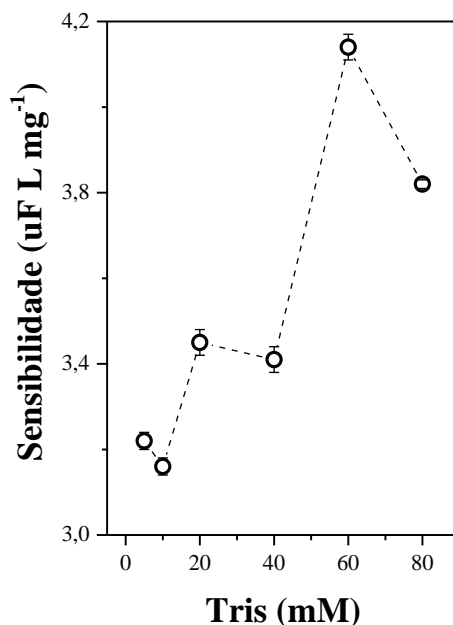


Fonte: Autor, 2017.

### 4.2.3 Avaliação da concentração do tampão.

A concentração de Tris no sistema foi avaliada de 5 a 80 mM (Figura 8), em que se observou que a 60 mM (6 mM após diluição) a sensibilidade foi máxima. Valores superiores levaram a redução da sensibilidade possivelmente devido ao bloqueio da superfície do CDots impossibilitando uma interação mais efetiva com o Cr(VI).

**Figura 8.** Influência da concentração de tampão Tris na sensibilidade do método a pH 7 ( $n = 3$ ).

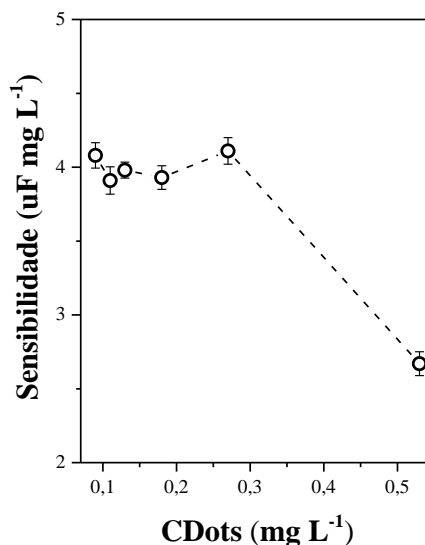


Fonte: Autor, 2017.

### 4.2.4 Avaliação da concentração do CDots

A concentração da solução de CDots foi avaliada na faixa de 0,09 a 0,53 mg L<sup>-1</sup> (Figura 9), sendo observado sensibilidade analítica praticamente constante na faixa de 0,09 a 0,27 mg L<sup>-1</sup> do CDots, para valores superiores houve decréscimo de 35% na sensibilidade, sendo necessário concentrações maiores de Cr(VI) para suprimir a perda de fluorescência do sistema. A concentração de 0,13 mg L<sup>-1</sup> foi selecionada devido a boa linearidade, reprodutibilidade e economia do material sintetizado.

**Figura 9.** Avaliação da concentração de CDots a pH 7 ( $n = 3$ ).



Fonte: Autor, 2017.

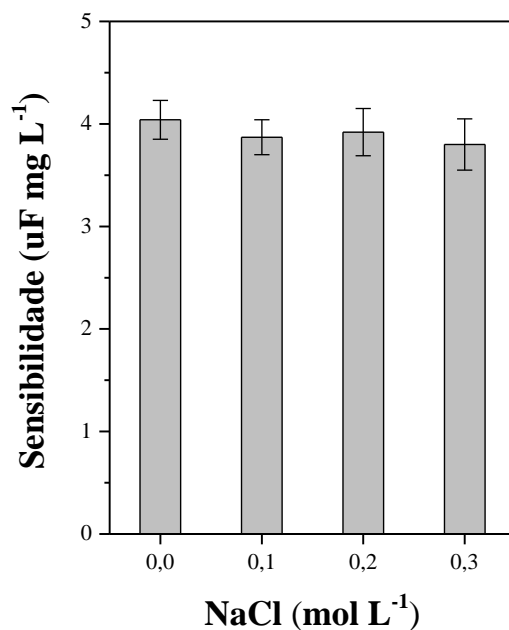
#### 4.2.5 Avaliação da força iônica

A variação da força iônica no meio foi avaliada mediante a variação da sensibilidade em função da concentração de NaCl no meio reacional. De acordo com os resultados apresentados na Figura 10, a força iônica não tem influência de forma efetiva, visto que a mesma apresentou redução máxima da sensibilidade de somente 6%. Os experimentos seguintes foram realizados na ausência de NaCl, visto a variação da força iônica não levar a incremento da sensibilidade analítica do método.

Adicionalmente, este resultado é um indicativo que o processo de interação eletrostático entre o os CDots e o Cr(VI) tem pouca influência, levando a uma maior participação de ligações de hidrogênio ou forças de Van der Waals como interações preferenciais.



**Figura 10.** Avaliação da força iônica no sistema CDots e Cr(VI) a pH 7 ( $n = 3$ ).

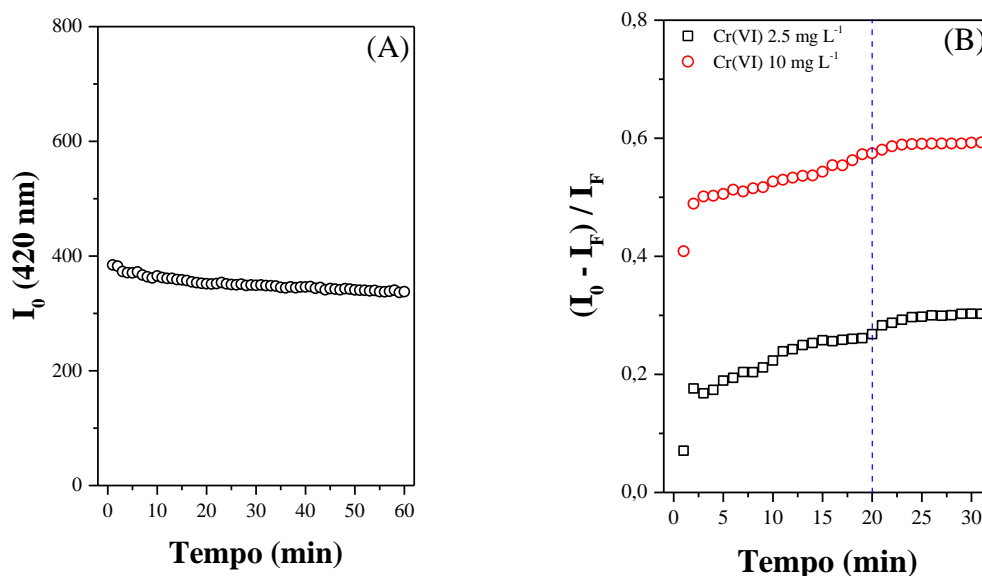


Fonte: Autor, 2017.

#### 4.2.6 Avaliação da cinética reacional

Após as condições otimizadas, a estabilidade dos CDots e a cinética do processo de *quenching* foi avaliada. A solução de CDots apresentou sinal praticamente constante, com variação máxima de fluorescência de 7% em relação aos 60 min de avaliação sob irradiação constante (Figura 11A), mostrando boa estabilidade fotoluminescente. Para cinética de interação entre os CDots e o Cr(VI) observou-se que após 20 min ocorreu estabilização do sinal em relação a solução de referência (Figura 11B) para diferentes concentrações de Cr(VI) avaliadas.

**Figura 11.** Avaliação da cinética reacional para A) solução de referência do CDots; B) soluções de CDots contendo 2,5 e 10 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI).



Fonte: Autor, 2017.

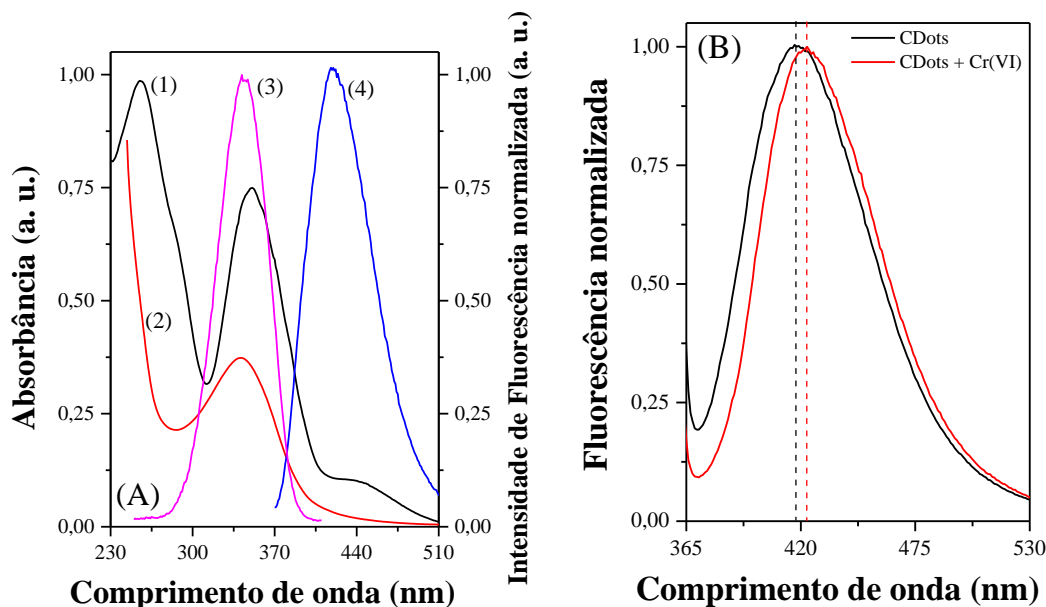
### 4.3 Avaliação do mecanismo de *quenching* e parâmetros termodinâmicos.

#### 4.3.1 Mecanismo de interação entre os CDots e Cr(VI)

Como mostrado na Figura 12A, o espectro de UV-vis do Cr(VI) a pH 7 apresenta bandas em 255, 351 e 436 nm. Os CDots exibem uma banda de absorção em 341 nm e emissão em 418 nm, quando excitados a 350 nm. Assim, ocorre sobreposição espectral entre o espectro de absorção do Cr(VI) e ambos os espectros, de absorção e emissão dos CDots. Portanto, o Cr(VI) blinda parte da radiação para excitação dos CDots, como também, absorve parcialmente a luz emitida pelos CDots, conduzido a um efeito de filtro (*inner filter effect*) entre o Cr(VI) e o CDots, e conseqüentemente causando a mudança na intensidade de fluorescência (ZENG et al, 2013; HUANG et al, 2015).

Com base na Figura 12B percebeu-se que houve um deslocamento do máximo de emissão de 418 para 423 nm (*red-shift*) quando os CDots estão na presença dos íons Cr(VI), sugerindo que o mecanismo de *quenching* não está relacionado somente ao processo do efeito de filtro, mas também ao estado fundamental das espécies envolvidas (HUANG et al, 2015). Desta forma, o processo de *quenching* foi avaliado, visando se obter maiores informações.

**Figura 12.** A) Espectros de absorção UV-vis (1) Cr(VI) e (2) CDots, (3) o espectro de excitação de CDots a  $\lambda_{em} = 418$  nm e o espectro de emissão (4) de CDots a  $\lambda_{ex} = 350$  nm. B) Fluorescência normalizada de CDots na ausência e presença de Cr(VI) a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente.



Fonte: Autor, 2017.

Para a elucidação do tipo de *quenching* preferencial (dinâmico ou estático), a magnitude do processo de interação entre os CDots e Cr(VI) e os respectivos parâmetros termodinâmicos foram avaliados através de experimentos em diferentes temperaturas. A constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) e de ligação ( $K_b$ ) foram calculadas de acordo com as seguintes equações:

$$\frac{I_0}{I_F} = 1 + K_{SV} [\text{Cr(VI)}] \quad \text{Equação (7)}$$

$$\log \left[ \frac{I_0 - I_F}{I_F} \right] = K_b + n \log [\text{Cr(VI)}] \quad \text{Equação (8)}$$

onde  $I_0$  e  $I_F$  são, respectivamente, as intensidade de fluorescência dos CDots na ausência e na presença do Cr(VI),  $K_{SV}$  é a constante de Stern-Volmer,  $K_b$  é a constante de ligação,  $n$  o número de sítios de ligação (GU et al, 2015) e  $[\text{Cr(VI)}]$  é a concentração molar de Cr(VI), variada de  $19,2 - 181 \mu\text{M}$  ( $1 - 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Com base na (Tabela 1) percebe-se que ocorreu diminuição dos valores de  $K_{SV}$  e  $K_b$  em função do aumento da temperatura. Este resultado é um indicativo que o processo de *quenching* entre o CDots e Cr(VI) foi estático, levando a formação de um complexo supramolecular no estado fundamental (ZHANG et al, 2012). Pois, com a elevação da

temperatura, ocorre desfavorecimento da formação do complexo e por consequência, redução dos valores das constantes. Caso o mecanismo de *quenching* fosse dinâmico, deveria se observar um aumento das constantes, devido a maior frequência de choques efetivos entre o CDots e Cr(VI) no estado excitado (LAKOWICZ et al, 2006). Os resultados obtidos corroboram com trabalhos que utilizaram Cr(VI) como *quencher*, formando um complexo no estado fundamental (GU et al, 2015; UPAMALI et al, 2011). Adicionalmente, o valor de  $K_b$  da ordem de  $10^3 \text{ L mol}^{-1}$  é característico de uma interação mediana, enquanto  $n \sim 1$ , se relaciona a um sítio de ligação preferencial entre os CDots e o Cr(VI).

Tabela 1. Parâmetros de ligação do processo de interação entre CDots e Cr(VI).

Temperatura (°C)	Constante Stern-Volmer		Parâmetros de ligação		
	$K_{sv}$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1}$ )	$r$	$K_b$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1}$ )	$n$	$r$
23 (296 K)	$1,92 \pm 0,08$	0,9943	$4,59 \pm 0,02$	$1,11 \pm 0,06$	0,9929
30 (303 K)	$1,84 \pm 0,07$	0,9959	$3,71 \pm 0,01$	$1,09 \pm 0,03$	0,9979
38 (311 K)	$1,69 \pm 0,06$	0,9967	$2,22 \pm 0,01$	$1,02 \pm 0,03$	0,9978

Fonte: Autor, 2017.

#### 4.3.2 Avaliação dos parâmetros termodinâmicos

Os parâmetros termodinâmicos  $\Delta H$  e  $\Delta S$  relativos ao processo de interação CDots e Cr(VI) foram obtidos a partir da equação de Van't Hoff (Figura 13), sendo então empregados para se calcular a energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) a partir das equações 6 e 7, respectivamente:

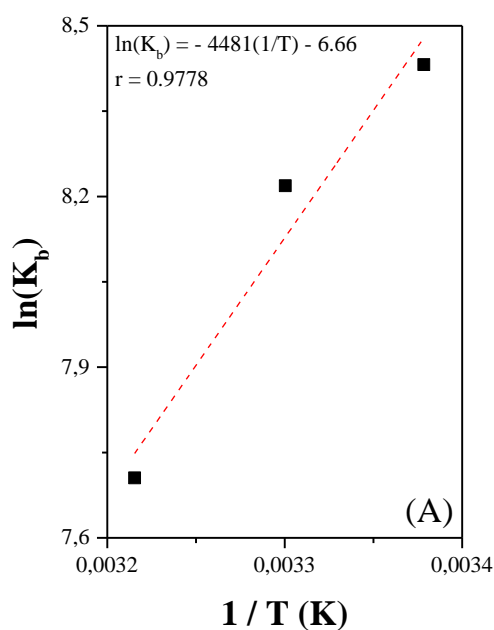
$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \left[ \frac{1}{T} \right] + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Equação (9)}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Equação (10)}$$

onde  $K_b$  é a constante de equilíbrio para uma determinada temperatura e  $R$  é a constante universal dos gases (AHMED et al, 2015). No processo,  $\Delta H = -37,26 \text{ kJ mol}^{-1}$  e  $\Delta S = -55,4 \text{ J mol}^{-1}$ , percebendo-se que o fator entálpico foi mais influente que o fator entrópico. Em função do  $\Delta H < 0$  e  $\Delta S < 0$  e empregando estudos baseados na interação entre macromoléculas (proteínas e DNA) e ligantes pequenos, este padrão termodinâmico é característico de interações de Van der Waals e ligações de hidrogênio no sistema (HUANG, 2015).

Esta interação pode ser confirmada avaliando o estudo da força iônica no meio a partir da variação da concentração de NaCl (Figura 10). Neste estudo a sensibilidade analítica na ausência de NaCl não apresentou diferença significativa na presença do sal (0,1 a 0,3 mol L<sup>-1</sup>), indicando que as forças eletrostáticas não são preferenciais, logo o processo de interação entre o CDots e Cr(VI) têm por interações preferenciais ligações de hidrogênio ou forças de Van der Waals.

**Figura 13.** Gráfico de Van't Hoff.

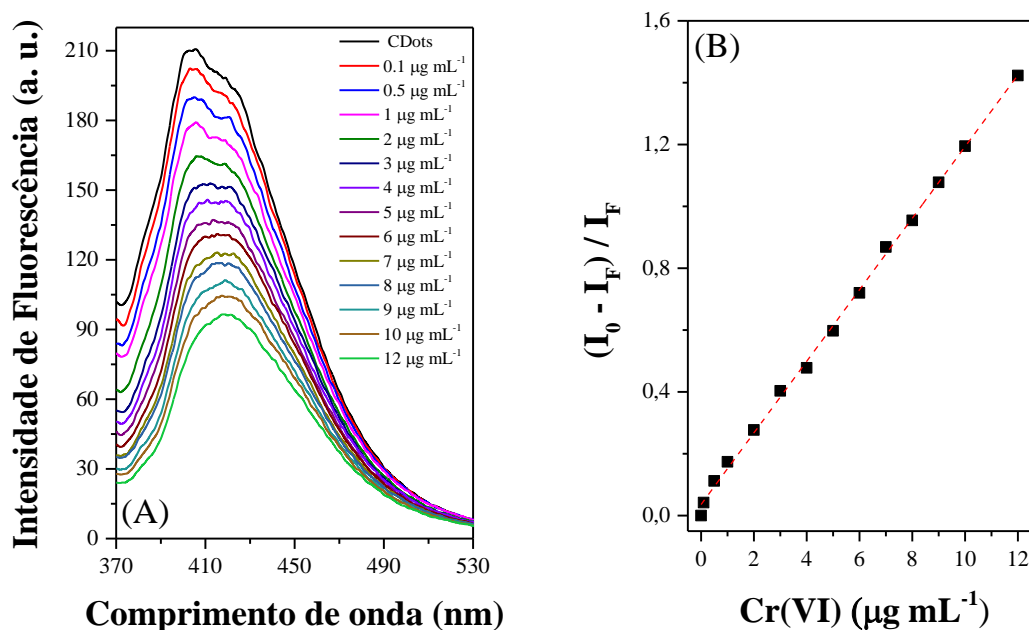


Fonte: Autor, 2017.

#### 4.4 Figuras de méritos

Adições crescente de Cr(VI) ao sistema contendo os CDots levaram a redução da intensidade de fluorescência devido a associação do efeito de filtro (*inner filter effect*) e *quenching* estático (Figura 14A), assim, as principais figuras de mérito do método proposto foram estabelecidas a partir da curva analítica (Figura 14B).

**Figura 14.** A) Espectros de fluorescência de CDots na ausência e presença de diferentes concentrações de Cr(VI). B) Faixa linear  $(I_0 - I_F) / I_F$  vs Cr(VI) para 0,1-12  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a pH 7.



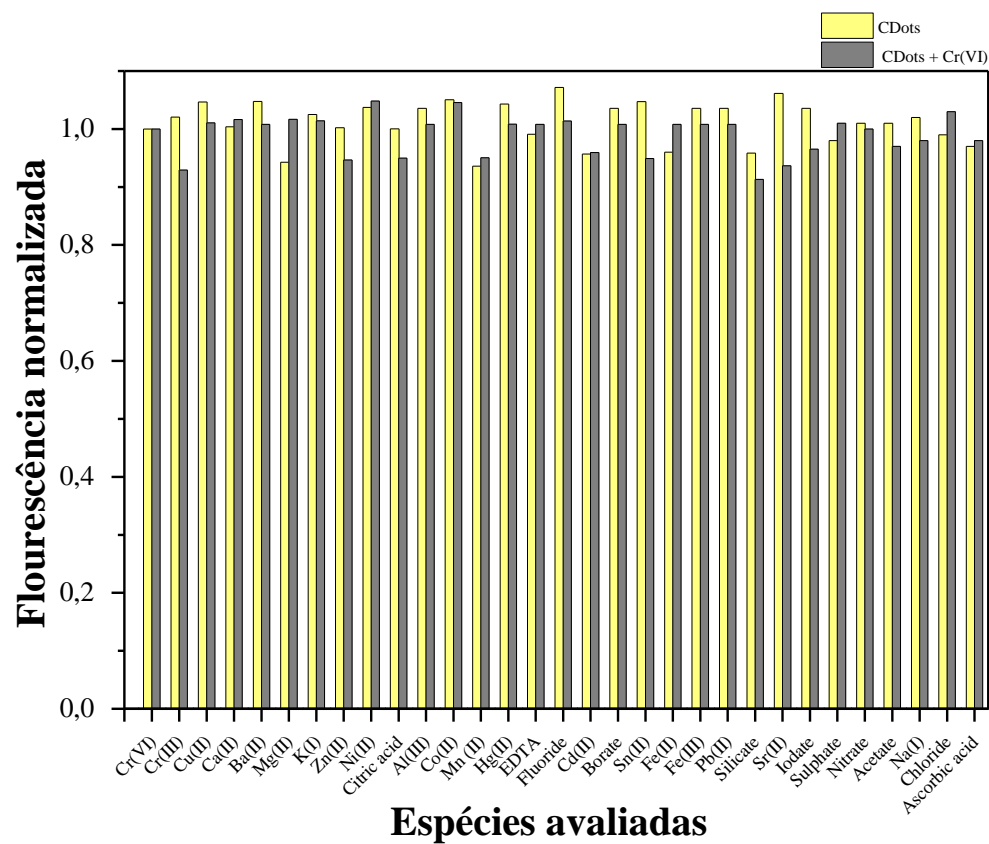
Fonte: Autor, 2017.

O método proposto apresentou faixa linear de 0,1 a 12  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , correspondente a equação  $[(I_0 - I_F) / I_F] = 0,116 \times (\pm 0,001) C_{\text{Cr(VI)}} + 0,036 \times (\pm 0,009)$  com coeficiente de correlação linear  $r = 0,9992$ . O método mostrou-se preciso com RSD = 2,15 e 4,65% para as concentrações de Cr(VI) de 1 e 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, e com limite de detecção (LOD) de 0,03  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 4.5 Ensaio de interferentes

A seletividade do método foi avaliada frente a 30 possíveis interferentes na ausência e presença de Cr(VI) conforme (Figura 15), tendo como critério uma variação máxima de  $\pm 10\%$  do sinal de fluorescência. Os interferentes foram selecionados em virtude da presença nas amostras de água e solo.

**Figura 15.** Avaliação da seletividade do método contra possíveis interferentes. A concentração de Cr(VI) foi de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $90,5 \mu\text{M}$ ) no ensaio. Valores de concentração limite de Cr(III), Cu(II), Ca(II), Mg(II), K(I), Zn(II), Ni(II), Cd(II), Sn(II), Sr(II), ácido cítrico, fluoreto, EDTA, borato, silicato e iodato foram  $1000 \mu\text{M}$ . Para Ba(II) e Al(III) foram  $500 \mu\text{M}$ , enquanto Fe(II) e Pb(II) foram  $100 \mu\text{M}$  e, finalmente, Fe(III) foi  $50 \mu\text{M}$ .



Fonte: Autor, 2017.

As espécies que se mostram potenciais interferentes foram Pb(II) e Ba(II), possivelmente devido a formação de sais de baixa solubilidade com os íons cromato, além de Al(III), Fe(II) e Fe(III), sendo o último o principal interferente do método devido a suas propriedades paramagnéticas. Para eliminar ou minimizar a interferência destas espécies as amostras antes da análise eram percoladas por uma coluna catiônica, retendo os cátions, e não interferindo na resposta do Cr(VI), o qual em pH 7 é preferencialmente  $\text{CrO}_4^{2-}$  e não ficava retido na coluna. Por fim, o método proposto foi comparado a outros trabalhos da literatura, e mostrou-se equivalente quanto a faixa linear de trabalho e seletividade (Tabela 2). Além disto, o método baseado nos CDots apresenta LOD adequado para detecção de Cr(VI) total, segundo a WHO, de  $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Agência de Proteção Ambiental (EPA, USA), de  $0,10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , água potável e Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, Brazil), de  $0,05$  e  $1,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  para água potável e água salobra, respectivamente (WHO, 2011) (EPA, 2009) (CONAMA, 2005).



**Tabela 2.** Comparação de métodos para a determinação de Cr(VI) com pontos quânticos de carbono e detecção por fluorescência.

Sensor	Precursor	Amostras	pH	Faixa linear ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Principais interferentes	Referência
Pontos quânticos de grafeno	Formulário comercial	Água	4,5	0,003 - 26	0,0002	Fe(II)	Huang, 2015
Pontos quânticos de grafeno	CX-72 carbon black	Água	7,0	0,0003 – 3,12	$1,04 \times 10^{-9}$	Cr(III), Cd(II), Cu(II), Co(II)	Chen, 2015
Pontos de carbono dopados	PAN <sup>a</sup> and CoCl <sub>2</sub>	Água e peixe	- <sup>e</sup>	0,26 – 6,51	0,06	Fe(III)	Zhang, 2017
Pontos à base de carbono	CA <sup>b</sup> and NAC <sup>c</sup>	Células	7,4	0,03 – 6,51	$1,04 \times 10^{-9}$	-	Liu, 2016
Pontos quânticos de grafeno	CA and NH <sub>3</sub>	Água	7,4	0,05 - 73	$2,08 \times 10^{-9}$	Hg(II)	Cai, 2014
Ponto de carbono	CA and DETA <sup>d</sup>	Água	6,0	0,005 – 2,60	-	Fe(III), MnO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Zeng, 2013
CDots	CA and glutathione	Água e solo	7,0	0,1 - 12	0,03	Fe(III)	Este trabalho

<sup>a</sup>1- (2-Piridilazo) -2-naftol / <sup>b</sup>CA = ácido cítrico / <sup>c</sup>NAC = *N*-acetil-*L*-cisteína / <sup>d</sup>DETA = meio de dietilenotriamina / etanol

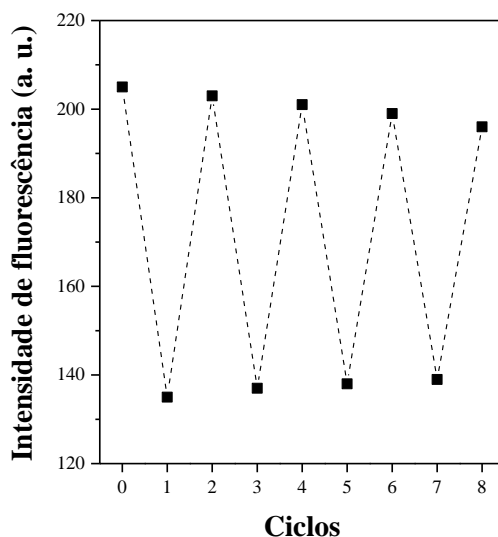
Fonte: Autor, 2017.

#### 4.6 Estudo da reversibilidade do CDots

Como o Cr(VI) extingue a fluorescência do CDots, foi utilizado ácido ascórbico, o qual não foi interferente no método (Figura 15) para reduzir o Cr(VI) ao Cr(III), e pela seletividade do CDots ao Cr(VI), esperava-se que a intensidade de fluorescência do CDots retornaria em diferentes ciclos de exposição, indicando assim, a reversibilidade e aplicação do CDots como sonda fluorescente para determinação de Cr(VI). Desta forma, a Figura 16 mostra o resultado da resposta analítica de CDots na presença de Cr (VI) e ácido ascórbico.

No ciclo 0 tinha-se apenas o CDots ( $0,13 \text{ mg L}^{-1}$ ), enquanto que, nos ciclos 1, 3, 5 e 7 se adicionou ao sistema Cr(VI) na concentração de  $96 \text{ }\mu\text{M}$  ( $5 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e, nos ciclos 2, 4, 6 e 8 foram adicionadas concentrações de ácido ascórbico a  $144 \text{ }\mu\text{M}$ . A diferença nos valores de Cr(VI) e concentração de ácido ascórbico deveu-se ao número de elétrons necessários para reduzir o Cr(VI) ao Cr(III) e a oxidação do ácido ascórbico reduzido ( $\text{C}_6\text{O}_6\text{H}_8$ ) ao ácido ascórbico oxidado ( $\text{C}_6\text{O}_6\text{H}_6$ ). O processo de diluição das soluções foi inferior a 5% em relação ao volume total. Assim, devido ao perfil obtido neste estudo, pode-se inferir que o CDots é classificado como um nanosensor para Cr(VI).

**Figura 16.** Reversibilidade da resposta analítica de CDots na presença de Cr(VI) e ácido ascórbico.



Fonte: Autor, 2017.

#### 4.7 Análise das amostras reais

Para aplicar o método proposto, se determinou a concentração de Cr(VI) em diferentes amostras de água e solo (Tabela 4). De acordo com os resultados pôde-se quantificar Cr(VI) na amostra de água salobra ( $0,28 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), sendo o valor encontrado abaixo do limite preconizado pelo CONAMA para amostras desta natureza no Brasil (CONAMA, 2015), as demais amostras de água e solo apresentaram concentração de Cr(VI) abaixo do limite de detecção.

O método proposto foi validado utilizando ensaio de recuperação nas diferentes amostras de água e solo com três níveis diferentes (2, 4 e  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) de concentração de Cr(VI). Assim, foram avaliados quatro tipos diferentes de água (salobra, doce, potável e água da torneira) com valores de recuperação de 90 a 105% para Cr(VI). Em seguida, se avaliou três amostras de solo empregando  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  como solução extratora seletiva ao Cr(VI) (PANICHEV et al., 2003). As amostras de solos foram caracterizadas conforme esta apresentada na (Tabela 3), cabe ressaltar que apresentaram teor de matéria orgânica variando de 8% (solo de cultura de alface) a 52% (turfa), contudo este fator não influenciou na resposta do método, que apresentou faixa de recuperação de 99,5 a 107%.

Por fim, o método mostrou-se exato em função de recuperações quantitativas em amostras de diferentes tipos, além de ser versátil, rápido e preciso, sendo viável sua aplicação em amostras ambientais. O resultado do ensaio de recuperação para amostras de água e solo estão apresentados na (Tabela 4).

**Tabela 3.** Caracterização das amostras de solos.

Parâmetros <sup>1</sup>	Solo		
	Argiloso	Cultura de alface	Turfa
Conteúdo de matéria orgânica, (%)	12	8,0	52
K, $\text{mmol L}^{-1}$	1,6	1,3	3,9
Ca, $\text{mmol L}^{-1}$	5,4	4,6	0,1
Mg, $\text{mmol L}^{-1}$	2,0	3,2	4,0
P, $\text{mmol L}^{-1}$	6,0	7,0	2,0
Saturação básica, %	24	22	3,0
Acidez potencial (H + Al), $\text{mmol L}^{-1}$	24	28	216
Base total, $\text{mmol L}^{-1}$	8,6	9,0	6,0
Capacidade de troca de cátions, $\text{mmol L}^{-1}$	129	118	222

<sup>1</sup> Procedimento experimental baseado em Raij, B., Andrade, J.C., Cantarella, H., Quaggio, J.A.; *Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais*, IAC: Campinas, SP, 2001.

**Tabela 4.** Concentração de Cr(VI) adicionadas e quantificadas em amostras de água e solo pelo método proposto para CDots ( $n = 3$ ).

Amostra de água	Tipo	Cr(VI) ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		Recuperação (%)
		Adicionado	Recuperado	
1	água salobra	0,0	0,28 $\pm$ 0,02	-
		2,0	2,37 $\pm$ 0,12	104
		4,0	4,21 $\pm$ 0,16	98
		8,0	8,45 $\pm$ 0,23	102
2	Água doce	0,0	< LOD	-
		2,0	2,09 $\pm$ 0,08	105
		4,0	3,80 $\pm$ 0,10	95
		8,0	8,16 $\pm$ 0,19	102
3	Água potável	0,0	< LOD	-
		2,0	2,01 $\pm$ 0,02	101
		4,0	3,75 $\pm$ 0,09	94
		8,0	7,78 $\pm$ 0,21	97
4	Água da torneira	0,0	< LOD	-
		2,0	2,01 $\pm$ 0,07	101
		4,0	3,60 $\pm$ 0,11	90
		8,0	8,01 $\pm$ 0,23	101
Amostra de solo	Tipo	Cr(VI) ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		Recuperação (%)
		Adicionado	Recuperado	
1	Solo argiloso	0,0	< LOD	-
		2,0	1,99 $\pm$ 0,05	99,5
		4,0	4,08 $\pm$ 0,09	102
		8,0	7,95 $\pm$ 0,15	99,5
2	Cultivo de alface	0,0	< LOD	-
		2,0	2,12 $\pm$ 0,03	106
		4,0	4,17 $\pm$ 0,12	104
		8,0	8,61 $\pm$ 0,27	107
3	turfa	0,0	< LOD	-
		2,0	2,05 $\pm$ 0,06	102
		4,0	4,29 $\pm$ 0,18	107
		8,0	8,49 $\pm$ 0,22	106

Fonte: Autor, 2017.

## 5. Conclusão

O método de pirólise se mostrou adequado para produzir CDots com intensa luminescência, conforme mostra o elevado rendimento quântico de fotoluminescência 69%. Além disso, a emissão dos CDots se mostrou dependente do comprimento de onda de excitação, observando um deslocamento para o vermelho conforme se aumentou o comprimento de onda de excitação, a qual é explicada pela heterogeneidade dos grupos superficiais presentes nos CDots.

O tempo de vida na ordem de 10 ns tornam estes materiais com potenciais aplicações tal como dispositivos eletrônicos e ópticos, além de sensores eco-amigáveis para a detecção de íons Cr(VI). Neste caso, foi verificado que o mecanismo de interação entre os CDots e o Cr(VI) está associado ao inner filter effect e quenching estático conjuntamente.

O método empregando os CDots como sensores fluorescentes foi otimização quanto aos principais parâmetros analíticos, apresentando faixa linear de 0,10 a 12  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , limite de detecção de 0,03  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (pH 7), com recuperações de 90-105 e 99,5-107% para amostras de águas e solos, respetivamente.

Portanto, o método mostrou-se seletivo, sensível, rápido e versátil para aplicações em diferentes amostras ambientais de água e solo.

## 6. Referências

- CHANDRA, S. et al. *Luminescent S-doped carbon dots: an emergent architecture for multimodal applications*. **J Mater Chem B**, 2375–2382, 2013.
- CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente (National Environment Council). Resolution N°. 357/05. Determining the classification of fresh water, brackish and saline water of the National Territory, Brazil, 2005.
- DIMA, J.L et al., *Hexavalent chromium removal in contaminated water using reticulated chitosan micro/nanoparticles from seafood processing wastes*. **Chemosphere**, 100–111, 2015.
- DONG, Y. et al. *Carbon based dots co-doped with nitrogen and sulfur for high quantum yield and excitation-independent emission*. **Angew Chem**, 52, 7800–7804, 2013.
- DONG, Y. et al., *Blue luminescent graphene quantum dots and graphene oxide prepared by tuning the carbonization degree of citric acid*. **Carbon**, 50, 4738-4743, 2012.
- DONG, Y.Q. et al., *Polyamine-functionalized carbon quantum dots for chemical sensing*. **Carbon**, 50, 2810–2815, 2012.
- Ellison SRL, Barwick VB, Farrant TJD, *Practical Statistics for the Analytical Scientist: a bench guide*. RSC Publishing, Cambridge, 2009.
- Environmental Protection Agency (EPA), *National primary drinking water regulations*, EPA 816-F-09-004, USA, 2009.
- HSU, P.C. et al. *Synthesis and analytical applications of photoluminescent carbon nanodots*. **Green Chemistry**, 14, 917-920, 2012.
- JIANG J. et al., *Amino acids as the source for producing carbon nanodots: microwave assisted one-step synthesis, intrinsic photoluminescence property and intense chemiluminescence enhancement*. **Chem Commun**, 48, 9634–9636, 2012.
- K. A. N. Upamali, L. A. Estrada, D. C. Neckers, *Selective detection of Cr(VI) in aqueous media by carbazole-based fluorescent organic microcrystals*, **Anal. Methods**, 3, 2469-2471, 2011.
- K.B.A. Ahmed, P. Ahalya, M. Sengan, R. Kamlekar, V. Anbazhagan, *Synthesis and characterization of zinc sulfide quantum dots and their interaction with snake gourd (*Trichosanthes anguina*) seed lectin*, **Spectrochim Acta Mol. Biomo. Spectrosc.**, 151, 739-745, 2015.
- Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. (3<sup>rd</sup> ed). Baltimore: Springer, 2006.
- LI, H. et al. *Water-soluble fluorescent carbon quantum dots and photocatalyst design*. **Angew Chem Int Ed Engl**, 49, 4430-4, 2010.

- LI, X. et al., *Engineering surface states of carbon dots to achieve controllable luminescence for solid-luminescent composites and sensitive  $Be^{2+}$  detection*. **Nature**, 4, 05, 2014.
- LIM, S. Y. al., *Carbon quantum dots and their applications*. **Chemical Society Reviews**, 44, 362-381, 2015.
- LIU, Y. et al., *Synthesis of polyethyleneimine capped carbon dots for preconcentration and slurry sampling analysis of trace chromium in environmental water samples*. **Talanta** 134, 16–23, 2015.
- MACHADO, C.E. et al., *Influence of inert and oxidizing atmospheres on the physical and optical properties of luminescent carbon dots prepared through pyrolysis of a model molecule*. **Chemistry - A European Journal**, 22, 4556–4563, 2016.
- MACHADO, C.E. et al., *Pontos quânticos de carbono: síntese química, propriedades e aplicações*. **Revista Virtual de Química**, 7, 1306-1346, 2015.
- MIRCHEV, P. et al. *Solution phase synthesis of carbon quantum dots as sensitizers for nanocrystalline  $TiO_2$  solar cells*. **Journal of Materials Chemistry**, 22, 1265, 2012.
- N. Panichev, K. Mandiwana, G. Foukaridis, *Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of Cr(VI) in soil after leaching of Cr(VI) species with carbon dioxide*, **Anal. Chim. Acta**, 2003, 491, 81-89.
- PAVIA, LAPMAN, KRIZ, *Introduction to Spectroscopy*, 3<sup>a</sup> ed., **Brooks/Cole, Thomson Learning**, Canada, 61 - 79, 2010.
- QIAN, Z. et al., *Highly luminescent N-doped carbon quantum dots as an effective multifunctional fluorescence sensing platform*. **Chemistry**, 20, 2254–2263, 2014.
- RAY, S. C. et al. *Fluorescent Carbon Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Bioimaging Application*. **The Journal of Physical Chemistry C**, 113, 18546-18551, 2009.
- S. Huang, H. Qiu, F. Zhu, S. Lu, Q. Xiao, *Graphene quantum dots as on-off-on fluorescent probes for chromium(VI) and ascorbic acid*. **Microchim Acta**, 182, 1723–1731, 2015.
- S. Huang, H. Qiu, S. Lu, F. Zhu and Q. Xiao, *Study on the molecular interaction of graphene quantum dots with human serum albumin: Combined spectroscopic and electrochemical approaches*, **J. Hazard. Mater.**, 285, 18-26, 2015.
- SAHU, S. et al., *Simple one-step synthesis of highly luminescent carbon dots from orange juice: application as excellent bio-imaging agents*. **Chemical Communications**, 48, 8835-8837, 2012.
- SALAM, Z. et al., *Graphene quantum dots decorated electrospun  $TiO_2$  nanofibers as an effective photoanode for dye sensitized solar cells*. **Solar Energy Materials and Solar Cells**. 143, 250-259, 2015.

SHEN, J. et al. *Graphene quantum dots: emergent nanolights for bioimaging, sensors, catalysis and photovoltaic devices*. **Chemical Communications**, 48, 3686-3699, 2012.

SUN, C. et al., *High color rendering index white light emitting diodes fabricated from a combination of carbon dots and zinc copper indium sulfide quantum dots*. **Applied Physics Letters**, v.104, 261106, 2014.

VAZ, R. et al., *Preparação de pontos de carbono e sua caracterização óptica: um experimento para introduzir nanociência na graduação*. *Quim. Nova*, 38, 1366-1373, 2015.

**World Health Organization (WHO)** Guidelines for Drinking-water Quality, Recommendations 4rd ed., Geneva, Switzerland, 1, 340, 2011.

XU, Y. et al. *Nitrogen doped carbon dots: a facile and general preparation method, photoluminescence investigation, and imaging applications*. **Chemistry**, 19, 2276–2283, 2013.

Y. Chen, Y. Dong, H. Wu, C. Chen, Y. Chi, G. Chen, *Electrochemiluminescence sensor for hexavalent chromium based on the graphene quantum dots/peroxodisulfate system*, **Electrochimica Acta**, 151, 552-557, 2015.

Y. L. Gu, M. X. Yin, H. M. Zhang, J. Shi, *Study on the binding interaction of chromium(VI) with humic acid using UV-vis, fluorescence spectroscopy and molecular modeling*, **Spectrochim. Acta Mol. Biomo. Spectrosc.**, 136, 1702-1709, 2015.

YANG, H. B. et al. *Graphene quantum dots-incorporated cathode buffer for improvement of inverted polymer solar cells*. **Solar Energy Materials and Solar Cells**, 117, 214-218, 2013.

ZENG, M. et al., *On-off-on fluorescent carbon dot nanosensor for recognition of chromium(VI) and ascorbic acid based on the inner filter effect*, **ACS Appl. Mater. Interfaces**, 24, 13242-13247, 2013.

ZENG, Y. W. et al., *N, S co-doped carbon dots with orange luminescence synthesized through polymerization and carbonization reaction of amino acids*. **Applied Surface Science**. 342. 136-143, 2015.

ZHAI, X. et al., *Highly luminescent carbon nanodots by microwave-assisted pyrolysis*. **Chem Commun**, 48, 7955–7957, 2012.

Zhang, G., Ma, Y., Wang, L., Zhang, Y., Zhou, J. *Multispectroscopic studies on the interaction of maltol, a food additive, with bovine serum albumin*. **Food Chemistry**, 133, 264-270, 2012.

ZHAO, A. et al., *Recent advances in bioapplications of C-dots*. **Carbon**, 85 309–327, 2015.

ZHUO, Y. et al. *One-step synthesis of high quantum-yield and excitation-independent emission carbon dots for cell imaging*. **Materials Letters**, 139, 197-200, 2015.



## 7. Anexos

**Tabela S1.** Principais características das vibrações de grupos funcionais em superfície de CDots no espectro infravermelho.

Posição das bandas (cm <sup>-1</sup> )	Vibração características <sup>1</sup>
~3500-3200	$\nu$ O-H
3400-3000	$\nu$ as N-H
2921	$\nu$ C-H of CH <sub>3</sub>
1711	$\nu$ C=O
1630	$\delta$ N-H
1400	$\nu$ C-C
1138	$\nu$ C-OH

<sup>1</sup> $\nu$  = estiramento; s = simétrico; as = assimétrico;  $\delta$  = dobra

**Tabela S2.** Efeito do pH na fluorescência do CDots por diferentes concentrações de Cr (VI).

Tipo do tampão	Sinal do branco	Faixa linear, mg L <sup>-1</sup>	(F <sub>0</sub> -F)/F <sub>0</sub> = aC + b		
			a(x100)	b(x100)	r
Fosfato	323	1 – 15	33,3 ± 0,3	5,33 ± 2,51	0,9815
Tris	336	1 – 10	43,5 ± 0,1	-0,80 ± 1,29	0,9945
Pipes	344	1 – 15	36,7 ± 0,1	0,20 ± 0,10	0,9993
Hepes	332	1 – 20	31,5 ± 0,2	0,60 ± 2,00	0,9934

Fonte: Autor, 2017.

**Tabela S3.** Influência da concentração do tampão Tris na sensibilidade do método a pH 7 ( $n = 3$ ).

Concentração (mM)	Sinal do branco	Faixa linear, mg L <sup>-1</sup>	(F <sub>0</sub> -F)/F <sub>0</sub> = aC + b		
			a(x100)	b(x100)	r
5	316	1 – 15	3,22 ± 0,02	3,44 ± 0,01	0,9939
10	301	1 – 12,5	3,16 ± 0,02	2,10 ± 1,34	0,9976
20	374	1 – 15	3,45 ± 0,03	5,00 ± 2,01	0,9926
40	364	1 – 15	3,41 ± 0,03	5,42 ± 3,03	0,9818
60	378	1 – 12,5	4,14 ± 0,03	2,69 ± 2,02	0,9938
80	345	1 – 15	3,82 ± 0,01	0,85 ± 0,10	0,9978

Fonte: Autor, 2017.

**Tabela S4.** Avaliação da concentração de CDots a pH 7 ( $n = 3$ ).

CDots (mg L <sup>-1</sup> )	Sinal do branco	Faixa linear, mg L <sup>-1</sup>	(F <sub>0</sub> -F)/F <sub>0</sub> = aC + b		
			a(x100)	b(x100)	r
0,53	506	1 – 15	2,67 ± 0,03	3,22 ± 3,13	0,9802
0,27	307	1 – 15	4,11 ± 0,05	0,20 ± 4,78	0,9915
0,18	222	1 – 15	3,93 ± 0,02	1,14 ± 1,92	0,9937
0,13	218	1 – 15	3,98 ± 0,02	2,67 ± 2,05	0,9905
0,11	206	1 – 15	3,91 ± 0,03	4,88 ± 2,56	0,9889
0,09	202	1 – 15	4,08 ± 0,04	4,85 ± 3,14	0,9923

Fonte: Autor, 2017.

**Tabela S5.** Avaliação da força iônica no sistema CDots e Cr(VI) a pH 7 ( $n = 3$ ).

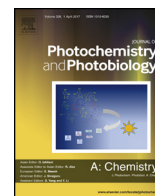
NaCl (mol L <sup>-1</sup> )	Sinal do branco	Faixa linear, mg L <sup>-1</sup>	(F <sub>0</sub> -F)/F <sub>0</sub> = aC + b		
			a(x100)	b(x100)	r
0	351	1 – 15	4,04 ± 0,05	4,70 ± 3,28	0,9917
0,1	339	1 – 15	3,87 ± 0,04	3,90 ± 4,35	0,9864
0,2	326	1 – 15	3,92 ± 0,03	3,25 ± 2,04	0,9930
0,3	328	1 – 15	3,80 ± 0,05	3,80 ± 3,91	0,9884

Fonte: Autor, 2017.



Contents lists available at ScienceDirect

# Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jphotochem](http://www.elsevier.com/locate/jphotochem)

## High luminescent carbon dots as an eco-friendly fluorescence sensor for Cr(VI) determination in water and soil samples



Roberto Vaz<sup>a</sup>, Jefferson Bettini<sup>b</sup>, José Guimarães F. Júnior<sup>c</sup>, Elysson David S. Lima<sup>c</sup>, Wander Gustavo Botero<sup>c</sup>, Josué Carinhanha C. Santos<sup>c,\*</sup>, Marco Antônio Schiavon<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ciências Naturais, Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Dom Bosco, Praça Dom Helvécio, 74, 36301-160, São João del-Rei, MG, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório Nacional de Nanotecnologia, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

<sup>c</sup> Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Campus A.C. Simões, Tabuleiro dos Martins, 57072-900, Maceió, AL, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 May 2017

Received in revised form 27 June 2017

Accepted 30 June 2017

Available online 30 June 2017

#### Keywords:

Carbon dots

Cr(VI)

Fluorescent sensor

Water and soil samples

### ABSTRACT

In this work were synthesized highly luminescent carbon dots for use as fluorescence sensor for Cr(VI). Carbon dots (CDots) were prepared by pyrolysis of the mixture of molecular precursors as citric acid and reduced glutathione. Pyrolysis revealed to be a simple procedure that afforded CDots with a photoluminescence quantum yield of 69.4%, and particle size of about 2.5 nm. To explore the analytical potentiality of the nanomaterial produced, the CDots were applied as fluorescent sensors to determine Cr(VI) in water and soil samples. The interaction mechanism between CDots and Cr(VI) is associated with both inner filter effect and static quenching. After optimization of the main analytical parameters, the method showed a linear range of 0.10–12  $\mu\text{g mL}^{-1}$  with limit of detection (LOD) of 0.03  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (pH 7), and recoveries of 90–105% and 99.5–107% for samples of water and soil, respectively. Thus, the method proved to be sensitive, fast and versatile for applications in different environmental samples.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Luminescent materials have been applied with great vigor in several fields of research [1–4]. Carbon Dots (CDots) have been considered a new star of luminescent materials, due to their properties as chemical stability, water and organic solvents solubility, resistance to photodegradation, biocompatibility and low toxicity. Potential applications of these materials cover areas such as bioimaging, photocatalysis, solar cells, LEDs and fluorescent sensors [1–7].

By definition, CDots are nanometer-sized particles composed of a hybridized  $\text{sp}^2$  carbon, functionalized with organic groups on their surface. The surface of the CDots is usually composed of organic functional groups containing carbon, oxygen, nitrogen and sulfur atoms, such as:  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$  and  $-\text{SO}_3\text{H}$ , which make them highly soluble and stable, from the point of view colloidal solution, in water and polar organic solvents [1,8,9].

However, the fundamental components in the constitution of CDots are: carbon, hydrogen and oxygen. The amount of these elements is distinct in the different CDots reported in the literature, once the amount of each of these elements is dependent on the starting material used in the synthesis, as well as the synthetic route used [10–13].

The introduction of heteroatoms has been reported to adjust the position of the bands of energy of the CDots, which affect the quantum yield of photoluminescence ( $\Phi_f$ ), generally increasing the  $\Phi_f$  for samples containing heteroatoms [7,14–16]. Therefore, the main reason that CDots have attracted great attention is due to their emission properties. In the literature, there are reports of  $\Phi_f$  that varies from 3.8 to 88%, depending on the preparation method and the precursor used [17–19].

The CDots can be used as fluorescent sensors due to the absence of potentially toxic metallic species in their structure, water solubility and photostability. The detection of metals with proven toxicity, such as chromium, mercury and lead, is extremely important due to the impacts they can cause to the environment and the possible harm to human health [9]. The application of CDots as fluorescent sensors includes the detection of Cu(II), Fe(II), Pb(II), Ag(I), Cr(VI) and Hg(II), for example, by suppressing intrinsic

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [josue@iqb.ufal.br](mailto:josue@iqb.ufal.br) (J.C.C. Santos), [schiavon@ufsj.edu.br](mailto:schiavon@ufsj.edu.br) (M.A. Schiavon).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

fluorescence of the CDots in the presence of metal ions under optimized conditions [20–25].

In particular, the chromium can be found with different valences in nature, the most common valences of chromium are Cr(II), Cr(III) and Cr(VI). The hexavalent chromium Cr(VI) has been used in several applications in the electronic industry, such as: cathode ray tubes, integrated circuit boards and shielding, as well as in the of fabrication of dyes and pigments [26]. Cr(VI) causes damage when ingested or inhaled by humans beings, and may even cause tumors. The World Health Organization (WHO) limits human intake of Cr(VI) to 0.05  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , however, no studies have been found to determine the minimum amount of Cr(VI) that can cause disease when ingested [27,28].

Some works report the detection of Cr(VI) using CDots of different manners. Yue Liu et al. [28] described the Cr(VI) quantification in water samples using CDots prepared from candle soot and polyethyleneimine as adsorbent material for Cr(VI). The CDots proved their efficacy in Cr(VI) adsorption with a 30-fold enrichment factor and a limit of detection (LOD) of 0.21  $\mu\text{g L}^{-1}$  using FAAS (Flame Atomic Absorption Spectrometry) as the detection system. Alternatively, Min Zheng et al. [19] described elegantly the determination of Cr(VI) using CDots as fluorescent sensors. The CDots were synthesized from the mixture of citric acid and diethylenetriamine and presented intense blue luminescence ( $\Phi_f = 88.6\%$ ). The CDots obtained presented to the linear range of 0.52–2600  $\text{ng L}^{-1}$ , which meets the limits delimited by the WHO. However, the source of nitrogen used (diethylenetriamine) to produce N-CDots present high toxicity. Although, CDots have been showed as versatile in different applications for Cr(VI) determination, the development of sensor systems with high recognition capacity from simple constituents is a current trend. Therefore, the use of glutathione, a non-toxic compound as source of N and S for the production of doped CDots is strategic because it can produce nanomaterials with high luminescent properties, water solubility and selectivity [13].

So far, a variety of procedures and precursors have been used in the preparation of CDots [7,17,29]. Such synthetic variations can generate different nanomaterials, but it is now known that the fluorescence properties of the CDots are directly bound to the starting material and the functional groups incorporated in its surface as well, which makes normalization and the creation of an effective mechanism in the development of analytical sensors based on CDots. Thus, the objective of this work is the preparation of CDots doped with N and S by pyrolysis in an inert atmosphere using citric acid and reduced glutathione, its characterization and analytical application as selective fluorescent sensor in the determination of Cr(VI), a toxic chromium specie, in environmental water and soil samples is reported.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and solutions

For all the experiments it were used analytical grade reagents with analytical purity and type II water (electrical conductivity lower than 1  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) was used during the process of synthesis and quantification of Cr(VI). The reagents used in the synthesis of CDots were reduced L-glutathione (Sigma Aldrich,  $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ , 98%), anhydrous citric acid (Vetec,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ , 99.5%). The reagents used were not subjected to any purification procedure. Stock solution of Cr(VI) 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  was prepared by dissolving 2.81 mg of  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (Merck), pre-dried at 120 °C, in 10 mL of water. The working solutions were prepared from dilutions of the stock solution. The Britton-Robinson buffer for pH range 2 to 10 consisted in the mixture of  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Merck),  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Sigma Aldrich) and acetic acid (Sigma Aldrich), all of them at 0.04  $\text{mol L}^{-1}$ . The

final pH was adjusted with NaOH or HCl 1  $\text{mol L}^{-1}$ . Tris-HCl (Vetec), HEPES (Sigma Aldrich) and PIPES (Sigma Aldrich) buffers were used in the evaluation of different buffer systems. Solution 0.1  $\text{mol L}^{-1}$  of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Merck) was used for selective extraction of Cr(VI) from soil samples. In the analysis of possible interferents, all the reagents used were analytical grade of purity.

### 2.2. Synthesis of carbon dots

For the preparation of CDots the following methodology was used: 1.5 g of citric acid and 0.5 g of reduced L-glutathione were weighed. After weighing, the solids were mixed until they formed a homogeneous mixture. After that, the mixture was placed in a tubular alumina furnace for the heating treatment, at a rate of 10 °C  $\text{min}^{-1}$  and annealed for 120 min at 270 °C in inert atmosphere. Following, the product was triturated to a finely powder, which was transferred to a beaker with 100 mL of water. The mixture was placed in an ultrasonic bath for 30 min in order to extract the nanoparticles, since after the pyrolysis they may be adsorbed in the coal formed. Then, it was kept under magnetic stirring and heating for 30 min, at 100 °C, to aid the extraction process of the CDots. Finally, the system was centrifuged at 3600 rpm for 15 min and filtered through PVDF membrane with 0.22  $\mu\text{m}$  pores (Micropore), discarding the precipitate.

### 2.3. Characterization of CDots

Absorption spectra were recorded on a dual beam spectrophotometer with a photomultiplier tube type detector (UV-2550, Shimadzu). The measurements were carried out in the region of 200 to 900 nm, using water as the reference in a 10 mm optical pathway quartz cells (Hellma). The emission spectra were obtained on a spectrofluorimeter (RF-5301PC, Shimadzu). Spectra were recorded in the range of 330 to 650 nm in 10 mm optical pathway quartz cells. A 150 W xenon lamp was used as the excitation source, with slits of 3 nm for emission and 3 nm for excitation. The spectra in the infrared region were obtained on a Fourier transform infrared spectrometer (Spectrum GX, Perkin Elmer). Spectra were recorded in the region of 4000 to 400  $\text{cm}^{-1}$ , with a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$  and accumulation of 64 spectra. Samples were dispersed in KBr and pelleted using a hydraulic press using 10 tons of compacting pressure. The CDots samples were characterized in a microscope TEM-FEG (JEM 2100) operating at 200 kV. Samples were prepared by adding one drop of the CDots suspension onto a 300 mesh copper grid with Holey Carbon and an ultrathin layer of carbon. The samples were analyzed by X-ray diffraction (XRD) using X-ray diffraction (XRD 6000, Shimadzu), using a radiation of  $\text{Cu K}\alpha$  ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ), with 0.02 ° scan, between 10 and 80° (2 $\theta$ ).

For determination of photoluminescence quantum yield ( $\Phi_f$ ) solutions of a standard dye and a suspension of CDots were prepared, and measured at 355 nm. The integrated area of photoluminescence vs. absorbance intensity graph was obtained. The angular coefficient of the graphs obtained was used to determine the values of quantum yields according to Eq. (1).

$$\Phi_f = \Phi_{ST} \left( \frac{m_S}{m_{ST}} \right) \left( \frac{\eta_S^2}{\eta_{ST}^2} \right) \quad (1)$$

In this case, the subscripts S and ST represent the sample and the standard dye, respectively. The term  $m$  corresponds to the angular coefficient obtained from the linear regression of the integrated fluorescence intensity vs absorbance graph and,  $\eta$  is the refractive index of the solution of the test sample and standard substance. The standard substance used to determine  $\Phi_f$  must exhibit emission and absorption in a region similar to that of the sample for which this parameter is desired. For this reason, quinine

sulfate was used as the standard substance ( $\Phi_f = 54\%$ ) to determine  $\Phi_f$  of the CDots.

Life-time decay curves help characterize the different emission centers of nanomaterials. Measurements of life-time decay were obtained using a Horiba (Fluorolog-3 Jobin-Yvon) spectrofluorimeter. Excitation was performed using a pulsed nanoled with excitation wavelength of 341 nm. All curves were obtained at room temperature. The life-time curve in the excited state was best adjusted with a mono exponential curve represented by Eq. (2).

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (2)$$

#### 2.4. Determination of Cr(VI) using CDots

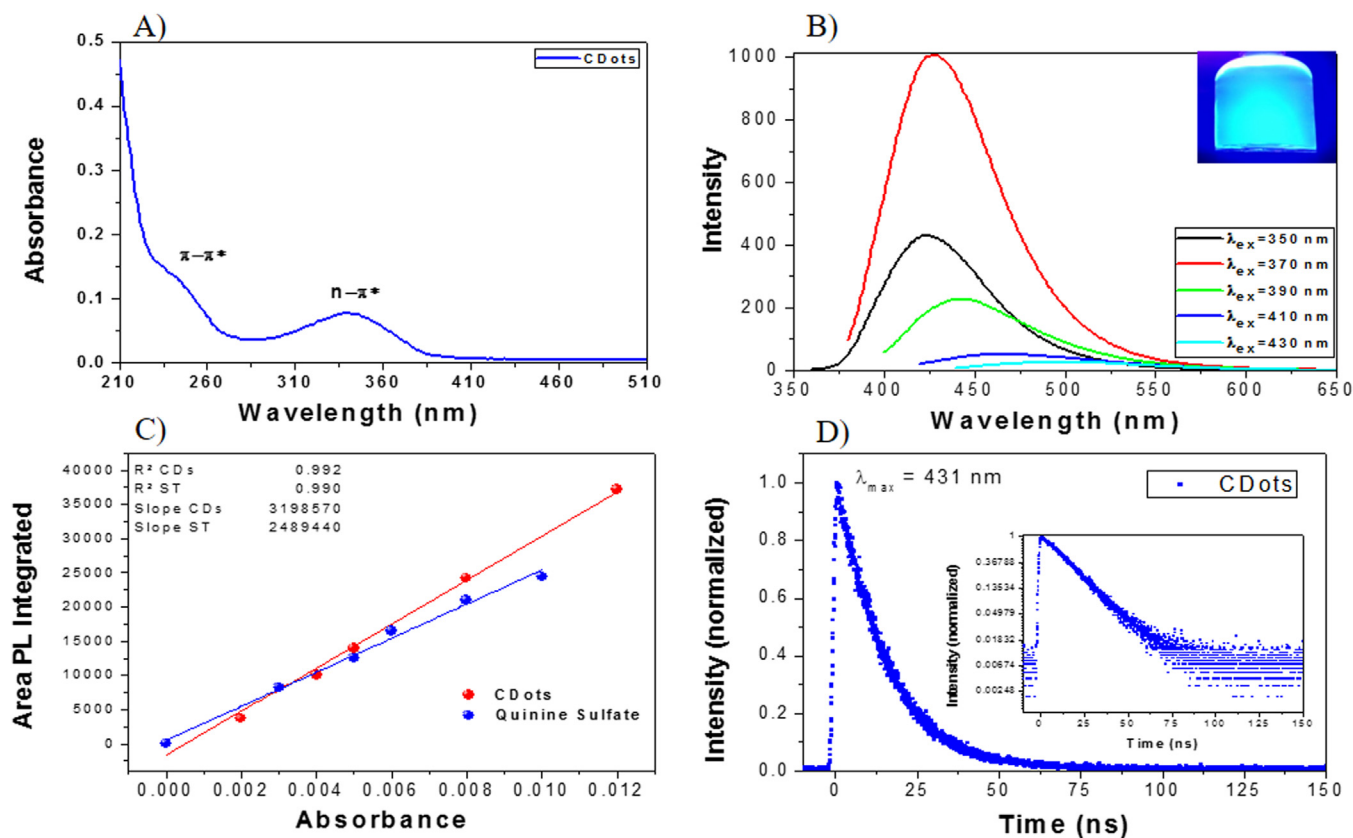
In the standard procedure, 100  $\mu\text{L}$  of a 0.13  $\text{mgL}^{-1}$  CDots solution and 100  $\mu\text{L}$  of the Tris 60  $\text{mmolL}^{-1}$  buffer (pH 7) were mixed with increasing volumes of the stock solution of the analyte to yield final Cr(VI) concentrations range 0.10–12  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (1.92–230  $\mu\text{molL}^{-1}$ ). Then, water was added to 1.0 mL, and kept 20 min at room temperature before the spectrofluorimetric measurements ( $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ ). The maximum fluorescence intensity obtained at 418 nm was used for the quantification of Cr(VI). These procedures were applied in the all steps of this work. For analytical parameters optimization, the slope of calibration curve was used based on Eq. (3):

$$\left[\frac{I_0 - I_f}{I_f}\right] = aC_{\text{Cr(VI)}} + b \quad (3)$$

where  $I_0$  and  $I_f$  correspond to the initial fluorescence intensity of the CDots and after addition of Cr(VI), respectively, and  $C_{\text{Cr(VI)}}$  is the concentration of chromium ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). The analytical sensitivity (slope) and the linear coefficient are represented by  $a$  and  $b$ , respectively. All analytical curves presented a minimum of five points with measurements in triplicate ( $n = 3$ ). The limits of detection (LOD,  $3\sigma$ ) was calculated according to the following equation:  $\text{LOD} = C_{\text{blank}} + 3sb/ac$ , where  $C_{\text{blank}}$  corresponds to Cr(VI) concentration related to the blank signal,  $sb$  corresponds to the standard deviation of the analytical blank solution ( $n = 10$ ), while  $ac$  corresponds to the calibration slope of the employed analytical curve. The relative standard deviation (RSD) was calculated according to the equation:  $\text{RSD} = (sp/xp) \times 100$ , where  $sp$  is the standard deviation, while  $xp$  is the average for a given analytical standard ( $n = 10$ ) [30].

#### 2.5. Preparation of water and soil samples

The proposed method was used for the quantification of Cr(VI) in water and soil samples. Four different water samples were used for quantification and evaluation of Cr(VI) recovery, including brackish water from the Mundaú-Manguaba estuarine complex ( $9^\circ 35' 24'' \text{S}$   $35^\circ 47' 26'' \text{W}$ ) and freshwater from the Catolé River ( $9^\circ 35' 24'' \text{S}$   $35^\circ 47' 26'' \text{W}$   $341^\circ \text{N}$ ), both at Maceió city (Alagoas, Brazil), as well as commercial mineral water. The water samples were filtered with 0.45  $\mu\text{m}$  membrane (cellulose esters) and percolated through a Dowex<sup>®</sup> 50-X8 ion exchange column (10 cm long, id = 5 mm, containing 2.5 g resin) for removal of possible interferents. Samples of argisol, lettuce and peat culture soil were characterized (Table S1, Supplementary material) and evaluated



**Fig. 1.** (A) UV-vis spectrum of CDots derived from citric acid with and glutathione, obtained by pyrolysis at 270 °C; (B) Photoluminescence spectra of the CDots excited at different wavelengths (inset: solution of CDots irradiated at 365 nm); (C) Integrated area of photoluminescence as a function of the absorbance to calculate the quantum yield of photoluminescence of CDots. The lower slope curve corresponds to the standard dye curve (quinine sulphate in 54% yield); (D) Decay curve of the excited state lifetime for the sample of CDots.

for concentration and Cr(VI) recovery assay. For selective Cr(VI) extraction of the soil samples, it was followed a procedure described by Panichev et al. [31].

### 3. Results and discussions

#### 3.1. Characterization of CDots

Fig. 1A shows the absorption spectrum in the visible ultraviolet region of the CDots. The material presented wide absorption in the ultraviolet range extending to the visible of the electromagnetic spectrum with two bands characteristic of the CDots reported in the literature, the first band located at 341 nm refers to transitions of type  $n \rightarrow \pi^*$  of carboxylic groups C—O and C=O present in the nanoparticles as observed in infrared spectroscopy. The other transition band is located at 240 nm, and it is associated with transitions of type  $\pi \rightarrow \pi^*$ , corresponding to  $sp^2$ -type carbon bonds present in CDots [32–34].

Fig. 1B shows CDots emission spectra excited at different wavelengths. It was observed that the samples present the maximum emission band in the blue region of the electromagnetic spectrum, being possible to observe the displacement of the bands to the red with the increase of the excitation wavelength. This displacement has been assigned in literature due to the heterogeneity of organic groups on the surface of the CDots [32]. These groups generate intermediate states between the HOMO and LUMO orbitals of the CDots, allowing emission over a wider range of the electromagnetic spectrum. CDots prepared from citric acid and glutathione exhibit their highest emission intensity when excited at 370 nm [29,32]. The dispersion of the CDots exhibits colloidal stability in aqueous medium and are translucent when not under irradiation of light. The irradiation of ultraviolet light and the emission of blue color is the first evidence of formation of CDots as shown in the inset of Fig. 1B, when irradiated at 365 nm.

Fig. 1C displays the decay curve of the excited state of the CDots, the curve was adjusted in a mono-exponential decay. The lifetime of the CDots was  $\tau = 14.58$  ns. The mono-exponential decay may be related to the doping of the CDots with nitrogen atoms present in the glutathione molecule, which provides additional energy levels

to the CDots [35,36]. Due to the short lifetime and the rapid electron transfer, the CDots have potential to be used in electronic, electrochemical, electrochemiluminescence and photoluminescence (PL) sensors [37].

Fig. 1D shows the curves corresponding to the calculation of the quantum yield of photoluminescence. The CDots incorporated with glutathione present  $\Phi_f$  of 69.4%. The high value of  $\Phi_f$  can be attributed to the introduction of new intermediate states of energy, caused by the nitrogen and sulfur atoms in the material, which were derived from the precursor glutathione [35,36]. This high value of  $\Phi_f$  suggests that the inert atmosphere pyrolysis method is effective in the production of CDots, besides being simple and cheap [29].

Results based on CDots containing only C, O and H often lead to low photoluminescence quantum yields. For example, Y. Dong et al. [33] prepared CDots by carbonization of the citric acid precursor, with a size of 15 nm, which were classified according to their degree of carbonization. Full carbonization CDots exhibit excitation wavelength dependent emission, shifting the maximum emission with increasing incident radiation, with a  $\Phi_f$  of 9.0%. CDots that underwent incomplete carbonization exhibit emission independent of the excitation wavelength, the calculated  $\Phi_f$  value was 2.2%. Sahu et al. [34], described the preparation of CDots using orange juice as a precursor, a non-toxicity and easily accessible material, via a simple hydrothermal route. The CDots containing functional groups such as C—OH, C—C, C=O and C—H on their surface exhibit luminescence depending of the excitation wavelength, and the author attributed the emission to defects created in the structure generated by the functional groups. The  $\Phi_f$  was 26%, one of the highest values found for CDots with low cost precursors.

The incorporation of glutathione in citric acid had already been reported in the literature since it generated CDots with  $\Phi_f$  of 80.3%, via hydrothermal route. According to Zhuo et al. the CDots prepared from citric acid and glutathione by this route have independent emission with the excitation wavelength. This difference compared to those prepared via pyrolysis, such as those of this work, which have emission dependency on the excitation wavelength, may be related to the preparation route, since pyrolysis uses a higher temperatures [35], while the

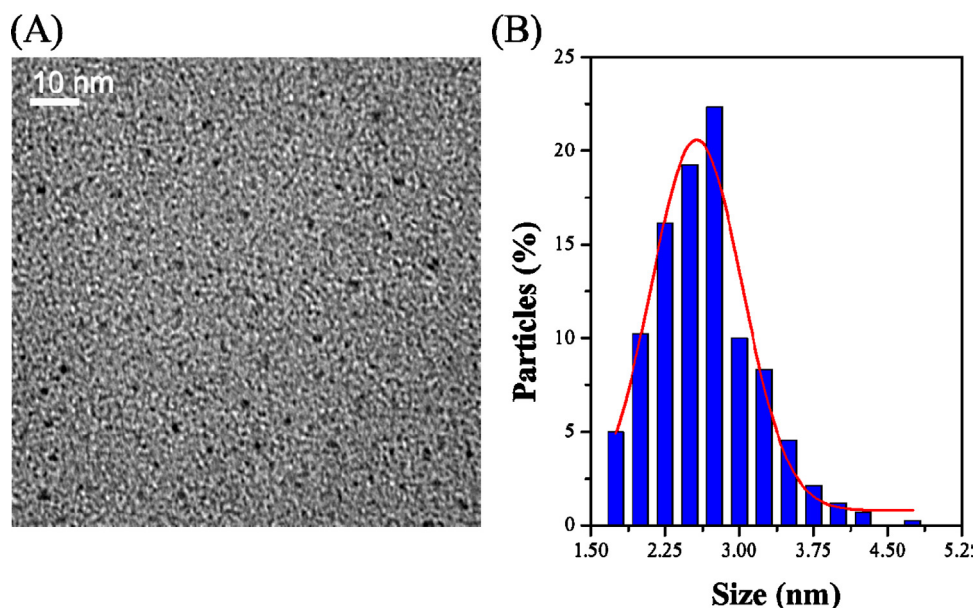


Fig. 2. (A) TEM image of CDots obtained by pyrolysis in an inert atmosphere at 270 °C. (B) Histogram of size distributions of CDots.



hydrothermal route is softer, it is able to produce CDots with better surface homogeneity [32].

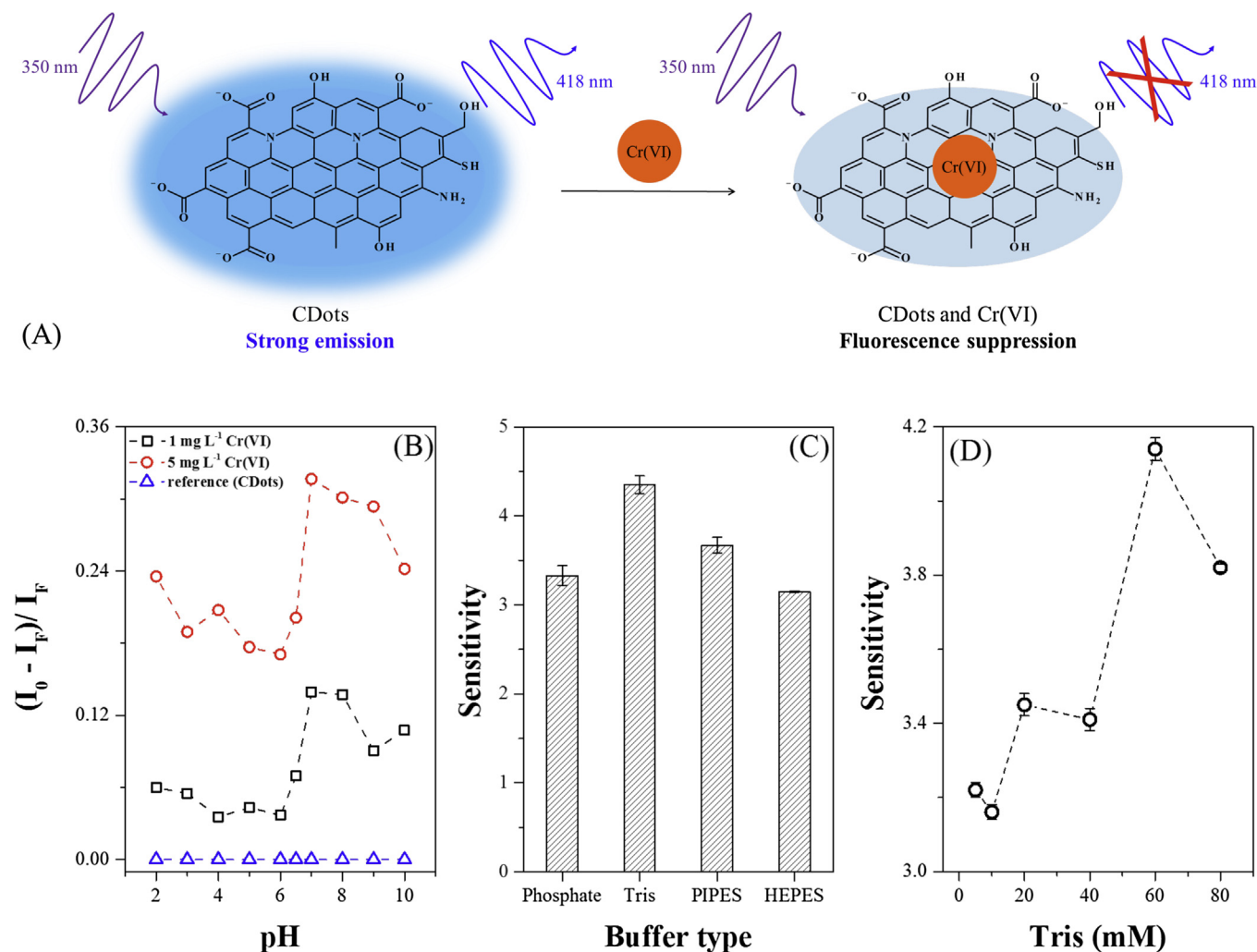
Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to characterize the CDots, in order to obtain information about the functional groups remaining in the nanoparticles. Fig. S1 (Supplementary material) shows the FTIR spectrum of the CDots. The synthesized material has a hydroxyl vibration band between 3500 and 3200  $\text{cm}^{-1}$ . The symmetric carbonyl stretching at 1711  $\text{cm}^{-1}$ , together with the hydroxyl and carboxyl stretches leads to the conclusion that the nanoparticle has the carboxylic acid group on its surface. The CDots exhibit asymmetric N–H stretching vibrations at approximately between 3400 and 3000  $\text{cm}^{-1}$  and folding of N–H at 1630  $\text{cm}^{-1}$ . These vibrations are typical of glutathione-derived amine groups, where it was possible to observe that sensitization was effective, and such clusters could improve  $\Phi_f$  of CDots. The vibrations of C–H and C=C can be observed at 2921 and 1400  $\text{cm}^{-1}$ , respectively. All bands were assigned according to the reference [38] and similar papers [33–35]. The main vibrations and their respective transmittances are shown in Table S2.

Fig. 2A shows the transmission electron microscopy (TEM) micrographs of CDots. It is possible to observe that the nanoparticles have *quasi*-spherical morphology, as already reported by other authors [3,9,17] in addition, a histogram with particle size distribution is shown in Fig. 2B in which it is possible to verify that

the mean size of the nanoparticles is 2.5 nm, with dispersion sizes ranging from 1.75 to 4.75 nm. It was observed that the samples presented a typical non-crystalline behavior, since high resolution images could not be obtained. In addition, the diffraction of electrons did not indicate the presence of crystallographic planes. The absence of crystallinity of the nanoparticles was also confirmed by XRD (Fig. S2), since no crystalline plane diffraction peaks were observed, thus corroborating with TEM results. Fig. S2 shows the XRD analyzes of the precursors and the obtained CDots. It is possible to observe that the precursors of citric acid and reduced glutathione exhibit high crystallinity, unlike the pyrolysis-prepared CDots which have a typically non-crystalline pattern, with a typical halo of amorphous carbonaceous materials centered at  $2\theta = 22^\circ$  [3,9,34]. One possible explanation for the lack of crystallinity is that the precursors when subjected to heating degrade incompletely forming the fluorescent nanoparticles, without organized arrangements of long order.

### 3.2. Optimization of analytical parameters

CDots produced in aqueous medium exhibit fluorescence emission in blue ( $\lambda_{em} = 418 \text{ nm}$ ), and in the presence of Cr(VI) are rapidly quenched (Fig. 3A). In order to efficiently explore the CDots produced as fluorescent probe for determination of Cr(VI) some analytical parameters were optimized.



**Fig. 3.** (A) Cr(VI) determination principle exploring CDots fluorescence probe. (B) pH effect in the CDots quenching by different Cr(VI) concentrations. (C) Buffer type evaluation at pH 7 ( $n = 3$ ). (D) Influence of Tris buffer concentration in the method sensitivity at pH 7 ( $n = 3$ ).

The evaluation of the pH of the medium is an important parameter for the optimization of the method, as it can influence the fluorescence intensity, the efficiency of the quenching process and the distribution of the Cr(VI) species. Initially, the pH of the system was evaluated using the Britton–Robinson buffer (pH 2–10) (Fig. 3B).

As a function of the obtained profile, the greatest variation of the signal using different concentrations of Cr(VI) was observed at pH 7.0 in relation to the reference solution. The effect of pH on the quenching process may be related to the existing forms of the groups (acid-base equilibrium) on the surface of the sensor and the distribution of Cr(VI) species in solution [39]. Cr(VI) in aqueous medium shows pH dependent equilibrium:  $2\text{CrO}_4^{2-} + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Cr}_2\text{O}_7^{2-} + 2\text{H}_2\text{O}$ . In an acid medium, Cr(VI) exists predominantly as dichromate, which may have a lower quenching efficiency than chromate when interacting with the sensor. In this way, Cr(VI) in the form of  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  could not decrease the fluorescence intensity efficiently of the sensor in acid medium. Considering that both anions ( $\text{CrO}_4^{2-}$  and  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ) have the same charge (–2), the dichromate has a higher molar volume, and therefore, has lower electron density than the chromate, thus having a less effective interaction with the CDots. Additionally, in alkaline solutions, the oxygen-containing functional groups of the sensor are deprotonated, leading to an increase in the negative charge of the CDots surface. This effect disfavors the interaction between the sensor and the negatively charged chromate. As a result, the quenching efficiency decreases with increasing of solution pH.

Once pH 7 was defined as the optimal condition, the effect of the type of buffer in the system was evaluated, using phosphate, Tris, PIPES and HEPES buffers (Fig. 3C). Tris buffer presented higher sensitivity than the other systems evaluated (increase of 27.6% related HEPES buffer). This profile is due to the fact that at pH 7, Tris can more effectively aid in the interaction of Cr(VI) with CDots compared to other systems, since it would be positively charged, unlike other buffers. The concentration of Tris in the system was evaluated from 5 to 80 mM (Fig. 3D), where it was observed that at 60 mM (6 mM after dilution) the sensitivity was maximal. Higher values led to a reduction in sensitivity possibly due to the blockage of the CDots surface, making it impossible to interact more effectively with Cr(VI).

Then, the concentration of the CDots solution was evaluated in the range of 0.09 to 0.53  $\text{mg L}^{-1}$  (Fig. S3), with analytical sensitivity practically constant in the range of 0.09 to 0.27  $\text{mg L}^{-1}$  of the CDots, for higher values there was a sensitivity decrease of 35%, and higher concentrations of Cr(VI) were required to suppress system fluorescence. The concentration of 0.13  $\text{mg L}^{-1}$  was selected because of the good linearity, reproducibility and economy of the synthesized material.

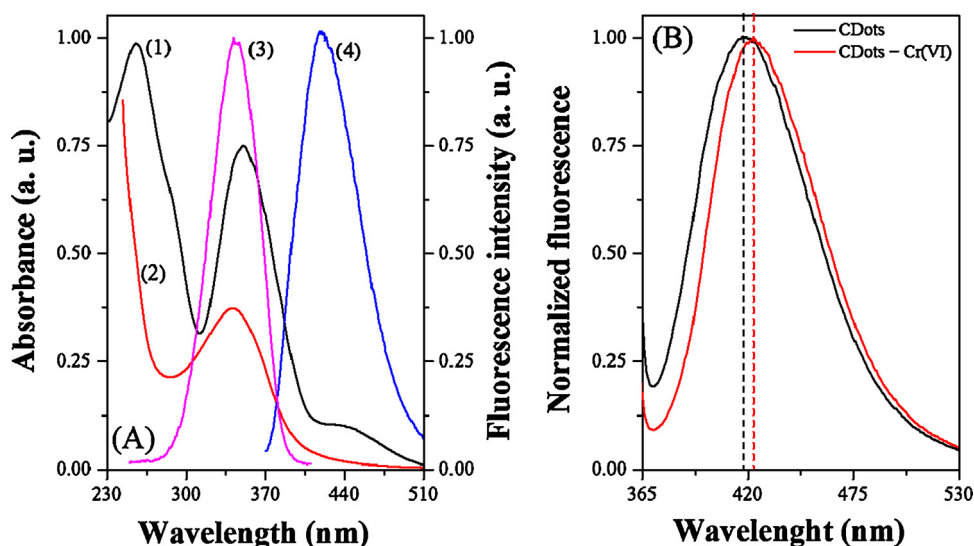
After the optimized conditions, the stability of the CDots and the kinetics of the quenching process was evaluated. The solution of CDots showed almost constant signal, with maximum fluorescence variation of 7% over the 60 min of evaluation under constant irradiation (Fig. S4A), showing good photoluminescent stability. For the interaction kinetics between the CDots and the Cr(VI), it was observed that after 20 min the signal stabilization with respect to the reference solution (Fig. S4B) for different concentrations of Cr(VI) evaluated.

### 3.3. Mechanism of interaction between CDots and Cr(VI)

As shown in Fig. 4A, the UV–vis spectrum of Cr(VI) at pH 7 shows bands at 255, 351 and 436 nm. The CDots exhibit an absorption band at 341 nm and emission at 418 nm when excited at 350 nm. Thus, spectral overlap occurs between the absorption spectrum of Cr(VI) with both absorption and emission spectra of the CDots. Therefore, Cr(VI) shields part of the radiation for the excitation of the CDots, as well as partially absorbs the light emitted by the CDots, leading to the inner filter effect between the Cr(VI) and the CDots, and consequently causing the change in the intensity of fluorescence [19,40].

Based on Fig. 4B it was observed that there was a maximum emission shift from 418 to 423 nm (red-shift) when CDots are in the presence of Cr(VI) ions, suggesting that the quenching mechanism is not related only to inner filter effect process, but also to the fundamental state of the species involved [40]. In this way, the quenching process was evaluated, in order to obtain more information.

For the elucidation of the preferential quenching type (dynamic or static), magnitude of the interaction process, and the thermodynamic parameters associated with the interaction between CDots and Cr(VI), interaction experiments at different



**Fig. 4.** (A) UV–vis absorption spectra of (1) Cr(VI) and (2) CDots, (3) the excitation spectrum of CDots at  $\lambda_{em} = 418$  nm and the (4) emission spectrum of CDots at  $\lambda_{ex} = 350$  nm. (B) Normalized fluorescence of CDots in the absence and presence of Cr(VI) at  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively.



temperatures were performed. The Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) and binding constant ( $K_b$ ) were calculated according to the following equations:

$$\frac{I_0}{I_F} = 1 + K_{SV}[\text{Cr(VI)}] \text{ or } \frac{I_0}{I_F} = 1 + K_q \tau_0 [\text{Cr(VI)}] \quad (4)$$

$$\log \left[ \frac{I_0 - I_F}{I_F} \right] = K_b + n \log [\text{Cr(VI)}] \quad (5)$$

where  $I_0$  and  $I_F$  are the fluorescence intensities of the CDots in the absence and presence of Cr(VI), respectively,  $K_q$  is the bimolecular diffusion quenching rate constant ( $2.0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ),  $\tau_0$  is the average lifetime (estimated in  $10^{-8} \text{ s}$ ), and  $K_{SV}$  is the Stern-Volmer quenching constant.  $K_b$  is the binding constant,  $n$  is the number of binding sites and  $[\text{Cr(VI)}]$  is the molar concentration of Cr(VI), varied from 19.2–181  $\mu\text{M}$  ( $1\text{--}9.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) [41,42].

Based on data presented in Table 1, it can be seen that the values of  $K_{SV}$  and  $K_b$  decreased as a function of the increase in temperature. This result is indicative that the quenching process between CDots and Cr(VI) was static, leading to the formation of non-fluorescence supramolecular complex in the ground state [43]. With the elevation of the temperature, there is a disadvantage of the formation of the complex, and consequently a reduction of the values of the constants. If the quenching mechanism was dynamic, an increase in the constants should be observed, due to the higher frequency of effective collisions between CDots and Cr(VI) in the excited state [44]. Additionally, when the  $K_q$  is less than  $2.0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  dynamic quenching occurs, while higher  $K_q$  values are indicative of a static quenching mechanism [41,44]. The  $K_q$  values estimated in this study (Table 1) varied from 1.69 to  $1.92 \times 10^{11} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , and thus, the interaction processes of Cr(VI) with CDots occurred through static quenching.

The results obtained corroborate with previous works that used Cr(VI) as quencher, forming a complex in the ground state [42,45]. In addition, the  $K_b$  value of the order of  $10^3 \text{ L mol}^{-1}$  is characteristic of a median interaction, while  $n \sim 1$ , is related to a preferential binding site between CDots and Cr(VI).

The thermodynamic parameters  $\Delta H$  and  $\Delta S$  related to the interaction process CDots and Cr(VI) were obtained from the Van't Hoff equation (Fig. S5A), and were used to calculate the Gibbs free energy ( $\Delta G$ ) from Eqs. (6) and (7), respectively:

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \left[ \frac{1}{T} \right] + \frac{\Delta S}{R} \quad (6)$$

$$\Delta G = \Delta H + \Delta S \quad (7)$$

where  $K_b$  is the equilibrium constant for a certain temperature  $T$ , and  $R$  is the universal gas constant [46].

In the evaluated process  $\Delta H = -37.26 \text{ kJ mol}^{-1}$  and  $\Delta S = -55.4 \text{ J mol}^{-1}$ , it was observed that the enthalpy factor was more influential than the entropic factor. As a function of  $\Delta H < 0$  and  $\Delta S < 0$ , and using studies based on the interaction between macromolecules (proteins and DNA) and small ligands, this thermodynamic pattern is characteristic of Van der Waals

interactions and hydrogen bonds in the system [47]. To confirm this type of interaction, the influence of the ionic force on the medium was evaluated with addition of NaCl at different concentrations (Fig. S5B). In this study, the analytical sensitivity in the absence of NaCl did not show a significant difference in the presence of the salt ( $0.1$  to  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$ ), indicating that electrostatic forces are not preferred, so the interaction process between CDots and Cr(VI) by preferential interactions hydrogen bonds or Van der Waals forces.

### 3.4. Figures of merits and interferences

Increasing additions of Cr(VI) to the system containing the CDots led to the reduction of fluorescence intensity due to the association of inner filter effect and static quenching (Fig. 5A), thus, the main merit figures of the proposed method were established from the analytical curve (Fig. 5B).

The proposed method presented a linear range of  $0.1$  to  $12 \mu\text{g mL}^{-1}$  corresponding to the equation  $[(I_0 - I_F)/I_F] = 0.116 (\pm 0.001) C_{\text{Cr(VI)}} + 0.036 (\pm 0.008)$ , and linear correlation coefficient  $r = 0.9992$ . The method was accurate with RSD = 2.15 and 4.65% for Cr(VI) concentrations of 1 and  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively, and with a limit of detection (LOD) of  $0.03 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

The selectivity of the method was evaluated against 30 possible interferences in the absence and presence of Cr(VI) according to Fig. 6, with a maximum variation of  $\pm 10\%$  of the fluorescence signal as the criterion. Interferences were selected due to the presence of water and soil samples.

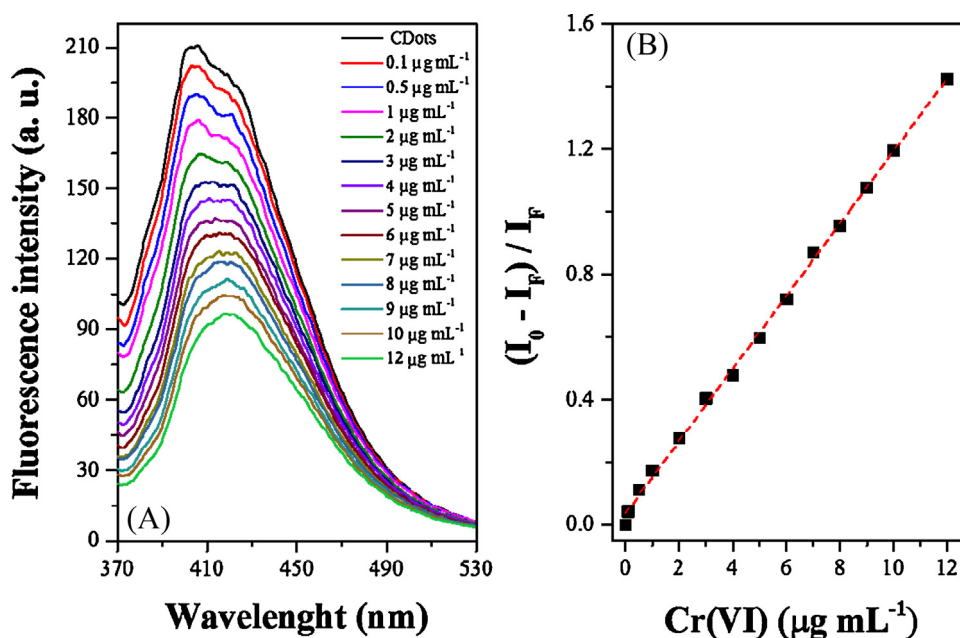
The species that showed potential interferences were Pb(II) and Ba(II) due to the formation of salts of low solubility with the chromate ions, in addition to Al(III), Fe(II) and Fe(III), in which the last one was the main interferent of the method due to its paramagnetic properties. To eliminate or minimize the interference of these species, before the analysis the samples were passed through a cationic column, retaining the cations, and not interfering in the Cr(VI) response, which at pH 7 present preferentially  $\text{CrO}_4^{2-}$ , and was not retained in the column. The proposed method was compared to other studies in the literature, and shown to be equivalent for the analytical linear range of concentration and selectivity (Table 3S). In addition, the CDots-based method shows adequate LOD for detection of total Cr(VI) according to WHO of  $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Environmental Protection Agency (EPA, USA) of  $0.10 \mu\text{g mL}^{-1}$  for drinking water, and National Environment (CONAMA, Brazil) of 0.05 and  $1.1 \mu\text{g mL}^{-1}$  for drinking water and brackish water, respectively [27,48,49]. Finally, the CDots showed a reversible response to Cr(VI) after addition of a reducing agent (ascorbic acid), which is capable of reducing Cr(VI) to Cr(III) and restoring the original fluorescence signal (Fig. 6S). The process was evaluated by several cycles with successive additions of Cr(VI) and ascorbic acid, respectively, indicating the possibility of the nanosensor being reusable.

### 3.5. Analysis of real samples

In order to validate the proposed method, the concentration of Cr(VI) in different water and soil samples was determined (Table 2).

**Table 1**  
Binding parameters of interaction process between CDots and Cr(VI).

Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	Stern-Volmer parameters			Binding parameters		
	$K_{SV}$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1}$ )	$r$	$K_q$ ( $10^{11} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$K_b$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1}$ )	$n$	$r$
23 (296 K)	$1.92 \pm 0.08$	0.9943	1.92	$4.59 \pm 0.02$	$1.11 \pm 0.06$	0.9929
30 (303 K)	$1.84 \pm 0.07$	0.9959	1.84	$3.71 \pm 0.01$	$1.09 \pm 0.03$	0.9979
38 (311 K)	$1.69 \pm 0.06$	0.9967	1.69	$2.22 \pm 0.01$	$1.02 \pm 0.03$	0.9978

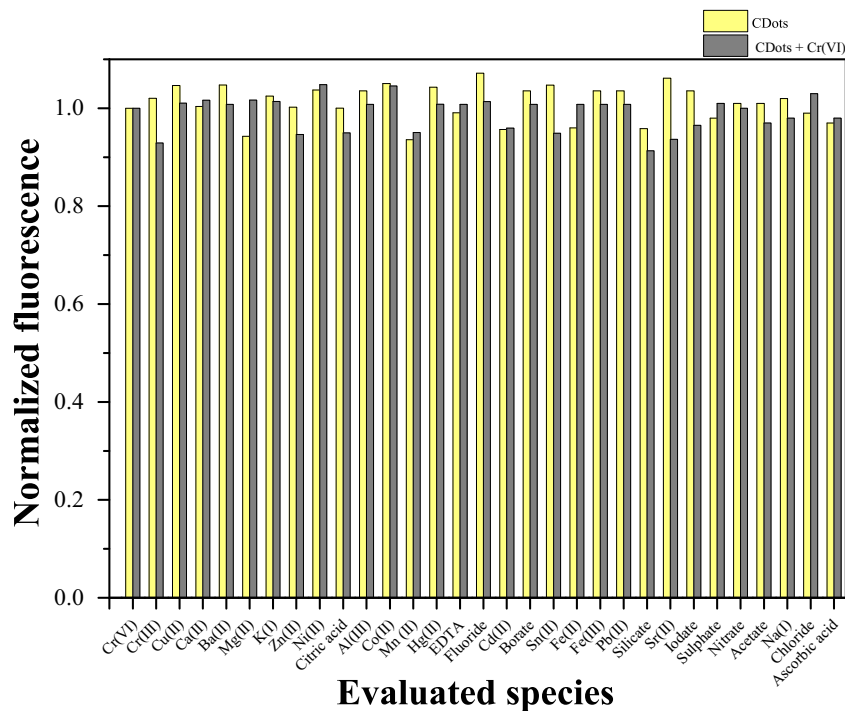


**Fig. 5.** (A) CDots ( $0.13 \text{ mg L}^{-1}$ ) fluorescence spectra in the absence and presence of different Cr(VI) concentrations. (B) Linear plot of  $(I_0 - I_F)/I_F$  vs Cr(VI) concentration to  $0.1\text{--}12 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  at pH 7.

According to the results, it was possible to quantify Cr(VI) in the brackish water sample ( $0.28 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ), the value found below the limit recommended by CONAMA for samples of this nature in Brazil [49]. The other water and soil samples showed Cr(VI) concentration below the limit of detection.

The proposed method was validated using a recovery assay in the different water and soil samples with three different levels (2, 4 and  $8 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ) of Cr(VI) concentration. Thus, four different types

of water (brackish, fresh, drinking and tap water) with recovery values of 90 to 105% for Cr(VI) were evaluated. Then, three soil samples were evaluated using  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  as the selective Cr(VI) extraction solution [31]. Soil samples showed organic matter content ranging from 8% (lettuce culture soil) to 52% (peat), but this factor did not influence the response of the method, which presented a recovery range of 99.5 to 107%. Finally, the method proved to be accurate as a function of quantitative recoveries in



**Fig. 6.** Evaluation of method selectivity against possible interferents. Cr(VI) concentration was  $5 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $96.1 \text{ }\mu\text{M}$ ) in the assay. Limit concentration values of Cr(III), Cu(II), Ca(II), Mg(II), K(I), Zn(II), Ni(II), Co(II), Mn(II), Hg(II), Cd(II), Sn(II), Sr(II), citric acid, fluoride, EDTA, borate, silicate and iodate were  $1000 \text{ }\mu\text{M}$ . To Ba(II) and Al(III) were  $500 \text{ }\mu\text{M}$ , Fe(II) and Pb(II) were  $100 \text{ }\mu\text{M}$ , and Fe(III) was  $50 \text{ }\mu\text{M}$ . To sulphate, nitrate and acetate were  $1000 \text{ }\mu\text{M}$ , ascorbic acid was  $500 \text{ }\mu\text{M}$  and finally, Na(I) and chloride were  $300 \text{ mM}$ . The results are expressed after treatment with cationic column for the main interferents and CDots concentration used was  $0.13 \text{ mg L}^{-1}$ .

**Table 2**

Concentration of spiked Cr(VI) in water and soil samples quantified by the CDots (0.13 mg L<sup>-1</sup>) fluorescence proposed method (n=3).

Water sample	Type	Cr(VI) (μg mL <sup>-1</sup> )		Recovery (%)
		added	recovered	
1	brackish water	0.0	0.28 ± 0.02	–
		2.0	2.37 ± 0.12	104
		4.0	4.21 ± 0.16	98
		8.0	8.45 ± 0.23	102
2	fresh water	0.0	<LOD	–
		2.0	2.09 ± 0.08	105
		4.0	3.80 ± 0.10	95
		8.0	8.16 ± 0.19	102
3	drinking water	0.0	<LOD	–
		2.0	2.01 ± 0.02	101
		4.0	3.75 ± 0.09	94
		8.0	7.78 ± 0.21	97
4	tap water	0.0	<LOD	–
		2.0	2.01 ± 0.07	101
		4.0	3.60 ± 0.11	90
		8.0	8.01 ± 0.23	101
Soil sample	Type	Cr(VI) (μg g <sup>-1</sup> )		Recovery (%)
		added	recovered	
1	clayey soil	0.0	<LOD	–
		2.0	1.99 ± 0.05	99.5
		4.0	4.08 ± 0.09	102
		8.0	7.95 ± 0.15	99.5
2	lettuce cultivation	0.0	<LOD	–
		2.0	2.12 ± 0.03	106
		4.0	4.17 ± 0.12	104
		8.0	8.61 ± 0.27	107
3	peat	0.0	<LOD	–
		2.0	2.05 ± 0.06	102
		4.0	4.29 ± 0.18	107
		8.0	8.49 ± 0.22	106

samples of different types, besides being versatile, fast and precise, being feasible its application in environmental samples.

#### 4. Conclusions

The pyrolysis method proved to be adequate to produce CDots with intense luminescence, as shown by the high photoluminescence quantum yield of 69%. In addition, the emission of the CDots was shown to be dependent on the excitation wavelength, observing a red shift as the excitation wavelength increased, which is explained by the heterogeneity of the surface groups present in the CDots. The lifetimes of the order of 10 ns make these materials with potential applications such as electronic and optical devices, as well as eco-friendly sensors for the detection of Cr(VI) ions. In this case, it was verified that the mechanism of interaction between CDots and Cr(VI) is associated with both inner filter effect and static quenching. The method employed the CDots as fluorescent sensors was optimized in relation to the main analytical parameters, presenting a linear range from 0.10 to 12 μg mL<sup>-1</sup>, limit of detection of 0.03 μg mL<sup>-1</sup> (pH 7), with recoveries of 90–105% and 99.5–107% for water and soil samples, respectively. Therefore, the method was selective, sensitive, fast and versatile for applications in different environmental samples.

#### Acknowledgements

The authors acknowledge to CAPES, FAPEMIG, FAPEAL and CNPq. This work is a collaboration research project of members of

the Rede Mineira de Química (RQ-MG) supported by FAPEMIG (Project: CEX – RED-00010-14).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.06.047>.

#### References

- [1] P. Mirtchev, E.J. Henderson, N. Soheilnia, C.M. Yip, G.A. Ozin, Solution phase synthesis of carbon quantum dots as sensitizers for nanocrystalline TiO<sub>2</sub> solar cells, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 1265–1269, doi:<http://dx.doi.org/10.1039/C1JM14112K>.
- [2] S.C. Ray, A. Saha, N.R. Jana, R. Sakar, Fluorescent carbon nanoparticles: synthesis, characterization, and bioimaging application, *J. Phys. Chem. C* 113 (2009) 18546–18551, doi:<http://dx.doi.org/10.1021/jp905912n>.
- [3] J. Shen, Y. Zhu, X. Yang, L. Chunzhong, Graphene quantum dots: emergent nanolights for bioimaging, sensors, catalysis and photovoltaic devices, *Chem. Commun.* 48 (2012) 3686–3699, doi:<http://dx.doi.org/10.1039/C2CC00110A>.
- [4] H. Li, X. He, Z. Kang, H. Huang, Y. Liu, J. Liu, S. Lian, C.H.A. Tsang, X. Yang, Water-soluble fluorescent carbon quantum dots and photocatalyst design, *Angew. Chem. Int. Ed.* 49 (2010) 4430–4434, doi:<http://dx.doi.org/10.1002/anie.200906154>.
- [5] B.H. Yang, Q.Y. Dong, X. Wang, Y.S. Khoo, B. Liu, M.C. Li, Graphene quantum dots-incorporated cathode buffer for improvement of inverted polymer solar cells, *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* 117 (2013) 214–218, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.solmat.2013.05.060>.
- [6] C. Sun, Y. Zhang, Y. Wang, W. Liu, S. Kalytchuk, High color rendering index white light emitting diodes fabricated from a combination of carbon dots and zinc copper indium sulfide quantum dots, *Appl. Phys. Lett.* 104 (2014) 2611060–2611064, doi:<http://dx.doi.org/10.1063/1.4886415>.
- [7] C.E. Machado, K.O. Vieira, J.L. Ferrari, M.A. Schiavon, Carbon quantum dots: chemical synthesis, properties and applications, *RVQ* 7 (2015) 1306–1346, doi:<http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20150073>.
- [8] A. Zhao, Z. Chen, C. Zhao, N. Gao, J. Ren, X. Qu, Recent advances in bioapplications of C-dots, *Carbon* 85 (2015) 309–327, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2014.12.045>.
- [9] S.Y. Lim, W. Shen, W. Gao, Carbon quantum dots and their applications, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 362–381, doi:<http://dx.doi.org/10.1039/C4CS00269E>.
- [10] Z. Qian, J. Ma, X. Shan, H. Feng, L. Shao, J. Chen, Highly luminescent N-doped carbon quantum dots as an effective multifunctional fluorescence sensing platform, *Chem. Eur. J.* 20 (2014) 2254–2263, doi:<http://dx.doi.org/10.1002/chem.201304374>.
- [11] Y. Xu, M. Wu, Y. Liu, X.Z. Feng, X.B. Yin, X.W. He, Y.K. Zhang, Nitrogen-doped carbon dots: a facile and general preparation method, photoluminescence investigation, and imaging applications, *Chem. Eur. J.* 19 (2013) 2276–2283, doi:<http://dx.doi.org/10.1002/chem.201203641>.
- [12] Y. Dong, H. Pang, H.B. Yang, C. Guo, J. Shao, Y. Chi, C.M. Li, T. Yu, Carbon-based dots co-doped with nitrogen and sulfur for high quantum yield and excitation-independent emission, *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (2013) 7800–7804, doi:<http://dx.doi.org/10.1002/anie.201301114>.
- [13] S. Chandra, P. Patra, S.H. Pathan, S. Roy, S. Mitra, A. Layek, R. Bhar, P. Pramanik, A. Goswami, Luminescent S-doped carbon dots: an emergent architecture for multimodal applications, *J. Mater. Chem. B* 1 (2013) 2375–2382, doi:<http://dx.doi.org/10.1039/C3TB00583F>.
- [14] X. Zhai, P. Zhang, C. Liu, T. Bai, W. Li, L. Daic, W. Liu, Highly luminescent carbon nanodots by microwave-assisted pyrolysis, *Chem. Commun.* 48 (2012) 7955–7957, doi:<http://dx.doi.org/10.1039/C2CC33869F>.
- [15] J. Jiang, Y. He, S. Lia, H. Cui, Amino acids as the source for producing carbon nanodots: microwave assisted one-step synthesis, intrinsic photoluminescence property and intense chemiluminescence enhancement, *Chem. Commun.* 48 (2012) 9634–9636, doi:<http://dx.doi.org/10.1039/C2CC34612E>.
- [16] Y. Dong, R. Wang, H. Li, H. Shao, Y. Chi, X. Lin, G. Chen, Polyamine-functionalized carbon quantum dots for chemical sensing, *Carbon* 50 (2012) 2810–2815, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2012.02.046>.
- [17] C.E. Machado, L.G. Tartuci, H.F. Gorgulho, L.F.C. Oliveira, J. Bettini, D.P. Santos, J. L. Ferrari, M.A. Schiavon, Influence of inert and oxidizing atmospheres on the physical and optical properties of luminescent carbon dots prepared through pyrolysis of a model molecule, *Chem. Eur. J.* 22 (2016) 4556–4563, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2012.02.046>.
- [18] P.C. Hsu, Z.Y. Shih, C.H. Lee, H.T. Chang, Synthesis and analytical applications of photoluminescent carbon nanodots, *Green Chem.* 14 (2012) 917–920, doi:<http://dx.doi.org/10.1039/C2GC16451E>.
- [19] M. Zheng, Z. Xie, D. Qu, D. Li, P. Du, X. Jing, Z. Sun, On-off-on fluorescent carbon dot nanosensor for recognition of chromium(VI) and ascorbic acid based on the inner filter effect, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 24 (2013) 13242–13247, doi:<http://dx.doi.org/10.1021/am4042355>.
- [20] Y. Hou, Q. Lu, J. Deng, H. Li, Y. Zhang, One-pot electrochemical synthesis of functionalized fluorescent carbon dots and their selective sensing for mercury

- ion, *Anal. Chim. Acta* 866 (2015) 69–74, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.039>.
- [21] S. Zhu, Q. Meng, L. Wang, J. Zhang, Y. Song, H. Jin, K. Zhang, H. Sun, H. Wang, B. Yang, Highly photoluminescent carbon dots for multicolor patterning, sensors, and bioimaging, *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (2013) 3953–3957, doi:<http://dx.doi.org/10.1002/anie.201300519>.
- [22] H. Sun, L. Wu, W. Wei, X. Qu, Recent advances in graphene quantum dots for sensing, *Mater. Today* 16 (2013) 433–442, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.mattod.2013.10.020>.
- [23] J. Jana, S.S. Gauri, M. Ganguly, S. Dey, S. Pal, Silver nanoparticle anchored carbon dots for improved sensing, catalytic and intriguing antimicrobial activity, *Dalton Trans.* 44 (2015) 20692–20707, doi:<http://dx.doi.org/10.1039/C5DT03858H>.
- [24] X. Gao, C. Du, Z. Zhuang, W. Chen, Carbon quantum dot-based nanoprobes for metal ion detection, *J. Mater. Chem. C* 4 (2016) 6927–6945, doi:<http://dx.doi.org/10.1039/C6TC02055K>.
- [25] R. Jelinek, *Carbon Quantum Dots Synthesis, Properties and Applications*, first ed., Springer International Publishing, Israel, 2017.
- [26] J.B. Dimaa, C. Sequeiros, N.E. Zaritzkya, Hexavalent chromium removal in contaminated water using reticulated chitosan micro/nanoparticles from seafood processing wastes, *Chemosphere* 141 (2015) 100–111, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.030>.
- [27] World Health Organization, *Guidelines for Drinking-water Quality Recommendations*, fourth ed., World Health Organization, Switzerland, 2011.
- [28] Y. Liu, J. Hu, Y. Li, H.P. Wei, X.S. Li, X.H. Zhang, S.M. Chen, X.Q. Chen, Synthesis of polyethyleneimine capped carbon dots for preconcentration and slurry sampling analysis of trace chromium in environmental water samples, *Talanta* 134 (2015) 16–23, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.001>.
- [29] R. Vaz, K.O. Vieira, C.E. Machado, J.L. Ferrari, M.A. Schiavon, Preparation of carbon dots and their optical characterization: an experiment of nanoscience for undergraduate course, *Quim. Nova* 38 (2015) 1366–1373, doi:<http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150150>.
- [30] S.R.L. Ellison, V.J. Barwick, T.J.D. Farrant, *Practical Statistics for the Analytical Scientist: A Bench Guide*, second ed., RSC Publishing, Cambridge, 2009.
- [31] N. Panichev, K. Mandiwana, G. Foukaridis, Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of Cr(VI) in soil after leaching of Cr(VI) species with carbon dioxide, *Anal. Chim. Acta* 491 (2003) 81–89, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00800-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00800-6).
- [32] X. Li, S. Zhang, S.A. Kulinich, Y. Liu, H. Zeng, Engineering surface states of carbon dots to achieve controllable luminescence for solid-luminescent composites and sensitive Be<sup>2+</sup> detection, *Sci. Rep.* 4 (2014) 4976–4984, doi:<http://dx.doi.org/10.1038/srep04976>.
- [33] Y. Dong, J. Shao, C. Chen, H. Li, R. Wang, Y. Chi, X. Lin, G. Chen, Blue luminescent graphene quantum dots and graphene oxide prepared by tuning the carbonization degree of citric acid, *Carbon* 50 (2012) 4738–4743, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2012.06.002>.
- [34] S. Sahu, B. Behera, T.K. Maitib, S. Mohapatra, Simple one-step synthesis of highly luminescent carbon dots from orange juice: application as excellent bio-imaging agents, *Chem. Commun.* 48 (2012) 8835–8837, doi:<http://dx.doi.org/10.1039/C2CC33796G>.
- [35] Y. Zhuo, H. Miao, D. Zhong, S. Zhu, X. Yang, One-step synthesis of high quantum-yield and excitation-independent emission carbon dots for cell imaging, *Mater. Lett.* 139 (2015) 197–200, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2014.10.048>.
- [36] Y.W. Zeng, D.K. Ma, W. Wang, J.J. Chen, L. Zhou, Y.Z. Zheng, K. Yu, S.M. Huang, N. S co-doped carbon dots with orange luminescence synthesized through polymerization and carbonization reaction of amino acids, *Appl. Surf. Sci.* 342 (2015) 136–143, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.03.029>.
- [37] Z. Salam, E. Vijayakumar, A. Subramania, N. Sivasankar, S. Mallick, Graphene quantum dots decorated electrospun TiO<sub>2</sub> nanofibers as an effective photoanode for dye sensitized solar cells, *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* 143 (2015) 250–259, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.solmat.2015.07.001>.
- [38] D.L. Pavia, G.M. Lampman, G.S. Kriz, J.R. Vyvyan, *Introduction to Spectroscopy*, third ed., Thomson Learning, Canada, 2010.
- [39] Y. Chen, Y. Dong, H. Wu, C. Chen, Y. Chi, G. Chen, Electrochemiluminescence sensor for hexavalent chromium based on the graphene quantum dots/peroxodisulfate system, *Electrochim. Acta* 151 (2015) 552–557, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2014.11.068>.
- [40] S. Huang, H. Qiu, F. Zhu, S. Lu, Q. Xiao, Graphene quantum dots as on-off-on fluorescent probes for chromium(VI) and ascorbic acid, *Microchim. Acta* 182 (2015) 1723–1731, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s00604-015-1508-6>.
- [41] M.D.A. Dantas, H.A. Tenório, T.I.B. Lopes, H.J.V. Pereira, A.J. Marsaioli, I.M. Figueiredo, J.C.C. Santos, Interactions of tetracyclines with ovalbumin, the main allergen protein from egg white: spectroscopic and electrophoretic studies, *Int. J. Biol. Macromol.* 102 (2017) 505–514, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.052>.
- [42] Y.L. Gu, M.X. Yin, H.M. Zhang, Y.Q. Wang, J.H. Shi, Study on the binding interaction of chromium(VI) with humic acid using UV-vis, fluorescence spectroscopy and molecular modeling, *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* 136 (2015) 1702–1709, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2014.10.069>.
- [43] G. Zhang, Y. Ma, L. Wang, Y. Zhang, J. Zhou, Multispectroscopic studies on the interaction of maltol, a food additive, with bovine serum albumin, *Food Chem.* 133 (2012) 264–270, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.014>.
- [44] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, third ed., Springer, Baltimore, 2006.
- [45] K.A.N. Upamali, L.A. Estrada, D.C. Neckers, Selective detection of Cr(VI) in aqueous media by carbazole-based fluorescent organic microcrystals, *Anal. Methods* 3 (2011) 2469–2471, doi:<http://dx.doi.org/10.1039/C1AY05255A>.
- [46] A.K.B. Ahmed, P. Ahalya, M. Sengan, R. Kamlekar, A. Veerappan, Synthesis and characterization of zinc sulfide quantum dots and their interaction with snake gourd (*Trichosanthes anguina*) seed lectin, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 151 (2015) 739–745, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2015.07.035>.
- [47] S. Huang, H. Qiu, S. Lu, F. Zhu, Q. Xiao, Study on the molecular interaction of graphene quantum dots with human serum albumin: combined spectroscopic and electrochemical approaches, *J. Hazard. Mater.* 285 (2015) 18–26, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.11.019>.
- [48] Environmental Protection Agency, National Primary Drinking Water Regulations, EPA 816-F-09-004, Environmental Protection Agency, USA, 2009.
- [49] Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolution N° 357/05. Determining the classification of fresh water, brackish and saline water of the National Territory, Brazil, 2005.

**39<sup>a</sup>** Reunião Anual  
Sociedade Brasileira de Química

**SBQ** Sociedade Brasileira de Química

# CRIAR E EMPREENDER

de 30 de maio a 2 de junho de 2016  
Centro de Convenções de Goiânia, GO

Goiânia, 30 de maio a 02 de junho de 2016

## ATESTADO

Atestamos que o trabalho "Carbon dots (CDs) as a fluorescent nano-sensor for chromium (VI) determination in water and soil samples", autoria de Lima Júnior, J. G. F.; Lima, E. D. S.; Vaz, R.; Schiavon, M. A.; Santos, J. C. C. foi apresentado na forma de pôster durante a 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

Goiânia, 02 de junho de 2016.

---

**Adriano D. Andricopulo**  
Presidente da SBQ

---

**Rossimiriam P. de Freitas**  
Tesoureira da SBQ

# Capítulo II

*Aplicação de pontos quânticos (quantum dots) de ZnS como sondas fluorescentes para determinação de timerosal em amostras de vacinas*



## Resumo

Este trabalho trata da aplicação de pontos quânticos (*quantum dots*, QDs) de ZnS como sondas fluorescentes para determinação de timerosal em amostras de vacinas. Os QDs foram sintetizados a partir de solução de sulfeto de sódio com acetado de zinco usando como agente ligante de superfície a *N*-acetil-cisteína. O nanomaterial sintetizado apresentou  $\lambda_{\text{ex}} = 290$  nm e  $\lambda_{\text{em}} = 440$  nm. Empregando a técnica de dispersão de luz dinâmica (DLS) se estimou o diâmetro médio em solução do material sintetizado em 4,89 nm. Após obtenção e caracterização do nanomaterial, foi realizada a otimização dos parâmetros analíticos, onde observou-se que em pH 7, utilizando tampão ácido cítrico/fosfato, foi obtida a melhor resposta para interação do QDs de ZnS com timerosal. Os QDs apresentaram fotoestabilidade e a cinética de interação com timerosal foi imediata. Na avaliação do mecanismo de *quenching* se observou que, com aumento da temperatura, ocorreu diminuição os valores de  $K_{\text{sv}}$  e  $K_{\text{b}}$ , indicando que o mecanismo preferencial de *quenching* é estático e que a diminuição da fluorescência ocorre por um processo de transferência de energia. Com base nos parâmetros termodinâmicos, a interação do QDs de ZnS com timerosal é um processo espontâneo, exotérmico e que o valor negativo da entropia pode ser resultado do acúmulo de timerosal na superfície dos QDs. O método proposto apresentou faixa linear de 10 a 90  $\mu\text{g L}^{-1}$  com LOD de 4,59  $\mu\text{g L}^{-1}$  e RSD de 1,50 e 3,15% para as concentrações de 10 e 90  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Assim, o método proposto apresenta a vantagem de realizar a determinação direta de timerosal e ao realizar o ensaio de recuperação nas amostras de vacina a recuperação variou de 79,2 a 104,5%, indicando a exatidão do método e ao comparar o resultado obtido pelo método proposto com AFS ao aplicar o teste *t student*, pode-se afirmar que não existe diferença significativa entre os dois métodos no limite de confiança de 90 %.

**Palavras-chave:** *Quantum Dots*. ZnS. Timerosal. Vacina. Fluorescência e *quenching*.

### Abstract

This work aims the application of quantum dots of ZnS as fluorescent probes for the determination of thimerosal in vaccine samples. The quantum dots were synthesized from sodium sulfide solution ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ) with zinc acetate ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ) using *N*-acetylcysteine as the binding agent. The synthesized quantum dots showed  $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$  and using the technique dynamic light scattering (DLS) the mean size of the synthesized material was determined as 4.89 nm. After the nanomaterial synthesis and characterization, the optimization of analytical parameters was performed. For the pH and buffer system evaluation, it was observed that the best response for the interaction of ZnS QDs with Thimerosal was achieved at pH 7 using citric acid / phosphate buffer. The quantum dots presented fluorescence stability after 10 min, but interaction with thimerosal showed immediate fluorescent stability. In the evaluation of the quenching mechanism, it was observed that with increasing temperature the values of  $K_{\text{sv}}$  and  $K_{\text{b}}$  decreased, a result that shows that the mechanism of quenching is static and that the decrease of fluorescence occurs by a process of energy transfer. Based on the thermodynamic parameters, it was obtained that the interaction of ZnS QDs with thimerosal is a spontaneous, exothermic process and that the negative entropy might result from the accumulation of thimerosal on the surface of the QDs. The proposed method has the advantage of performing the direct determination of thimerosal and the recovery assay using vaccine samples showed recovery from 79.2 to 104.5%, indicating the accuracy of the method. Comparing the obtained results by the proposed method with AFS when applying the student t test, it can be observed that there is no significant difference between the two methods for a 90% confidence interval.

**Keywords:** Quantum dots - ZnS; Thimerosal; Vaccines, Fluorescence and Quenching.



## 1. Introdução

Semicondutores nanocristalinos coloidais, também denominados pontos quânticos ou *quantum dots* (QDs), são descritos como sendo nanopartículas em suspensão, com diâmetros que variam de 2 a 20 nm, de vários materiais semicondutores e que apresentam efeito de confinamento quântico (SAMANTA et al., 2013; VALE et al., 2014). Este efeito está relacionado com o confinamento nas três dimensões do espaço dos sistemas portadores de carga (elétrons e defeitos), fazendo com que suas propriedades físico-químicas sejam dependentes do tamanho dos nanocristais (VALE et al., 2014).

Em função do rápido desenvolvimento da nanotecnologia, existiu um grande avanço em relação aos QDs, visto que este tipo de nanomaterial caracteriza-se por sua versatilidade e aplicações estratégicas em diferentes áreas do conhecimento (ZHONG et al., 2012). As diferentes formas quanto a constituição dos QDs (CdTe, CdSe, CdS, ZnS, entre outros), variação do tamanho das partículas, alterações e funcionalização na superfície, incluindo moléculas pequenas, proteínas, DNA, outros QDs (sistema caroço-casca (*core-shell*), entre outras, influenciam diretamente nas propriedades ópticas, seletividade e sensibilidade deste nanomaterial como sonda fluorescente visando a determinação de diferentes espécies em solução (LI et al., 2009).

Dentre os materiais utilizados para produção de pontos quânticos, o ZnS tem se sobressaído por possuir baixa toxicidade em relação ao Cd, por exemplo (YAO et al., 2012). Além disso, quando comparados aos pontos quânticos do tipo *core-shell*, como o CdSe/ZnS, nanopartículas de ZnS podem ser sintetizadas de maneira simples e direta em sistema aquoso. Isto acarreta em um processo de menor custo e menor geração de resíduos para o meio ambiente.

Com estas características, vários trabalhos têm reportado o potencial do semicondutor ZnS em função de suas aplicações como sonda fluorescente para desenvolvimento de metodologias analíticas, como exemplo, pode-se citar os trabalhos desenvolvidos por Duan et al. (2011)(DUAN et al., 2011), que aplicou o QDs de ZnS para quantificação de Hg(II), Safitri et al. (2017) (SAFITRI et al., 2017) aplicou nanopartículas de ZnS para quantificar ureia, enquanto Mobarraz et al. (2012) utilizou para determinar aminoácidos.

Como discutido por Duan et al. 2011 o mercúrio é um poluente perigoso bem conhecido em todo o mundo, por este motivo, sempre vem sendo motivo de estudos para desenvolvimento de novas metodologias. Logo, a detecção rápida, econômica, sensível e seletiva para Hg(II) no ambiente é extremamente importante. Até o momento, diferentes

técnicas analíticas, incluindo espectroscopia de absorção atômica (MAZZEO et al., 2005), espectrometria de fluorescência atômica em vapor frio (HONG-JING et al., 2009), e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (MORETON; DELVES, 1998) foram desenvolvidas para detectar Hg(II).

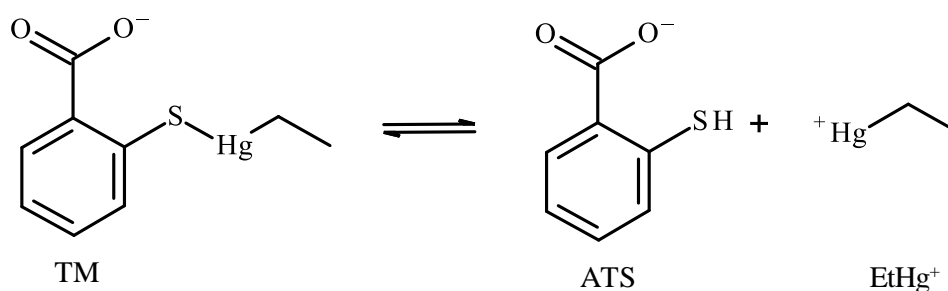
Nas últimas década vários trabalhos vêm utilizando diversos tipos de pontos quânticos para determinação do íons Hg(II), pois essas nanopartículas coloidais fluorescentes dispersas de forma estável em uma solução aquosa são frequentemente encapsuladas e protegidas pelo grupo funcional tiol (KE et al., 2014).

Estudos prévios relataram que íons metálicos, como Hg(II) poderiam interagir com nanopartículas coloidais ou corantes fluorescentes por meio de ligações coordenadas, como ligações do enxofre ao metal, que conseqüentemente resultam na extinção de intensidade fluorescente devido à transferência de elétrons, além da possibilidade de agregação das nanopartículas (KE et al., 2014; YAO et al., 2012).

A exposição humana ao mercúrio ocorre principalmente através de três formas: (a) o mercúrio elementar liberado de amálgamas dentárias, (b) a ingestão de metilmercúrio presente em alimentos contaminados, e (c) incorporação direta de timerosal contida nas vacinas (YEPPSEN et al., 2015).

O timerosal (etilmercúriotiossalicato de sódio, Figura 1) contém 49,6% de mercúrio, e tem sido empregado como conservante de vacinas desde a década de 1930. Além disso, o timerosal tem sido amplamente utilizado como agente antimicrobiano numa variedade de produtos, incluindo soluções antissépticas tópicas, cosméticos, produtos de limpeza para lentes de contato e outros produtos biológicos injetáveis (ACOSTA et al., 2015; GEIER et al., 2016).

**Figura 1.** Estrutura química do timerosal (TM) e seus respectivos produtos de degradação: ácido tiosalicílico (ATS) e etil-mercúrio (EtHg<sup>+</sup>).



Fonte: (SANTOS et al., 2018)

As vacinas contra hepatite B, vírus H1N1 e a tríplice viral, são alguns exemplos do uso deste conservante em que a concentração de timerosal declarada é da ordem de 25 µg Hg por 0,5 mL (GEIER et al., 2016). O uso de timerosal em vacinas e produtos farmacêuticos é controverso, pois como etilmercúrio é altamente tóxico e pode causar distúrbios neurológicos graves (DÓREA; FARINA; ROCHA, 2013; MIRANDA-ANDRADES et al., 2017). Além disto, o uso extensivo de timerosal também levanta preocupações ambientais devido ao descarte de vacinas e medicamentos expirados, também devido a águas residuais contaminadas com mercúrio de indústrias farmacêuticas (MIRANDA-ANDRADES et al., 2017).

Diante da aplicação do timerosal em produtos que estão em contato direto com os seres humanos, e dos possíveis riscos que podem gerar a saúde, esse composto vem recebendo uma atenção especial, tanto em relação aos riscos devidos sua utilização quanto para o desenvolvimento de novas metodologias. Atualmente, a determinação do timerosal é realizada de três formas (I) degradação de TM e quantificação por técnicas baseadas na formação de vapor frio; (II) determinação direta de TM por ICP OES ou ICP MS e (III) determinação direta de TM por HPLC e eletroforese, no entanto, essas são onerosas e com elevados custo e/ou envolvem muitas etapas no preparo de amostras

Tendo em vista a importância do desenvolvimento de uma metodologia para quantificar que seja capaz de realizar a determinação direta de timerosal, sem previa degradação do timerosal ou procedimentos de preparo da amostra laboriosos, este trabalho visa o desenvolvimento de uma metodologia aplicando *quantum dots* de ZnS como sonda fluorescente para realizar a determinação de timerosal em vacinas.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar pontos quânticos (*quantum dots*) de ZnS e aplicar para determinação direta de timerosal em amostras de vacinas.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar os pontos quânticos de ZnS com o procedimento estabelecido na literatura;
- Avaliar a influência do tampão na interação do QDs com timerosal, avaliando o tipo do tampão, concentração do tampão e força iônica;
- Avaliar a melhor concentração dos *quantum dots* para a quantificação do timerosal;
- Realizar o estudo cinético da reação do QDs com timerosal e a estabilidade fotoluminescente do QDs;
- Determinar os parâmetros ligantes e termodinâmicos da interação do QDs com timerosal;
- Calcular as figuras de mérito do método proposto;
- Realizar o ensaio de recuperação do timerosal em amostras de vacinas comercializadas nos postos de saúde da cidade de Maceió-AL;
- Determinar a concentração de timerosal nas amostras de vacinas por espectrometria de fluorescência atômica (AFS) e pelo método proposto e realizar a comparação dos resultados obtidos aplicando testes estatísticos;

### 3. Experimental

#### 3.1 Reagentes e soluções

Para todos os experimentos se empregou reagentes de grau e pureza analítica. Os reagentes utilizados na síntese dos QDs foram *N*-acetil-cisteína (Sigma, C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>S), acetato de zinco (Merck, (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn.2H<sub>2</sub>O) e sulfeto de sódio (Vetec, Na<sub>2</sub>S.9H<sub>2</sub>O). Solução estoque 1000 µg L<sup>-1</sup> de timerosal foi utilizada para preparar as soluções de trabalho por diluições adequadas. Solução tampão Britton-Robinson para faixa de pH 2-10 consistiu na mistura de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Merck), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma) e ácido acético (Sigma), todos a 0,04 mol L<sup>-1</sup>, sendo o pH ajustado com NaOH ou HCl 1 mol L<sup>-1</sup>. Os tampões Tris (Vetec), HEPES (Sigma) e PIPES (Sigma) foram utilizados na avaliação dos diferentes sistemas tampão.

#### 3.2 Síntese do *quantum dot* de ZnS

Para síntese do *quantum dot* de ZnS (QDs - ZnS) seguiu o procedimento descrito por Duan et al. (2011) com modificações, onde foram adicionados em um erlenmeyer de 250 mL 0,0652 g de *N*-acetil-cisteína, 1 mL de Zn(Ac)<sub>2</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>, 40 mL de H<sub>2</sub>O e pH foi ajustado para 10,5 com uma solução de NaOH 2 mol L<sup>-1</sup>. Em seguida, foi adicionado 1 mL da solução de Na<sub>2</sub>S.9H<sub>2</sub>O 0,1 mol L<sup>-1</sup> e o sistema ficou sobre agitação durante 20 min a temperatura ambiente. Após este tempo, a solução foi aquecida a 90 °C por 2 h. Decorridas as 2 h, restou aproximadamente 5 mL da solução inicial, e a mesma quantidade de etanol absoluto (5° C) foi adicionado para a precipitação dos QD-ZnS. O material foi centrifugado durante 15 min (4000 rpm), e o sobrenadante foi descartado. Este processo foi repetido três vezes para eliminar a presença dos reagentes de partida. Por fim, o QD-ZnS foi redissolvido em 50 mL de H<sub>2</sub>O.

#### 3.3 Caracterização do QD-ZnS

Para realização das medidas espectrofotométricas, foi utilizado um espectrofotômetro de varredura com feixe duplo Micronal (modelo AJX-6100PC, Brasil) equipado com cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. Para realização das medidas espectrofotométricas, foi utilizado espectrofluorímetro Shimadzu RF (modelo 5301PC, Japão) equipado com lâmpada de xenônio de 150 W de potência e com cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. A determinação do tamanho das nanopartículas foi realizado por Dispersão de luz dinâmica (DLS, *Dynamic Light Scattering*) para realizar a medidas, foi utilizado Zetatrac da Microtrac (modelo NPA 151-31A-0000-D30-

10M, USA). A determinação da composição do nanomaterial foi feita a partir de espectrômetro de fluorescência de raios X por energia dispersiva (Shimadzu, modelo EDX 700). Para realizar a digestão das amostras de vacina foi utilizado um microondas (Milestone, modelo: Ethos One).

A quantificação da concentração de mercúrio, após a digestão das amostras de vacinas, foi realizada utilizando um espectrofotômetro de fluorescência atômica (PSA Analytical, modelo: Millennium Merlin 10.025).

### 3.4 Determinação de timerosal empregando QDs - ZnS

No procedimento padrão para determinação do timerosal (TM), 125  $\mu\text{L}$  do QD-ZnS 200  $\mu\text{L}$  do tampão fosfato/ácido cítrico (pH 7) foram misturados com volumes crescentes da solução estoque do analito perfazendo concentrações final de timerosal na faixa de 10 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Em seguida, adicionou-se água até volume final de 2,5 mL e realizou-se as medições espectrofluorimétricas ( $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$ ). A intensidade de fluorescência máxima obtida em 440 nm foi utilizada para a quantificação de timerosal. Para otimização dos parâmetros analíticos utilizou-se a sensibilidade (*slope*) em função da equação:

$$\left[ \frac{I_0 - I_f}{I_0} \right] = aC_{TM} + b \quad \text{Equação (1)}$$

onde  $I_0$  e  $I_f$  correspondem a intensidade de fluorescência inicial dos QD-ZnS e após adição do TM, respectivamente, e  $C_{TM}$  é a concentração de timerosal ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). A sensibilidade analítica e o coeficiente linear são representados por  $a$  e  $b$ , respectivamente. Todas as curvas analíticas apresentaram um mínimo de cinco pontos com medidas em triplicata ( $n = 3$ ).

As figuras de mérito do método proposto foram determinadas conforme procedimentos já estabelecidos (ELLISON SRL, BARWICK VB, 2009). Os parâmetros avaliados foram LOD (limite de detecção), LOQ (limite de quantificação) e RSD (desvio padrão relativo), com dois pontos da curva preparados e medidos dez vezes ( $n = 10$ ). Os cálculos relativos aos limites de detecção ( $3\sigma$ ) e de quantificação ( $10\sigma$ ) foram realizados de acordo com as seguintes equações,

$$LOD = \frac{3sb}{a_c} + C_{branco} \quad \text{Equação (2)}$$

$$LOQ = \frac{10 sb}{a_c} + C_{branco} \quad \text{Equação (3)}$$

Onde  $C_{branco}$  corresponde a concentração relativa ao sinal do branco,  $sb$  equivale ao desvio padrão do branco analítico ( $n = 10$ ), enquanto  $a_c$  corresponde ao coeficiente angular da curva analítica. O desvio padrão relativo (RSD) foi calculado de acordo com a equação:

$$RSD = \frac{sp}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

Onde  $sp$  equivale ao desvio padrão referente a um determinado padrão analítico dentro da faixa linear e  $\bar{x}$  corresponde ao valor médio encontrado para este padrão ( $n = 10$ ).

### 3.5 Preparo das amostras de vacina

#### 3.5.1 Preparo das amostras de vacina para determinação de timerosal pelo método proposto.

Após otimização analítica o método proposto foi utilizado para a quantificação de timerosal em quatro amostras de vacinas (Tríplice, Hepatite B, Difteria e Tétano e Antitetânica e contra coqueluche) adquiridas em posto de saúde da cidade de Maceió-AL.

O método proposto foi aplicado sem realizar nenhum tratamento de degradação ou mineração dos constituintes da amostra, como tratamento da amostra foi realizado uma diluição de 4000 (quatro mil) vezes nas amostras de vacina para que a concentração informada na bula da vacina (1,0 mL da vacina pode conter até 0,1 mg de timerosal, ou seja,  $100.000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) fosse adequada a faixa de trabalho do método ( $10 - 90 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

#### 3.5.2 Preparo das amostras de vacina para determinação de mercúrio por espectrometria de fluorescência atômica.

Para realizar a determinação da concentração de timerosal nas amostras de vacina por espectrometria de fluorescência atômica foi necessário realizar a digestão das amostras, seguindo o procedimento, para cada um dos frascos de digestão, transferiu-se 500  $\mu\text{L}$  de amostra de vacina, adicionou-se 6,0 mL de  $\text{HNO}_3$ , 2,0 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 3,0 mL de água deionizada. Os frascos de digestão foram então devidamente fechados, inseridos na cavidade do microondas e o programa de digestão que foi aplicado que está apresentado na Tabela 1 (ARAÚJO et al., 2002).

**Tabela 1.** Programa aplicado para digestão das amostras de vacina em sistema fechado e radiação microondas.

<b>Etapa</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Potência (W)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
I	15	500	T.A. a 130
II	20	500	130
III	15	1000	130 a 180
IV	20	1000	180

T.A. – Temperatura ambiente.

Fonte: Autor, 2018.

Após a realização das etapas mencionadas na Tabela 1, os frascos foram mantidos sob ventilação por 30 min para resfriamento. O volume dos digeridos foram completados para 25,0 mL.

No espectrofotômetro de fluorescência atômica foi utilizado solução carreadora  $\text{HNO}_3$  5% (v/v), solução redutora  $\text{SnCl}_2$  0,088 mol/L. O equipamento espectrômetro de fluorescência atômica com geração de vapor frio (CV- AFS), com sistema PSA, modelo 10. 025 (Millennium Merlin Instrument, Orpington, Kent, UK) com fonte de radiação específica para o Hg, com comprimento de onda 253,7 nm. O argônio foi empregado como gás de arraste (carregador) e o ar sintético como gás de secagem. A razão entre as vazões da solução redutora, solução carreadora e amostra é 1:2:2. O modo de medição do sinal analítica é altura do pico, tempo de delay 15 s, tempo de análise 40 s e tempo de memória 60 s. A vazão do gás carregador (argônio) 250 mL/ min, a vazão do gás de secagem (ar sintético) 2,5 mL/ min. A vazão da solução carreadora (ácido) 9 mL/min, a vazão da amostra 9 mL/min e vazão da solução redutora (cloreto estanhoso) 4,5 mL/min.



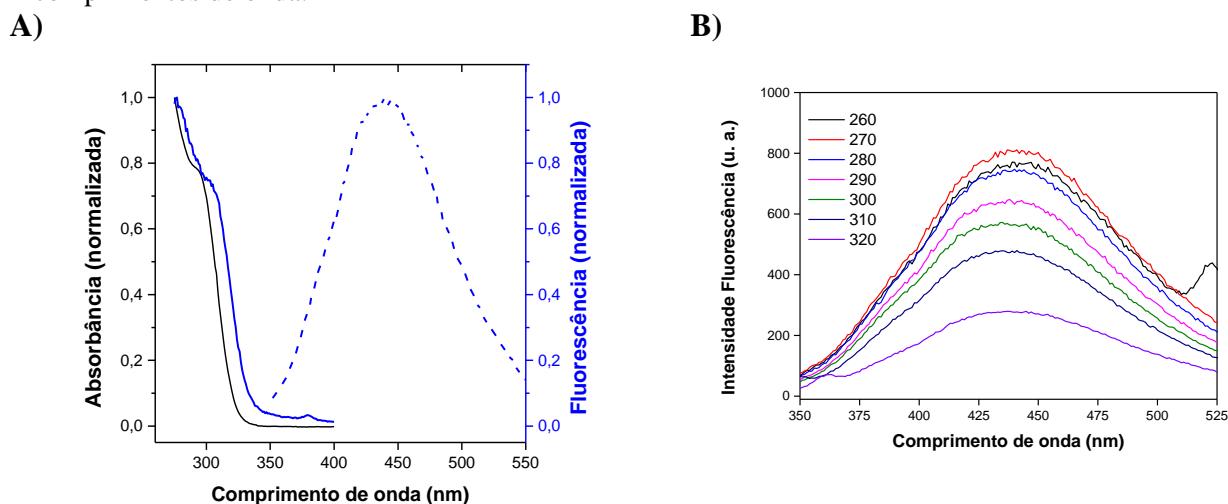
## 4. Resultados e Discussões

### 4.1 Caracterização dos *Quantum Dots* - ZnS

#### 4.1.1 Características de absorção e fluorescência dos QDs – ZnS

Os QD-ZnS sintetizados foram inicialmente caracterizados por espectros de absorção no UV-vis e espectros de emissão e excitação no fluorescente (Figura 2), onde o pico de absorção foi localizado em 290 nm, o que se encontra em conformidade com o trabalho de Duan et al. (2011)(DUAN et al., 2011), no entanto, para o mesmo material preparado (ZnS), o pico de absorção pode sofrer alteração, a qual ocorrerá principalmente devido a diferença do tamanho *quantum dots* sintetizado (ZHUANG et al., 2003). A intensidade de fluorescência máxima obtida foi em 440 nm (Figura 2), este valor foi utilizado para a quantificação de timerosal.

**Figura 2.** (A) Espectro normalizado referente a absorção no UV-vis e emissão e excitação de fluorescência do QD-ZnS e (B) Espectro de fluorescência do QDs de ZnS excitado em diferentes comprimentos de onda.



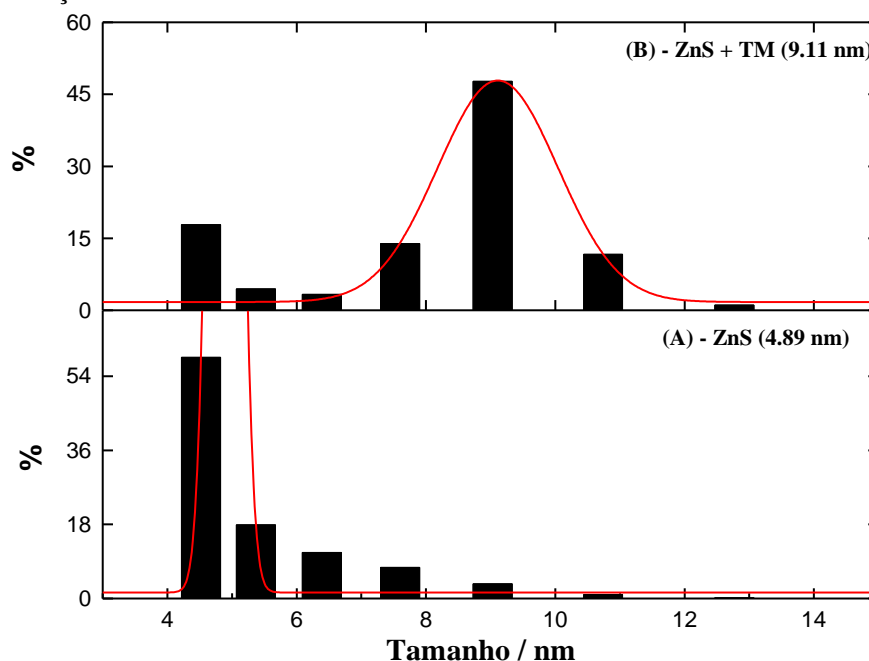
Fonte: Autor, 2018.

#### 4.1.2 Dispersão de luz dinâmica (DLS) e Espectrômetro de fluorescência de raios X por Energia Dispersiva (EDX)

A Figura 3 mostra o resultado obtido por DLS para determinar a distribuição do tamanho da nanopartícula em solução, na Figura 3 (A), o valor médio das nanopartículas em suspensão foi de 4,89 nm. Para o mesmo procedimento para obtenção do QDs de ZnS (DUAN et al., 2011), encontrou-se um valor médio em torno de 3,0 nm, essa diferença pode ser justificada devido as alterações no processo de síntese, como o ajuste da temperatura, que pode influenciar no tamanho das nanopartículas.

Na Figura 3A também é observado que na síntese do QD-Zn foi obtido material com tamanho de nanopartícula maiores que 4,89 nm, sendo que em menor proporção, segundo Rezaei et al. (2017) (REZAEI et al., 2017)(REZAEI et al., 2017)(REZAEI et al., 2017) quanto mais uniforme os tamanhos de partículas obtidos na síntese, mais estreito será espectro de emissão de fluorescência, isso justifica o espectro (Figura 2) apresentar um pico alargado.

**Figura 3.** Tamanho das nanopartículas sintetizadas. (A) *Quantum dot* de ZnS, (B) *Quantum dot* ZnS na presença de timerosal.



Fonte: Autor, 2018.

Na Figura 3B é observado que após adição do timerosal ao QD-ZnS o tamanho médio das partículas no sistema aumentou para 9,11 nm, isso mostra que está ocorrendo uma interação dos QDs com timerosal, levando a um aumento na distribuição do tamanho das partículas e por consequência, ocorre a mudança das propriedades do material sintetizado, como a diminuição da intensidade de fluorescência.

A Tabela 2 apresenta o resultado obtido na caracterização do material sintetizado por EDX, onde verifica-se que 97,5% do material está constituído por zinco (Zn) e enxofre (S). A presença de Si pode ser explicada pelo fato de utilizamos erlenmeyer de vidro para realizar a síntese em pH 10,5 durante 2 horas a 90 °C e com isso pode ocorrer extração de pequena quantidade de Si do vidro para solução.

**Tabela 2.** Análise de EDX das nanopartículas sintetizada de ZnS.

<b>Analito</b>	<b>Resultados (%)</b>
<b>Zn</b>	75,7
<b>S</b>	21,8
<b>Si</b>	1,75
<b>Ca</b>	0,45
<b>Hf</b>	0,16
<b>Cu</b>	0,16

Fonte: Autor, 2018.

## 4.2 Otimização dos parâmetros analíticos

O QD-ZnS produzido em meio aquoso apresenta emissão de fluorescência em 440 nm e na presença de TM essa intensidade de fluorescência é rapidamente diminuída proporcional a quantidade timerosal adicionada ao sistema.

Para explorar de forma eficiente a utilização do QD-ZnS como sonda fluorescente para determinação de timerosal foi necessário a otimização de alguns parâmetros analíticos, os quais são discutidos a seguir.

### 4.2.1 Avaliação do pH

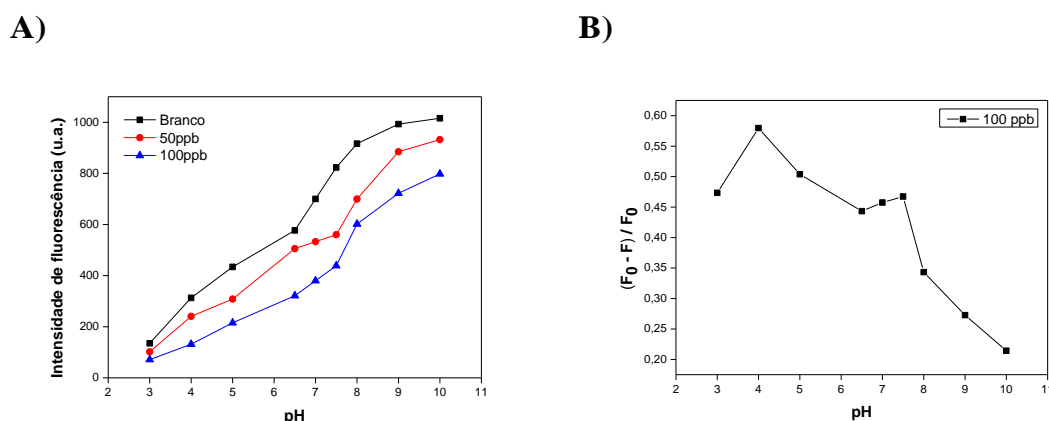
Para a obter a melhor interação do QD-ZnS com timerosal é necessário compreender a influência do pH no meio, visto que o pH pode influenciar na intensidade de fluorescência, no processo de *quenching*, assim como, na distribuição das espécies. Inicialmente, o pH do sistema foi avaliado utilizando o tampão Britton-Robison (pH 2 -10). Na Figura 4 está apresentado o estudo do pH na interação do QDs-ZnS com timerosal, onde a Figura 4A mostra a intensidade de fluorescência *versus* pH e a Figura 4B a relação de  $(F_0 - F) / F_0$  *versus* pH.

Em função do resultado obtido, observa-se na Figura 4A que a intensidade de fluorescência aumenta com o aumento o pH e na Figura 4B observa-se que no intervalo de pH entre 6,5 a 7,5 o sinal fica praticamente constante. Portanto, foi selecionado o pH 7 como o pH de trabalho. Cabe ressaltar que em pH 2 o material não apresentou fluorescência, portanto, este resultado não foi mostrado.

A baixa intensidade de fluorescência no meio ácido pode ser devido à dissociação do complexo do Zn-NAC devido à protonação dos grupos tióis ligados à superfície do QDs (GAO et al., 1998). Com o aumento do pH da solução, a desprotonação do grupo tiol na molécula de NAC poderia fortalecer a ligação

covalente entre o NAC e o átomo de Zn na superfície do QD, resultando no aumento da intensidade de fluorescência (DUAN et al., 2011). Além disto, o próprio ZnS tem sua solubilidade aumentada em menores valores de pH devido ao sulfeto ser derivado de uma ácido fraco, assim, com a redução do pH, ocorre a formação de  $\text{HS}^-$  e  $\text{H}_2\text{S}$ , liberado o zinco livre em solução.

**Figura 4.** Estudo do pH com tampão Britton-Robinson (pH 2-10). (A) Intensidade de fluorescência *versus* pH e (B) Relação de  $(F_0 - F)/F_0$  *versus* pH.



Fonte: Autor, 2018.

Por fim, no pH de trabalho do método proposto (pH 7) não irá influenciar na distribuição das espécies do timerosal, visto que, o mesmo encontra-se majoritariamente desprotonado, pois apresenta  $\text{pK}_a = 3,05$  a  $25^\circ\text{C}$  (WILLIAM SLIKKER, 2001).

#### 4.2.2 Avaliação do sistema tampão

Uma vez realizado o estudo da influência do pH na interação do QD-ZnS com timerosal, e estabelecido como pH de trabalho igual a 7 se avaliou o efeito do tipo do tampão, onde foram selecionados os seguintes sistemas: tampão fosfato, ácido cítrico/fosfato (AC/F), Tris, PIPES e HEPES. A Tabela 3 mostra o resultado obtido na avaliação do sistema tampão, para cada um dos sistemas avaliados utilizando a concentração do tampão de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .

O tampão ácido cítrico/fosfato (AC/F) apresentou maior sensibilidade do que os outros sistemas avaliados (aumento de 21% em relação ao sistema fosfato) e menor sinal do branco, este resultado corrobora com os apresentados por Duan *et al.* 2011 que aplicou *quantum dots* de ZnS para determinação de mercúrio, em seu estudo além de avaliar o

AC/F avaliou os seguintes sistemas  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ ,  $\text{Tris-HCl}$ . Sendo assim, o sistema tampão AC/F pode auxiliar de forma mais efetiva na interação do timerosal com os QD-ZnS em comparação aos outros sistemas avaliados.

**Tabela 3.** Resultado da influência do sistema tampão na interação do QDs - ZnS com timerosal.

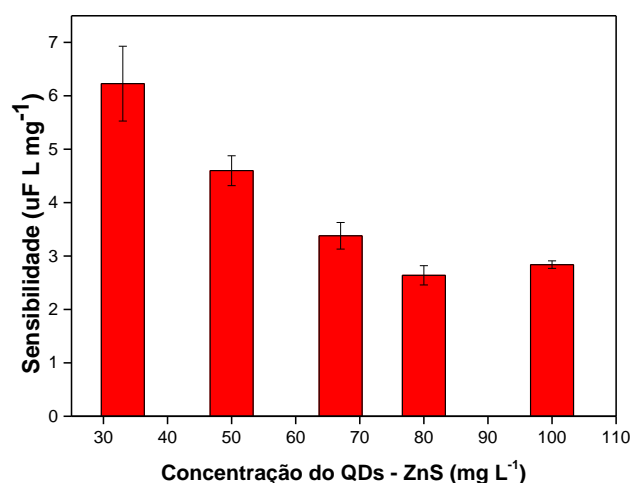
Tipo do tampão	Sinal do branco	Faixa linear $\mu\text{g L}^{-1}$	$(F_0 - F) / F_0 = aC + b$		
			a (x1000)	b (x1000)	r
Fosfato	781	0 - 100	$4,96 \pm 0,60$	53,71	0,9763
Hepes	978	0 - 100	$5,53 \pm 0,30$	12,49	0,9973
Pipes	708	0 - 100	$5,17 \pm 0,60$	47,56	0,9802
AC/F	675	0 - 100	$6,29 \pm 0,50$	46,05	0,9871
Tris	872	0 - 100	$5,26 \pm 0,50$	65,15	0,9662

Fonte: Autor, 2018.

#### 4.2.3 Avaliação da concentração do *quantum dots* no sistema racional

De modo geral, quanto maior a concentração do QDs maior será o sinal de fluorescência, porém, se faz necessário um estudo da concentração do QDs na determinação do timerosal em relação a faixa linear que se pretende trabalhar. Portanto, para uma mesma faixa linear (0 – 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) foi realizado o estudo de seis concentrações do nanomaterial, a Figura 5, mostra o valor da sensibilidade em função da concentração do QDs-ZnS.

**Figura 5.** Sensibilidade em função concentração do QD-ZnS.



Fonte: Autor, 2018.

Com base no resultado mostrado na Figura 5, quando menor a concentração do QDs - ZnS ocorre um aumento na sensibilidade, visto que quanto mais QDs - ZnS maior teria que ser a concentração de timerosal para suprimir o sinal de fluorescência. E também

foi observado que na concentração 33,3 mg L<sup>-1</sup> ocorreu diminuição da faixa linear. Considerando tanto a alta sensibilidade quanto o intervalo da faixa linear, a concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> selecionada para o desenvolvimento do trabalho.

#### 4.2.4 Avaliação da força iônica

Para realizar o estudo da influência da força iônica na interação do QD-Zns com timerosal foram realizados experimentos de interação em diferentes concentrações NaCl. Com base no resultado apresentado na Tabela 4, tomando como parâmetro principal a sensibilidade, nota-se que o ganho médio da sensibilidade foi de 19% com adição de NaCl no meio racional. Como o aumento da sensibilidade não foi muito grande, os demais experimentos foram realizados sem adição de NaCl.

**Tabela 4.** Avaliação da força iônica na interação do QD-ZnS com timerosal.

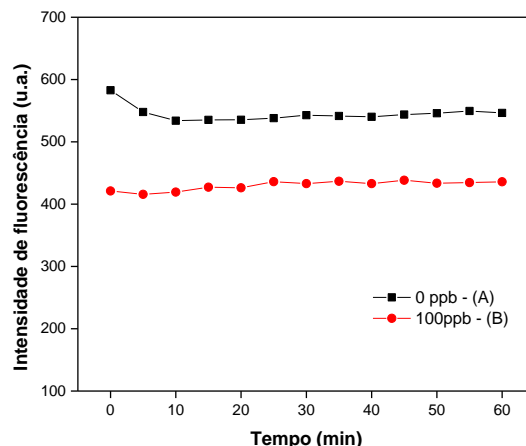
NaCl (mol L <sup>-1</sup> )	Sinal do branco	Faixa linear µg L <sup>-1</sup>	(F <sub>0</sub> -F) / F <sub>0</sub> = aC + b		
			a (x1000)	b (x1000)	r
-	452	0 - 100	2,52 ± 0,30	14,4	0,9825
0,05	449	0 - 100	2,79 ± 0,30	12,4	0,9881
0,1	489	0 - 100	3,23 ± 0,10	3,91	0,9975
0,2	449	0 - 100	3,00 ± 0,40	-28,9	0,9739
0,3	476	0 - 100	3,01 ± 0,10	1,13	0,9985

Fonte: Autor, 2018.

#### 4.2.5 Avaliação da cinética reacional

Após realizar a otimização do sistema foi avaliada estabilidade do QD-ZnS e cinética do processo de *quenching*. A solução de QD-ZnS apresentou um decaimento de fluorescência de 14,32% nos primeiros 10 min, mostrado na Figura 6, no entanto, após esse decaimento, a fluorescência permaneceu constante, mostrando boa estabilidade fotoluminescente. Para cinética de interação entre os QDs - ZnS com timerosal observou-se que a estabilidade do sinal de fluorescência foi imediata Figura 6 (B) para concentração de TM de 100 µg L<sup>-1</sup>.

**Figura 6.** Cinética racional. (A) Estabilidade fotoluminescente do QD-ZnS. (B) cinética da interação do QDs - Zn com timerosal ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ).



Fonte: Autor, 2018.

### 4.3 Estudo da interação do QDs de ZnS com timerosal

#### 4.3.1 Avaliação do tipo de *quenching*

De modo geral existem dois tipos preferenciais de interações, que são denominados de *quenching* estático e dinâmico. O *quenching* dinâmico ocorre a partir das colisões entre as moléculas que fluorescem e provocam a diminuição da fluorescência. Para o *quenching* dinâmico o aumento da temperatura do meio provoca o aumento no número de colisões entre as moléculas (HOSSEINZADEH et al., 2017).

No *quenching* estático, a adsorção, complexação ou ligação da molécula que provoca a diminuição da fluorescência com o fluoróforo, causa o aumento da fluorescência. Para este tipo de interação o aumento da temperatura leva a dissociação da ligação/interação entre o inibidor e fluoróforo, acarretando na diminuição da fluorescência (HOSSEINZADEH et al., 2017).

Portanto, para determinar o tipo de *quenching* preferencial (dinâmico ou estático), a magnitude do processo de interação e os parâmetros termodinâmicos associados a interação entre os QD-ZnS e timerosal, foram realizados experimentos de interação em diferentes temperaturas. A constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) e de ligação ( $K_b$ ) foram calculadas de acordo com as seguintes equações:

$$\frac{I_0}{I_f} = 1 + K_{SV}[TM] \quad \text{Equação (5)}$$

$$\log \left[ \frac{I_0 - I_f}{I_f} \right] = K_b + n \log[TM] \quad \text{Equação (6)}$$

onde  $I_0$  e  $I_f$  são, respectivamente, as intensidades de fluorescência dos QDs de ZnS na ausência e na presença do TM,  $K_{SV}$  é a constante de Stern-Volmer,  $K_b$  é a

constante de ligação,  $n$  o número de sítios de ligação e  $[TM]$  é a concentração molar de timerosal, no intervalo de 0,025 a 0,25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (10 - 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

Com base nos resultados apresentados na Tabela 5 observa-se que ocorreu uma diminuição dos valores de  $K_{sv}$  e  $K_b$  em função do aumento da temperatura, como reportado por Hosseing et al. (2017), esse resultado é um indicativo que o tipo de *quenching* predominante na interação do QD-ZnS com timerosal é estático.

**Tabela 5.** Parâmetros de ligação para o processo de interação do QDs com timerosal.

Temperatura (°C)	Constante Stern-Volmer		Parâmetros de ligação	
	$K_{sv}$ ( $10^4 \text{ L M}^{-1}$ )	r	$K_b$ ( $10^4 \text{ L M}^{-1}$ )	r
22 (295 K)	$1,15 \pm 0,04$	0,9760	$1,66 \pm 0,03$	0,9952
29 (302K)	$0,64 \pm 0,02$	0,9849	$0,41 \pm 0,02$	0,9544
36 (309K)	$0,53 \pm 0,01$	0,9795	$0,14 \pm 0,01$	0,9868

Fonte: Autor, 2018.

Devido à ausência de trabalhos na literatura que utilizaram *quantum dots* para determinação direta de timerosal, será tomado como referência os trabalhos que realizaram a quantificação de mercúrio utilizando diferentes *quantum dots* para tentar explicar o mecanismo de *quenching*.

Em geral, existem dois mecanismos predominantes para explicar o efeito da supressão de fluorescência dos QDs na presença de Hg(II). Por exemplo, Huang et al. (2017) relataram que a extinção de fluorescência de QD-CdS por Hg(II) é devido à formação de partículas de HgS. Devido à menor solubilidade de HgS em comparação com CdS, as partículas de HgS são formadas através do deslocamento de Cd(II) por Hg(II) na superfície dos QDs, levando a um desvio para o vermelho do pico de absorção (DUAN et al., 2011; ZHANG et al., 2011).

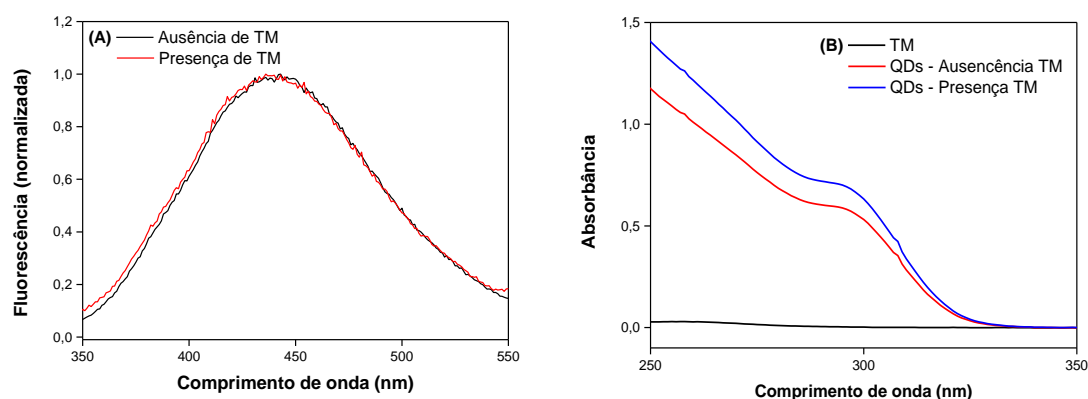
Por outro lado, Chen et al. (2010) demonstraram que Hg(II) extinguiu a fluorescência de QDs através de um processo de transferência de elétrons entre ligantes de superfície e Hg(II) sem deslocamento nos espectros (CHEN et al., 2010; XIA; CAO; ZHU, 2007).

No presente estudo, o mecanismo de *quenching* foi avaliado pela variação do deslocamento espectral dos espectros de fluorescência normalizado e espectro de absorção do UV-vis. Como mostrado na Figura 7A, não ocorre desvio no espectro de fluorescência com a adição de timerosal, e na Figura 7B mostra que também não ocorreu nenhum desvio no pico de absorção do QDs-ZnS com a adição do timerosal, contudo, a



intensidade do sistema na presença do TM foi alterada, indicando que ocorre alteração no estado fundamental.

**Figura 7.** (A) Espectro de fluorescência normalizada (B) Espectro de UV-vis do timerosal e do QDs - ZnS na presença e ausência de timerosal ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ).



Fonte: autor, 2018.

A extinção de fluorescência de QDs de ZnS, sem desvio espectral nas bandas de absorção e de emissão na presença do inibidor, está de acordo com foi discutido por Duan et al. (2011)(DUAN et al., 2011). Portanto, pode-se inferir que o mecanismo de *quenching* da interação do QD-ZnS com timerosal é baseado por transferência de energia.

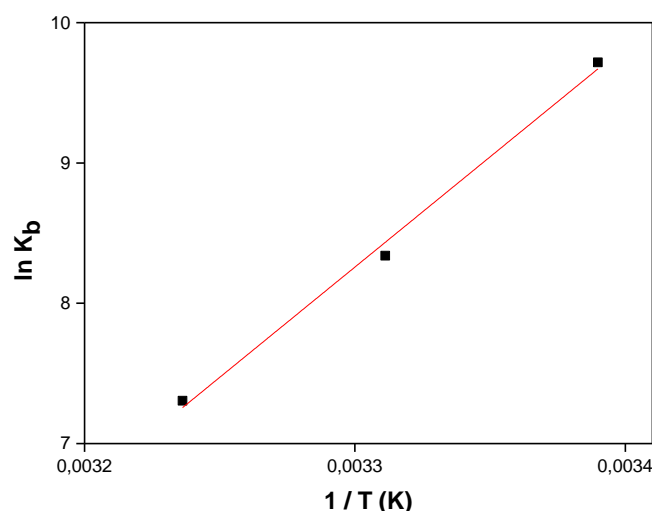
#### 4.3.2 Parâmetros termodinâmicos

Os parâmetros termodinâmicos  $\Delta H$  e  $\Delta S$  relativos ao processo de interação entre QD-ZnS e timerosal foram obtidos a partir da equação de Van't Hoff mostrado na Figura 8 sendo então empregados para se calcular a energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) a partir das equações 7 e 8, respectivamente:

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \left[ \frac{1}{T} \right] + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Equação (7)}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Equação (8)}$$

onde  $K_b$  é a constante de equilíbrio para uma determinada temperatura T e R é a constante universal dos gases (HOSSEINZADEH et al., 2017). Os valores obtidos para os parâmetros termodinâmicos estão apresentados na Tabela 6.

**Figura 8.** Gráfico de Van't Hoff para o processo de interação entre QDs - ZnS e timerosal.

Fonte: autor, 2018.

**Tabela 6.** Parâmetros termodinâmicos para o processo de interação do QDs com timerosal.

Parâmetros de termodinâmicos			
Temperatura (°C)	$\Delta H$ (KJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (KJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ (KJ mol <sup>-1</sup> )
22 (295 K)			-23,7
29 (302K)	- 130	-0,36	-21,1
36 (309K)			-18,6

Fonte: autor, 2018.

Analisando os valores dos parâmetros termodinâmicos apresentando na Tabela 6, para  $\Delta G < 0$ , indica que o processo de interação do QD-ZnS com timerosal é espontâneo.

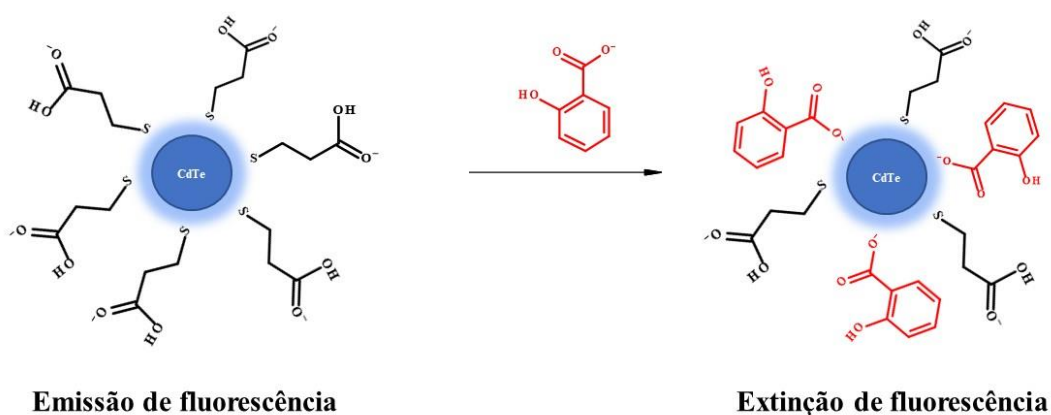
Segundo o que foi apresentado por Hosseinzadeh et al. (2017), que realizou o estudo da interação de *quantum dots* de ZnS com insulina, utilizando diferente ligantes para obter os QD-ZnS, e os resultados de  $\Delta H$  e  $\Delta S$  (Tabela 5), pôde-se considerar que processo de interação do QD-ZnS com timerosal é um processo exotérmico e a entropia negativa pode ser resultado do acúmulo de timerosal na superfície dos QD-ZnS.

Adicionalmente, ao se empregar os estudos baseados na interação entre macromoléculas (proteínas e DNA) e ligantes pequenos este padrão termodinâmico ( $\Delta H < 0$  e  $\Delta S < 0$ ) é característico de interações de Van der Waals e ligações de hidrogênio no sistema (HUANG et al., 2015).

### 4.3.3 Proposta do mecanismo de interação

Após propor o mecanismo de *quenching* e verificar os parâmetros termodinâmicos do processo de interação do QDs - ZnS com timerosal foi proposto um mecanismo de interação. Segundo reportado por Bunkoed & Kanatharana (2015) (BUNKOED; KANATHARANA, 2015) que sintetizaram pontos quânticos de CdTe encapsuladas em ácido mercaptopropiônico (MPA) para determinação de ácido salicílico, o mecanismo de supressão de fluorescência ocorreria devido a substituição na superfície do QDs de CdTe MPA pelo ácido salicílico. Na Figura 9 está mostrado um esquema ilustrativo do mecanismo de supressão de fluorescência do QDs de CdTe pelo ácido salicílico.

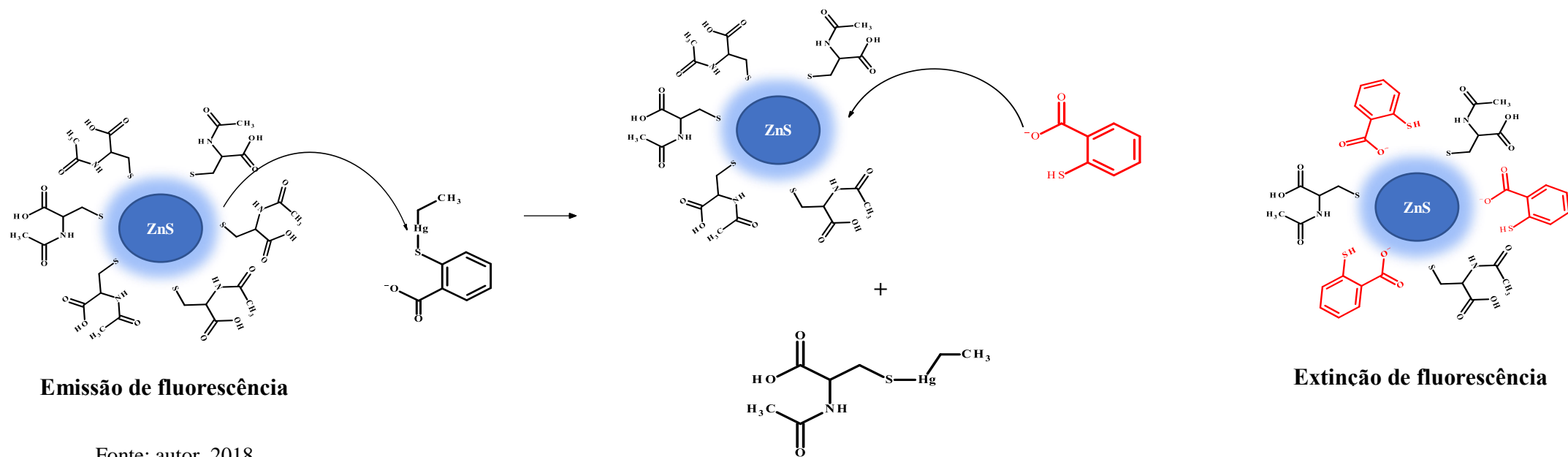
**Figura 9.** Mecanismo de interação do QDs de CdTe para determinação de ácido salicílico, proposto por Bunkoed & Kanatharana (2015).



Fonte: Adaptado de Bunkoed & Kanatharana (2015).

Tomando como base o mecanismo acima e sabendo os precursores do timerosal são o ácido tiosalicílico e etilmercúrio, foi proposto um mecanismo, no qual, timerosal ocorre reação do ligante de superfície do QD, no caso, *N*-acetil-cisteína, e o ácido tiosalicílico liberado, interage com o QDs - ZnS. A Figura 10 mostra um esquema geral de como seria esse mecanismo.

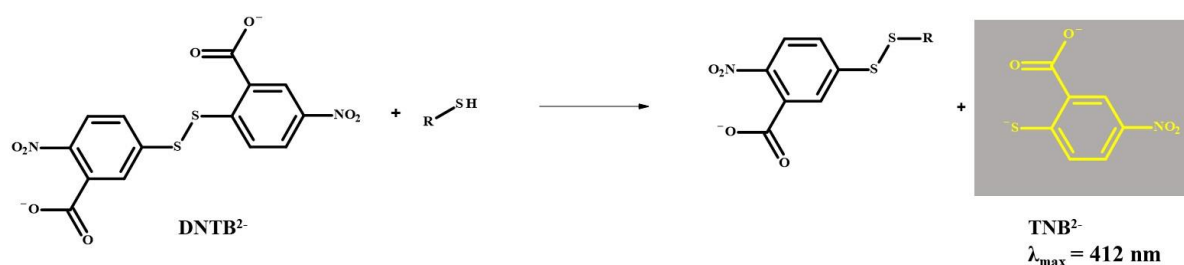
**Figura 10.** Mecanismo proposto da interação do QDs de ZnS com timerosal.



Fonte: autor, 2018.

No entanto, para ocorrer o mecanismo proposto é necessário que ocorra degradação do timerosal para a formação do ácido tiosalicílico. Assim, para elucidar o mecanismo de interação entre o QDs - ZnS e o TM, foi utilizado o ensaio de Ellman, que é baseado na reação entre DTNB e com um composto contendo grupo tiol livre, gerando como produto colorido o TNB, de coloração amarela ( $\lambda_{\text{max}} = 412 \text{ nm}$ ) como mostrado na Figura 11.

**Figura 11.** Reação base do método de Ellman para determinação de compostos tiólicos.

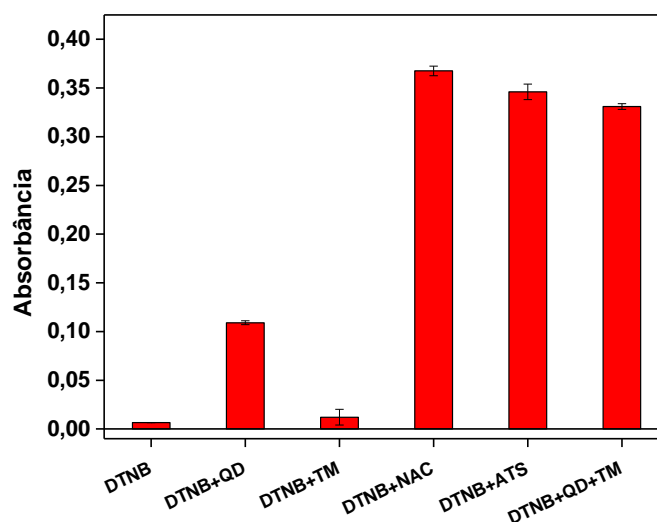


Fonte: autor, 2018.

Portanto, ao reagir  $\text{DNTB}^{2-}$  com os reagentes e analito do método proposto, a formação do  $\text{TNB}^{2-}$  só seria possível na presença ou com a formação de um grupo tiol. Para verificar essa proposição foi realizado a reação do  $\text{DNTB}^{2-}$  com timerosal, QDs - ZnS, *N*-acetil-cisteína (NAC), ácido tiosalicílico (ATS) e com a mistura QDs - ZnS e timerosal. Os resultados estão apresentados na Figura 12.

Nos resultados apresentados na Figura 12, observa-se que o  $\text{DNTB}^{2-}$  reage com o NAC e ATC como já era esperado, pois esses compostos apresentam grupos tios livres em suas estruturas. O sinal observado na reação do DTNB com QDs, provavelmente ocorre devido às moléculas de *N*-acetilcisteína que estão em equilíbrio em meio aquoso na superfície do QDs - ZnS, assim, existe uma fração do ligante livre e passível de reagir com o DTNB. Em relação a reação do DNTB com timerosal não se obteve sinal que se pudesse diferenciar do branco (apenas o DTNB), porém, no sistema contendo QDs e TM observa-se um elevado sinal analítico, indicando formação do  $\text{TNB}^{2-}$ . Como hipótese, este fato seria possível com a liberação do ácido tiosalicílico do TM, como foi proposto inicialmente, uma vez que o sinal obtido foi similar ao sistema contendo apenas o ATS. Assim, com base no ensaio de Ellman, pôde-se propor com base em evidências experimentais o mecanismo proposto.

**Figura 12.** Reação do DNTB com os reagentes do método proposto.



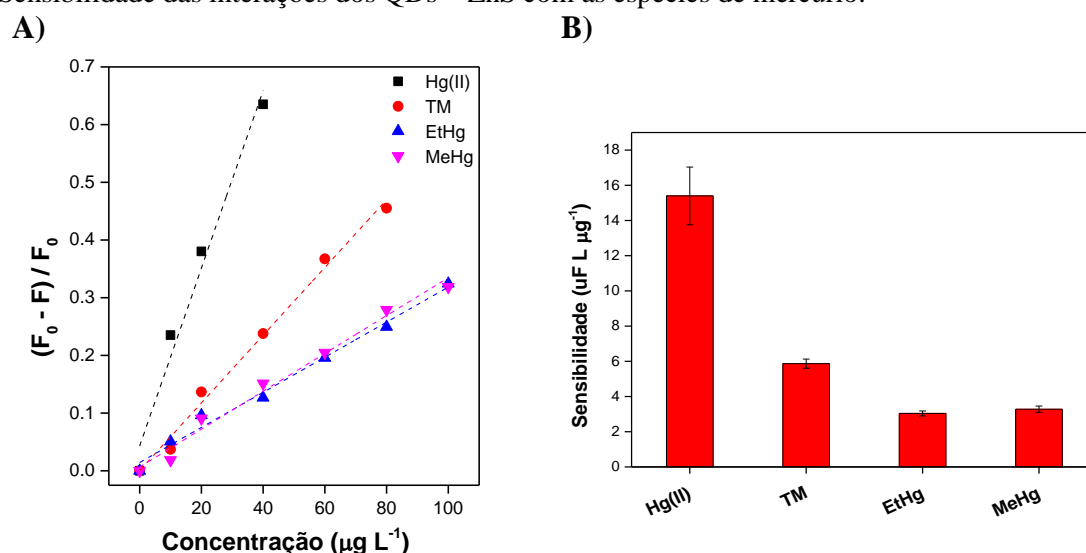
Fonte: autor, 2018.

#### 4.3.4 Resposta do QDs – ZnS frente as diferentes espécies de mercúrio

Como reportado por Duan et al. (2011), o QDs-ZnS foi utilizado para determinação de mercúrio na forma inorgânica (Hg(II)) e este trabalho realizou a aplicação do QDs para determinação de timerosal, portanto para entender como seria a resposta do QDs-ZnS frente as diferentes espécie de mercúrio foram realizadas curvas analíticas com Hg(II), timerosal, etilmercúrio e metilmercúrio. A Figura 13A mostra as curvas com do QDs-ZnS frente as diferentes espécies de mercúrio e a Figura 13B, as respectivas sensibilidades de cada curva.

Como observado na Figura 13, o QDs - ZnS apresenta a maior sensibilidade foi obtida para o Hg(II).O timerosal apresentou uma sensibilidade inferior ao Hg(II), porém como discutido neste trabalho foi viável a aplicação do QDs – ZnS para determinação de timerosal considerando sua elevada concentração nas amostras de vacina, no entanto, para as espécie de metilmercúrio e etilmercúrio a sensibilidade foi aproximadamente 50% menor, quando comparado para a sensibilidade do timerosal, possivelmente este efeito aditivo deve estar associado fração do ATS presente na molécula de TM. Por fim, devido à ausência de trabalho que realizaram a determinação de metilmercúrio e etilmercúrio utilizando QDs de ZnS ou até mesmo de CdTe, seria necessário otimização do sistema a fim de aumentar essa sensibilidade.

**Figura 13.** Interação do QDs – ZnS com as espécies de mercúrio. A) Curva analítica, B) Sensibilidade das interações dos QDs – ZnS com as espécies de mercúrio.



Fonte: autor, 2018.

## 4.4 Validação do método

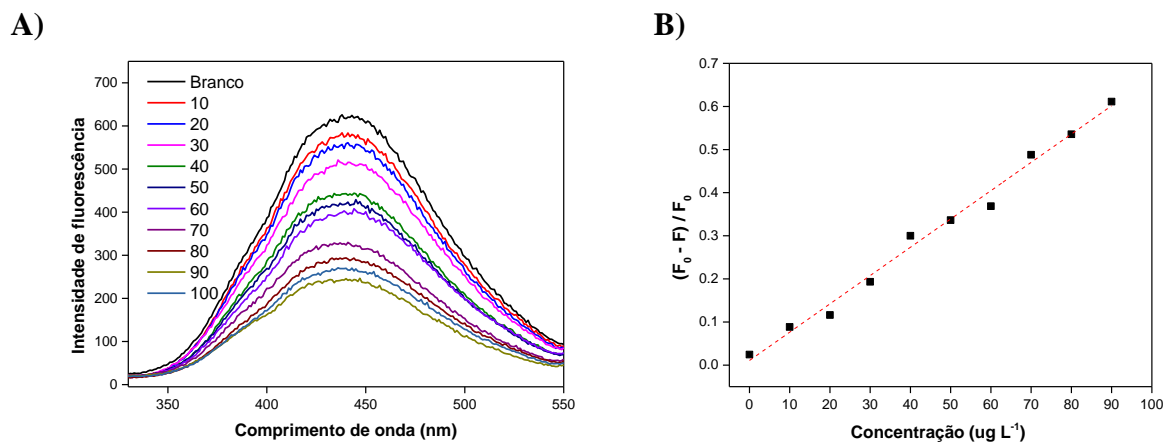
### 4.4.1 Figuras de méritos

Adições crescente de timerosal ao sistema contendo os QD-ZnS levaram a redução da intensidade de fluorescência. Assim, as principais figuras de mérito do método proposto foram estabelecidas a partir da curva analítica mostrada na Figura 14.

O método proposto apresentou faixa linear de 10 a 90  $\mu\text{g L}^{-1}$  (24,7 a 222 nM) correspondente a equação  $[(F_0 - F_F) / F_0] = 0,0066C_{\text{TM}} (\pm 0,0002) + 0,011 (\pm 0,001)$  e coeficiente de correlação linear  $r = 0,9949$  ( $n = 9$ ). O método mostrou-se preciso com RSD = 1,50 e 3,11% para as concentrações de timerosal de 10 e 90  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente, e com limite de detecção (LOD) de 4,59  $\mu\text{g L}^{-1}$  (11,3 nM).

Ao comparar os resultados obtidos com outros trabalhos publicados na literatura para determinação de timerosal utilizando outras técnicas como mostrado na Tabela 7, o método proposto mostra-se equivalente quanto a faixa linear, porém apresentou LOD maior que os demais trabalhos. Porém o método proposto utiliza uma técnica mais acessível e não necessita de procedimento para digestão das amostras.

**Figura 14.** (A) Espectros de emissão de fluorescência do QD-ZnS na ausência e presença de concentrações crescente de timerosal. (B) Curva analítica  $(F_0 - F) / F_0$  vs timerosal.



Fonte: Autor, 2018.



**Tabela 7.** Trabalhos publicados na literatura para determinação de timerosal, utilizando diferentes técnicas.

<b>Técnica</b>	<b>Preparo da amostra</b>	<b>Faixa linear (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>LOD (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Tipo de amostra</b>	<b>Referência</b>
HPLC - FA	Filtração	0,29 – 100	0,09	Efluente de indústria farmacêutica e água de rio	(ACOSTA et al., 2015)
FIA - FA	***	0,01 – 2	0,003	Soluções oftalmológicas	(CAMPANELLA et al., 2013)
ICP OES	Adição de 10% de ácido fórmico	0,5 – 10	0,6	Vacinas	(DOS SANTOS et al., 2010)
RP-HPLC-UV	Centrifugação e filtração	12 – 280	2,6	Crems farmacêuticos	(PÉREZ-CABALLERO et al., 2016)
UV-vis	Decomposição fotoquímica	96 – 981	9	Amostras farmacêuticas	(MARTÍN-ALONSO et al., 2018)
Este trabalho	Diluição	10 – 90	4,59	Vacinas	Autor, 2018

HPLC = Cromatografia líquida de alta eficiência/ FA = fluorescência atômica;

FA = fluorescência atômica / FIA = análise por injeção em fluxo ;

ICP OES = Espectrometria de Emissão Óptica em Plasma Indutivamente Acoplado;

RP-HPLC = Cromatografia líquida de alta resolução de fase reversa;

UV-vis = Espectroscopia UV/VIS.

Fonte: Autor, 2018.

#### 4.4.2 Análise das amostras de vacinas

Para validar o método proposto foi realizado o ensaio de recuperação e a determinação de timerosal pelo método proposto e por espectrometria de fluorescência atômica (AFS) (Tabela 8), os experimentos foram realizados em quatro amostras de vacinas (Tríplice, Hepatite B, Difteria e tétano e Antitetânica e contra coqueluche), os resultados estão apresentados nas Tabela 7.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 8 pôde-se quantificar timerosal nas amostras analisadas. De acordo com a bula das vacinas a concentração declarada de timerosal seria de até  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ , resultando em uma concentração máxima de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Segundo manual da ANVISA (2014) relacionado a *Vacinas para uso humano*, a concentração máxima permitida de timerosal em vacinas é de  $200 \text{ mg L}^{-1}$ .

No ensaio de recuperação dois níveis de diferentes ( $25$  e  $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) de concentração de timerosal foram adicionados nas amostras, no entanto, com base na informação da bula foi necessário realizar uma diluição de 4 mil vezes das amostras de vacina para realizar o ensaio de recuperação, nas quatro amostras analisadas a recuperação variou de  $79,2 \%$  a  $104,5 \%$  nas vacinas Antitetânicas /contra coqueluche e Tríplice, respectivamente.

Com os resultados obtidos pelo método proposto e por AFS ao se aplicar teste *t Student*, o  $t_{cal} = 0,374$  ( $t_{tab} = 2,35$ ), visto que,  $t_{cal} < t_{tab}$ , pode-se afirmar que não existe diferença significativa entre os dois métodos no limite de confiança de  $90 \%$ .

**Tabela 8.** Resultados do ensaio de recuperação e da determinação do timerosal pelo método proposto e por AFS. Amostras foram diluídas 4000 vezes.

Amostra	TM adicionado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	TM recuperado, ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	% recuperação	Método proposto ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	AFS ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Tríplice	-	$19,48 \pm 1,02$	-	$97,4 \pm 2,3$	$90,6 \pm 3$
	25	$26,12 \pm 2,32$	104,5		
	50	$50,55 \pm 1,46$	101,1		
Hepatite B	-	$20,60 \pm 0,34$	-	$103 \pm 3$	$106 \pm 1$
	25	$26,12 \pm 1,34$	104,5		
	50	$51,31 \pm 3,55$	102,6		
Difteria e tétano	-	$25,44 \pm 0,31$	-	$127 \pm 2$	$130 \pm 1$
	25	$24,02 \pm 0,45$	96,1		
	50	$49,88 \pm 1,89$	99,8		
Antitetânica e contra coqueluche	-	$25,86 \pm 0,78$	-	$129 \pm 3$	$134 \pm 3$
	25	$19,81 \pm 1,45$	79,2		
	50	$42,42 \pm 3,43$	84,8		

Fonte: Autor, 2018.

Com base nos resultados apresentados, observa-se que entre as amostras analisadas apenas vacina tríplice está em conformidade com que informa na bula, pois as demais apresentaram concentração superior a  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , no entanto, cabe ressaltar, que segundo a ANVISA a concentração máxima de timerosal em vacina é de  $200 \text{ mg L}^{-1}$ .

Os resultados apresentados por He et al. (2012), que realizou a quantificação de timerosal em seis amostras de vacinas comerciais utilizando ICP-MS como técnica de referência para validar o método proposto, a concentração de timerosal estava em conformidade com a bula, as vacinas analisadas variaram de  $0,96$  a  $75,3 \text{ mg L}^{-1}$ .

## 5. Considerações finais

A aplicação de *quantum dots* de ZnS como sondas fluorescentes para determinação de timerosal em amostra de vacinas foi possível após otimização dos parâmetros analíticos. Para obtenção do *quantum dots* de ZnS realizou procedimentos estabelecido em trabalho já publicado na literatura, onde o material sintetizado apresentou tamanho médio de 4,89 nm com comprimento de onda de excitação e emissão de 290 e 440 nm, respectivamente.

A quantificação de timerosal ocorreu através do processo de supressão da sua fluorescência, onde com aumento da concentração do timerosal a fluorescência do QDs de ZnS diminui proporcionalmente.

Na otimização do sistema foi obtido que o pH que melhor contribui para a interação em estudo foi pH 7 no sistema tampão ácido cítrico com fosfato. O mecanismo de *quenching* foi estudado através da influência da temperatura na interação do QD-ZnS com timerosal, onde se observou que o aumento da temperatura proporcionou uma diminuição nos valores de  $K_b$  e  $K_{sv}$ , indicando que o mecanismo de *quenching* é estático. Paralelamente, os parâmetros termodinâmicos indicam que ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals estão relacionadas com o processo de interação, que é espontâneo. Atualizando reação de Ellman foi possível propor um mecanismo de interação do QDs – ZnS com timerosal.

O método proposto, apresentou faixa linear de 10 – 90  $\mu\text{g L}^{-1}$  e limite de detecção de 4,59  $\mu\text{g L}^{-1}$  com valores de recuperação de 79,2 a 104,5% , ao comparar os resultados obtidos pelo método proposto e com AFS e ao aplicar teste *t Student*, o  $t_{cal} = 0,374$  ( $t_{tab} = 2,35$ ), visto que,  $t_{cal} < t_{tab}$ , pode-se afirmar que não existe diferença significativa entre os dois métodos no limite de confiança de 90%.

Portanto, o método proposto se mostrou viável para determinação de timerosal em amostras de vacinas, apresentando a vantagem de não precisar realizar a digestão das amostras, e utilizar uma técnica mais acessível, quando comparado aos métodos tradicional para determinação de timerosal.

## 6. Referências

- ACOSTA, G. et al. Determination of thimerosal in pharmaceutical industry effluents and river waters by HPLC coupled to atomic fluorescence spectrometry through post-column UV-assisted vapor generation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 106, p. 79–84, 2015.
- ALGARRA, M. et al. Thiolated DAB dendrimers and CdSe quantum dots nanocomposites for Cd(II) or Pb(II) sensing. **Talanta**, v. 88, p. 403–407, 2012.
- ARAÚJO, C. L. G. et al. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. v. 57, n. April, p. 2121–2132, 2002.
- BAKER, S. N.; BAKER, G. A. Luminescent carbon nanodots: Emergent nanolights. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, n. 38, p. 6726–6744, 2010.
- BAO, L. et al. Photoluminescence-tunable carbon nanodots: Surface-state energy-gap tuning. **Advanced Materials**, v. 27, n. 10, p. 1663–1667, 2015.
- BUNKOED, O.; KANATHARANA, P. Mercaptopropionic acid-capped CdTe quantum dots as fluorescence probe for the determination of salicylic acid in pharmaceutical products. **Luminescence**, v. 30, n. 7, p. 1083–1089, 2015.
- CAMPANELLA, B. et al. Analytica Chimica Acta Determination of thiomersal by flow injection coupled with microwave-assisted photochemical online oxidative decomposition of organic mercury and cold vapor atomic fluorescence spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 804, p. 66–69, 2013.
- CESAR, J.; ALVES, L. Aplicação de métodos quimiométricos de calibração de segunda ordem e transferência de calibração na determinação simultânea de misturas de fármacos utilizando espectroscopia de fluorescência molecular em fase sólida. 2009.
- CHEN, G. M. et al. Synthesis of chiral dual-stabilizer-capped CdSe nanocrystals and its application selective detection of Hg(II). **Fenxi Huaxue/ Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 38, n. 10, p. 1405–1410, 2010.
- DÓREA, J. G.; FARINA, M.; ROCHA, J. B. T. Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): A comparison with methylmercury. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 8, p. 700–711, 2013.
- DOS SANTOS, E. J. et al. Determination of thimerosal in human and veterinarian vaccines by photochemical vapor generation coupled to ICP OES. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 10, p. 1627, 2010.
- DRBOHLAVOVA, J. et al. Quantum dots - characterization, preparation and usage in biological systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 2, p. 656–673, 2009.
- DUAN, J. et al. Facile synthesis of N-acetyl-l-cysteine capped ZnS quantum dots as an eco-friendly fluorescence sensor for Hg<sup>2+</sup>. **Talanta**, v. 85, n. 4, p. 1738–1743, 2011.
- ELLISON SRL, BARWICK VB, F. T. **Practical Statistics for the Analytical Scientist:**

**a bench guide.** Cambridge: [s.n.].

FRIGERIO, C. et al. Application of quantum dots as analytical tools in automated chemical analysis: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 735, p. 9–22, 2012.

GAO, M. et al. Strongly Photoluminescent CdTe Nanocrystals by Proper Surface Modification. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 43, p. 8360–8363, 1998.

GEIER, D. A. et al. A longitudinal cohort study of the relationship between Thimerosal-containing hepatitis B vaccination and specific delays in development in the United States: Assessment of attributable risk and lifetime care costs. **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 6, n. 2, p. 105–118, 2016.

GOMES, C. Z. Utilização da espectroscopia de fluorescência para mensuramento de moléculas autofluorescentes em indivíduos diabéticos. p. 1–56, 2011.

HE, H. et al. Dielectric barrier discharge micro-plasma emission source for the determination of thimerosal in vaccines by photochemical vapor generation. **Microchemical Journal**, v. 104, p. 7–11, 2012.

HONG-JING, Z. et al. Determination of trace inorganic mercury in mineral water by flow injection on-line sorption preconcentration-cold vapor atomic fluorescence spectrometry. **Fenxi Huaxue/ Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 37, n. 7, p. 1029–1032, 2009.

HOSSEINZADEH, G. et al. Interaction of insulin with colloidal ZnS quantum dots functionalized by various surface capping agents. **Materials Science and Engineering C**, v. 77, p. 836–845, 2017.

HUANG, S. et al. Study on the molecular interaction of graphene quantum dots with human serum albumin: Combined spectroscopic and electrochemical approaches. **Journal of Hazardous Materials**, v. 285, p. 18–26, 2015.

JO, M.; MAGALH, M. Síntese e modificação da superfície de nanocristais semicondutores para aplicação como sondas fluorescentes em meio não-aquoso. 2014.

KE, J. et al. Ultrasensitive quantum dot fluorescence quenching assay for selective detection of mercury ions in drinking water. **Scientific Reports**, v. 4, p. 4–9, 2014.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy Principles of Fluorescence Spectroscopy**. [s.l: s.n.].

LI, H. et al. Carbon nanodots: synthesis, properties and applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 46, p. 24230, 2012.

LI, L. et al. Application of functionalized ZnS nanoparticles to determinate uracil and thymine as a fluorescence probe. **Materials Chemistry and Physics**, v. 113, n. 2–3, p. 905–908, 2009.

LIM, S. Y.; SHEN, W.; GAO, Z. Carbon quantum dots and their applications. **Chem. Soc. Rev.**, v. 44, n. 1, p. 362–381, 2015.

- MACHADO, C. E. et al. Pontos Quânticos de Carbono: Síntese Química, Propriedades e Aplicações. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1306–1346, 2015.
- MARTÍN-ALONSO, M. et al. Gold nanorods for in-drop colorimetric determination of thiomersal after photochemical decomposition. **Microchimica Acta**, v. 185, n. 4, 2018.
- MAZZEO, J. R. et al. A new separation technique takes advantage of sub-2- $\mu\text{m}$  HPLC. **Journal of the American Chemical Society**, p. 460–467, 2005.
- MENEZES, F. D. Síntese e Caracterização de Nanocristais Luminescentes Baseados em Semicondutores II-VI para Fins de Aplicação como Biomarcadores. 2007.
- MIRANDA-ANDRADES, J. R. et al. Thiomersal photo-degradation with visible light mediated by graphene quantum dots: Indirect quantification using optical multipath mercury cold-vapor absorption spectrophotometry. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 138, p. 81–89, 2017.
- MIRANDA, J. E. B. Carbon Dots: Nanopartículas de carbono fluorescentes para marcação e visualização de células. p. 113, 2014.
- MIRTCHEV, P. et al. Solution phase synthesis of carbon quantum dots as sensitizers for nanocrystalline  $\text{TiO}_2$  solar cells. **J. Mater. Chem.**, v. 22, n. 4, p. 1265–1269, 2012.
- MORETON, J. A.; DELVES, H. T. Simple direct method for the determination of total mercury levels in blood and urine and nitric acid digests of fish by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 13, n. July, p. 659–665, 1998.
- NSIBANDE, S. A.; FORBES, P. Fluorescence detection of pesticides using quantum dot materials – A review. 2016.
- PÉREZ-CABALLERO, G. et al. Development and validation of a RP-HPLC-UV method for the quantification of thimerosal in topic creams. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 60, n. 4, p. 188–193, 2016.
- R. VAZ, K. VIEIRA, C. MACHADO, J. FERRARI, M. S. Preparação de pontos de carbono e sua caracterização óptica: um experimento para introduzir nanociência na graduação. v. 35, n. 9, p. 1758–1762, 2015.
- REZAEI, B. et al. Development of highly selective and sensitive fluorimetric label-free mercury aptasensor based on cysteamine@CdTe/ZnS quantum dots, experimental and theoretical investigation. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 247, p. 400–407, 2017.
- SAFITRI, E. et al. Fluorescence bioanalytical method for urea determination based on water soluble ZnS quantum dots. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 240, p. 763–769, 2017.

SAMANTA, A. et al. A perspective on functionalizing colloidal quantum dots with DNA. **Nano Research**, v. 6, n. 12, p. 853–870, 2013.

SANTOS, J. C. N. et al. Thimerosal changes protein conformation and increase the rate of fibrillation in physiological conditions: Spectroscopic studies using bovine serum albumin (BSA). **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 2017, p. #pagerange#, 2018.

SHINDE, K. N. et al. Phosphate Phosphors for Solid-State Lighting. v. 174, p. 41–60, 2012.

TOMCZAK, N. et al. Designer polymer-quantum dot architectures. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 34, n. 5, p. 393–430, 2009.

VALE, B. R. C. et al. EFEITO DA ESTRUTURA MOLECULAR DE LIGANTES DE SUPERFÍCIE EM PONTOS QUÂNTICOS DE CdTe DISPERSOS EM ÁGUA. v. X, n. 00, p. 1–8, 2014.

WILLIAM SLIKKER. Thimerosal Nomination to the National Toxicology Program Review of the Literature April 2001. n. April, 2001.

XIA, Y. S.; CAO, C.; ZHU, C. Q. Selective detection of mercury(II) and copper(II) based on the opposite size-dependent fluorescence quenching of CdTe quantum dots. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 25, n. 12, p. 1836–1841, 2007.

YAO, J. et al. Detection of femtomolar proteins by nonfluorescent ZnS nanocrystal clusters. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 1645–1652, 2012.

YEPSEN, O. et al. Photocatalytic degradation of thimerosal in human vaccine's residues and mercury speciation of degradation by-products. **Microchemical Journal**, v. 121, p. 41–47, 2015.

ZHANG, F. et al. A one-step colorimetric method of analysis detection of Hg<sup>2+</sup> based on an in situ formation of Au@HgS core-shell structures. **The Analyst**, v. 136, n. 13, p. 2825, 2011.

ZHAO, A. et al. Recent advances in bioapplications of C-dots. **Carbon**, v. 85, n. December, p. 309–327, 2015.

ZHONG, J. et al. Synthesis, characterization, and third-order nonlinear optical properties of copper quantum dots embedded in sodium borosilicate glass. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 537, p. 269–274, 2012.

ZHUANG, J. et al. Synthesis of water-soluble ZnS : Mn<sup>2+</sup> nanocrystals by using mercaptopropionic acid as stabilizer. **Journal of Materials Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 1853, 2003.



## 7. Anexos

Tabela S1. Avaliação da concentração do QDs - ZnS.

Concentração do QDs ( $10^{-4}$ mol L $^{-1}$ )	Sinal do branco	Faixa linear $\mu\text{g/L}$	$(F_0 - F) / F_0 = aC + b$		
			a (x1000)	b (x1000)	r
6,15	525	0 - 100	$2,84 \pm 0,07$	0,63	0,9988
4,92	435	0 - 100	$2,64 \pm 0,18$	7,00	0,9926
4,10	355	0 - 100	$3,38 \pm 0,35$	22,1	0,9895
3,07	284	0 - 100	$4,6 \pm 0,28$	14,2	0,9962
2,05	201	0 - 75	$6,23 \pm 0,7$	29,8	0,9880

Fonte: Autor, 2018.