



# Aplicabilidade energética dos Carbon dots e da fluoresceinamina como sensor específico para o Fe(II)

SUSANA ALEXANDRA FERNANDES NEVES

Outubro de 2021

## **Aplicabilidade energética dos *Carbon dots* e da fluoresceinamina como sensor específico para o Fe(II)**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em  
Engenharia Química, ramo opcional Qualidade

Susana Alexandra Fernandes Neves (1190137)

Orientadores:

Abel José Duarte - Professor Adjunto / Investigador ISEP [ajd@isep.ipp.pt](mailto:ajd@isep.ipp.pt)

Helena M. R. Gonçalves – Investigadora REQUIMTE/ISEP [helenardrgs@gmail.com](mailto:helenardrgs@gmail.com)

Outubro 2021



## **Agradecimentos**

Voltar a estudar após 20 anos não foi uma tarefa fácil. Dedico este projeto a todos os que me incentivaram e orientaram durante esta complicada etapa da minha vida.

Ao meu orientador, o Dr. Abel Duarte, por todo o conhecimento transmitido, pelo enorme entusiasmo e empenho que coloca em tudo o que faz o que me inspirou, pela amizade e apoio em todos os momentos.

À Dra. Helena Gonçalves por ter acreditado e confiado em mim. O seu empenho, sabedoria e dedicação ajudaram a transformar esta nova fase numa oportunidade de crescimento académico e pessoal.

A todos os colegas de laboratório e de mestrado, em especial à Sabela uma amiga sempre presente e disponível para ouvir as minhas preocupações e dúvidas.

Ao José, a minha cara metade, pelo seu incentivo e motivação, valorizando sempre as minhas capacidades. Pela sua paciência e compreensão, mesmo quando sacrificava os dias e as noites para a realização deste estudo. Pela força e ajuda para ultrapassar os obstáculos que foram surgindo. Sem o teu apoio incondicional não seria possível lutar pelos meus sonhos e objetivos.

Este trabalho recebeu apoio financeiro de Fundos Nacionais (FCT, Fundação para a Ciência e Tecnologia) através do projeto PTDC/BTM-MAT/30858/2017 – NORTE-01- 0145-FEDER-030858.



## Resumo

A primeira parte deste trabalho centrou-se no desenvolvimento de materiais que podem ajudar a ultrapassar as atuais limitações no armazenamento e consumo de energia. Desenvolvemos nanoflúidos baseados em nanopartículas não tóxicas de carbono (NPs): *carbon dots* (Cdots) funcionalizados com líquidos iónicos. Aqui, quisemos mostrar que estes novos nanoflúidos são, não só interessantes como possíveis eletrólitos, mas também como novos separadores híbridos orgânicos/inorgânicos. Como tal, desenvolvemos um método de imobilização utilizando o poli(álcool vinílico) (PVA). De facto, os Cdots altamente condutores foram retidos com sucesso no interior da membrana mesmo após a aplicação de vários ciclos de molhagem/secagem. Além disso, as características morfológicas não se alteraram após esses ciclos e permaneceram constantes durante mais de quatro meses. Estes nanoflúidos podem ser uma abordagem interessante para resolver alguns dos problemas atuais nos campos das baterias de estado sólido e do armazenamento de energia, entre outros.

Na segunda parte o nosso foco foi a necessidade de desenvolver um sensor analítico específico que conseguisse identificar e quantificar o Fe(II). O sensor fluorescente aqui descrito pode detetar com sucesso o Fe(II) e discriminar este ião de outros analitos que normalmente atuam como interferentes em meios biológicos. Além disso, este sensor à base de fluoresceinamina reduzida (RFL) tem alta fotoestabilidade e constante de dissociação, o que indica que o complexo obtido entre a fluoresceinamina reduzida e o Fe(II) é muito estável. Este sensor fluorescente tem um mecanismo de ligação de 1:1 e foi encontrada uma ligação do tipo cooperativa positiva entre o analito e o sensor. Os parâmetros de deteção, quantificação e sensibilidade do sensor são:  $21,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ;  $65,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$  e  $48 \pm 3 (\times 10^7) \mu\text{M}$ , respetivamente.

**Palavras-chave:** nanoflúidos; *carbon dots*; líquidos iónicos; eletrólitos; aplicações energéticas; fluoresceinamina reduzida; específico; deteção de ferro(II).



## Abstract

The first part of this work focused on the development of materials that can help overcome the current limitations in energy storage and consumption. We developed nanofluids based on non-toxic, carbon nanoparticles (NPs): carbon dots (Cdots) functionalized with ionic liquids. Here, we wanted to prove that these new nanofluids are, not only interesting as possible electrolytes, but also as new organic/inorganic hybrid separators. As such, we developed an entrapment method using poly(vinyl alcohol) (PVA). Indeed, the highly conductive Cdots were successfully retained inside the membrane even upon the application of several wetting/drying cycles. Moreover, the morphological characteristics did not change upon these cycles and remained stable for more than four months. These nanofluids could be an interesting approach to tackle some of the current problems in the fields of solid-state batteries, and energy storage, among others.

In the second part our focus was on the need to develop a specific analytical sensor that can identify and quantify Fe(II). The turn-on fluorescent sensor here described can successfully detect Fe(II) and discriminate this ion from other analytes that commonly act as interferents in biological media. Moreover, this reduced fluoresceinamine-based (RFL) sensor has a high photostability and high dissociation constant, which is an indication that the complex obtained between reduced fluoresceinamine and Fe(II) is highly stable. This fluorescence-based sensor has a binding mechanism of 1:1 and a positive cooperativity was found between analyte and sensor. The detection, quantification and sensitivity parameters of the sensor were determined:  $21.6 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ;  $65.6 \pm 0.1 \mu\text{M}$  and  $48 \pm 3 (\times 10^7) \mu\text{M}$ , respectively.

**Keywords:** nanofluids; carbon dots; ionic liquids; electrolytes; energy applications; reduced fluoresceinamine; specific; iron(II) detection.



# Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Lista de figuras.....	xi
Lista de abreviaturas.....	xiii
<b>Capítulo 1 - Nanoflúidos baseados em <i>Carbon dots</i> funcionalizados com líquidos iônicos para aplicações energéticas.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 <i>Carbon dots</i> .....	1
1.1.2 Fluorescência dos Cdots.....	2
1.1.3 Nanoflúidos.....	2
1.1.4 Aplicações energéticas dos nanoflúidos.....	4
<b>1.2 Materiais e métodos.....</b>	<b>5</b>
1.2.1 Materiais.....	5
1.2.2 Métodos.....	6
<b>1.3 Resultados e discussão.....</b>	<b>8</b>
1.3.1 Conceitos fundamentais.....	8
1.3.2 Imobilização dos nanoflúidos.....	12
<b>1.4 Conclusões.....</b>	<b>16</b>
<b>1.5 Perspetivas futuras.....</b>	<b>17</b>
Referências bibliográficas.....	19
<b>Capítulo 2 - Sensor <i>turn-on</i>, fotoestável, não tóxico e específico para o ferro(II) ....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Introdução.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2 Materiais e Métodos.....</b>	<b>28</b>
2.2.1 Materiais.....	28
2.2.2 Métodos.....	28
<b>2.3 Resultados e discussão.....</b>	<b>32</b>
2.3.1 Propriedades fluorescentes da FL e da RFL.....	32
2.3.2 Mecanismo de ligação do Fe(II) à RFL.....	36
2.3.3 Efeito dos íons metálicos na fluorescência da RFL.....	37
<b>2.4 Conclusões.....</b>	<b>38</b>
Referências bibliográficas.....	41



## Lista de figuras

Figura 1.1 - Aplicação de Cdots em nanomedicina. Adaptado de [1]. .....	1
Figura 1.2- Principais características dos líquidos iônicos. Adaptado de [17]. .....	3
Figura 1.3 – Membranas PVA/nanoflúidos.....	7
Figura 1.4 - (a) Perfil de emissão de fluorescência dos nanoflúidos e do [Tmi][Trif] (comprimento de onda de excitação = 400 nm), (b) Perfil de intensidade de fluorescência da solução aquosa dos nanoflúidos adquirida a 20 °C, e no final do primeiro ciclo de aquecimento (50 °C), (c) Intensidade de fluorescência no comprimento de onda máximo de emissão do [Tmi][Trif] (515 nm), em função da temperatura no primeiro ciclo de aquecimento/arrefecimento, (d) Perfil de emissão de fluorescência do [Tmi][Trif] (comprimento de onda de excitação = 400 nm), a 20 °C, à temperatura máxima do primeiro ciclo de aquecimento (50 °C), e a 20 °C no primeiro ciclo de aquecimento/arrefecimento. Adaptado de [41]. .....	9
Figura 1.5 - Perfil de condutividade dos (a) nanoflúidos originais; (b) 95% (p/p) das soluções aquosas do Cdots/[Bmim]Cl em azul e Cdots/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] em verde CdotsCHI/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] em laranja, e [Tmi][Trif] em preto. (c) Valores de condutividade obtidos a 50 °C após cada ciclo de aquecimento e de arrefecimento dos três nanoflúidos originais. Adaptado de [41]. .....	11
Figura 1.6 - a) Perfil de viscosidade dos nanoflúidos em estado puro e b) valores de viscosidade obtidos a 50 °C após cada ciclo de aquecimento e arrefecimento para Cdots/[Bmim]Cl em azul e Cdots/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] em verde. Inserção: imagens de Cdots/[Bmim]Cl antes do primeiro ciclo de aquecimento e após o arrefecimento. Adaptado de [41]. .....	12
Figura 1.7 - Representação esquemática da formação da membrana de PVA. Adaptado de [45]. .....	13
Figura 1.8 - Representação esquemática do aprisionamento de [Tmi][Trif], Cdots/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif], e Cdots/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] na membrana de PVA. Adaptado de [41]. .....	14
Figura 1.9 - Perfil de intensidade de fluorescência com o tempo de (a,d) [Tmi][Trif], (b,e) Cdots/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif], e (c,f) CdotsCHI/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] presos nas membranas de PVA. Adaptado de [41]. .....	15

Figura 1.10 - (a) Imagens das membranas de PVA. (b) Imagem da fluorescência adquirida num dispositivo caseiro para medir a fluorescência de sólidos usando um LED de 450 nm como fonte de excitação. Imagens de (c) [Tmi][Trif], (d) Cdots/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif], (e) CdotsCHI/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] presos nas membranas de PVA usando um ângulo de polimerização cruzada de 90°. Adaptado de [41].	16
Figura 2.1 - Diagrama simplificado do processo de quenching. Adaptado de [13].	26
Figura 2.2 - Estruturas químicas de fluoresceinamina (a) e provável redução da fluoresceinamina (b). Adaptado de [35].	27
Figura 2.3 - Esquema do comportamento de detecção da fluorescência da RFL. Adaptado de [41].	33
Figura 2.4 - a) Emissão de fluorescência da RFL em contacto com diferentes iões metálicos (Fe(II), Fe(III), Mn(II), Cu(II), Pb(II), Cd(II), Ni(I), SrCl <sub>2</sub> , NaCl, K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , citrato de sódio, ácido cítrico e Co(II) usando um comprimento de onda de excitação de 450 nm e uma concentração de iões metálicos de $6,70 \times 10^{-2}$ M. b) Efeito de fotobleaching ao longo de 2 h da RFL, mediante a adição de 200 µL de solução de reserva de Fe(II) (5 mM)). c) Tempo necessário para variação de intensidade de fluorescência com o pH da solução, utilizando um comprimento de onda de excitação de 450 nm. d) Linearização Henderson-Hasselbach do aumento da fluorescência obtida para a gama de pH 6,8-10 para um tempo de aquisição de 10 s. Estes valores representam uma média de pelo menos três medições independentes. Adaptado de [41].	34
Figura 2.5 - a) Gráfico de Benesi-Hildebrand para a RFL em contacto com quantidades crescentes de Fe(II). b) Espectros de emissão de fluorescência da FL, da RFL e do composto RFL-Fe(II), usando um comprimento de onda de excitação de 450 nm. c) Gráfico de Hill para a RFL em contacto com quantidades crescentes de Fe(II). Estes valores representam uma média de pelo menos três medições independentes. Adaptado de [41].	35
Figura 2.6 - Variação da intensidade de fluorescência da RFL em contacto com Fe(II) numa gama de concentração de $3,30 \times 10^{-6}$ - $6,70 \times 10^2$ M e um comprimento de onda de excitação de 450 nm. Estes valores representam uma média de pelo menos três medições independentes. Adaptado de [41].	38

## Lista de abreviaturas

**[Bmim]Cl:** Cloreto de 1-butil-3-metilimidazolio

**Cdots:** *Carbon dots*

**Cdots/[Bmim]Cl:** *Carbon dots* de glucose

**CdotsCHI/[Bmim]Cl:** *Carbon dots* de quitina de caranguejo

**CNT:** Nano Tubos de Carbono

**DL:** Limite de detecção

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**FL:** Fluoresceinamina

**FWHM:** Largura máxima a meia altura (do inglês Full Width at Half Maximum)

**GA:** Glutaraldeído

**HOMO:** Orbital molecular ocupada mais alta (do inglês Highest Occupied Molecular Orbital)

**ILs:** Líquidos iônicos

**LUMO:** Orbital molecular não ocupada mais baixa (do inglês Lowest Unoccupied Molecular Orbital)

**NBD:** 4-nitrobenzeno-2-oxa-1,3-diazol

**NPs:** Nanopartículas

**PVA:** Poli(álcool vinílico)

**QDs:** *Quantum Dots*

**QL:** Limite de quantificação

**QY:** Rendimento quântico

**RFL:** Fluoresceinamina reduzida

**[Tmi][Trif]:** triflato de 1-tosilato-3-metilimidazolio

**UV-A:** Luz ultravioleta negra

**$\Phi$ F:** Rendimento quântico de fluorescência



# Capítulo 1 - Nanoflúidos baseados em *Carbon dots* funcionalizados com líquidos iônicos para aplicações energéticas

## 1.1 Introdução

### 1.1.1 *Carbon dots*

*Carbon dots* (Cdots) são a mais recente classe de nanopartículas fluorescentes. Estas nanopartículas apresentam algumas propriedades excepcionais, tais como, elevada fotoestabilidade, comprimentos de onda de excitação e de emissão ajustáveis, alta estabilidade ao longo do tempo, entre outras. Estas propriedades tornaram-nas bastante interessantes em numerosas áreas como por exemplo: desenvolvimento de biosensores, bioimagem, produtos farmacêuticos e células de combustível (Figura 1.1) [1-4].

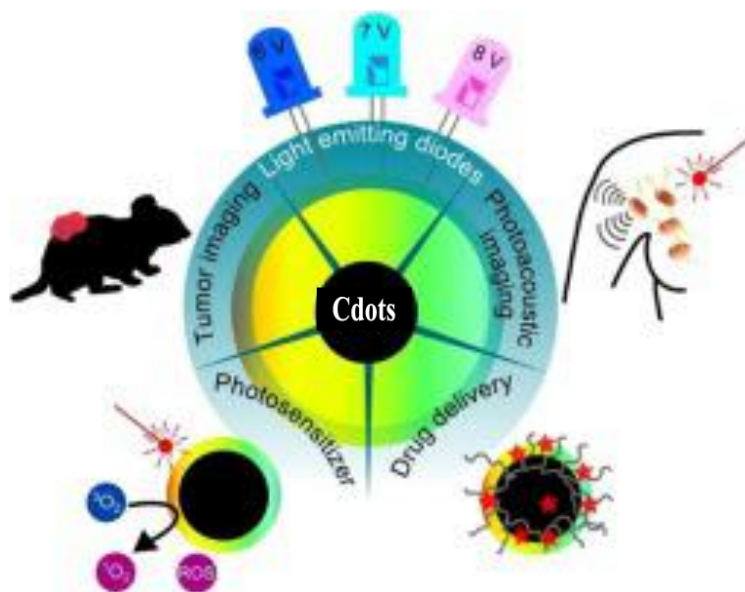


Figura 1.1 - Aplicação de *Carbon dots* em nanomedicina. Adaptado de [1].

Os *Carbon dots* são o novo membro da família *Quantum Dots* (QDs) e partilham algumas das propriedades físicas que fizeram destes um dos propulsores mais relevantes na área da nanoquímica. Os QDs tradicionais têm um núcleo de metal pesado, o que impede a sua

aplicação em ensaios *in vivo* [5]. Assim sendo, os Cdots são uma alternativa mais promissora e mais competitiva.

Desde a sua descoberta em 2004, existe um grande interesse neste novo material baseado em carbono. Os Cdots apresentam-se como uma alternativa não tóxica aos QDs tradicionais baseados em metais pesados como o cádmio e, atualmente, existem várias abordagens para a sua síntese [6, 7].

### **1.1.2 Fluorescência dos Cdots**

Foram várias as tentativas para explicar a fluorescência das nanopartículas. A teoria mais comum está relacionada com o confinamento quântico: todas as partículas estão confinadas em tamanho entre o intervalo de banda formado pela orbital molecular mais alta ocupada (HOMO) e a orbital molecular mais baixa não ocupada (LUMO) [8]. À medida que as partículas ficam mais pequenas, o intervalo de energia entre estas duas orbitais torna-se maior e os eletrões na orbital HOMO precisam de mais energia para serem excitados para a orbital LUMO. Ao ser excitado, o eletrão regressa ao estado fundamental com emissão de luz. Deste modo, é possível dizer que o intervalo de energia determina o comprimento de onda de emissão da nanopartícula [9].

A fluorescência destas novas nanopartículas parece estar dependente de dois fatores principais: os defeitos de estado de superfície e o confinamento quântico. Quase todas as modificações na superfície destas nanopartículas são seguidas por uma alteração das suas propriedades óticas (intensidade de fluorescência, tempo de vida radiativo e comprimento de onda de excitação/emissão). Isto pode ser explicado pelo facto de que as nanopartículas são constituídas apenas por uma pequena quantidade de átomos que se encontram principalmente na superfície, pelo que qualquer alteração nestes átomos resulta numa modificação das suas propriedades.

### **1.1.3 Nanoflúidos**

Os nanoflúidos, ou suspensões líquidas de nanopartículas (NPs), representam uma área relativamente nova e em rápida evolução, com elevada relevância académica e extraordinária contribuição na indústria e na sociedade [10]. Estes fluídos representam sistemas inicialmente em duas fases (a parte sólida (nanométrica) e o fluído base) que, após dispersão uniforme,

formam uma mistura estável e com propriedades diferentes das dos componentes isolados [11].

Em diversas investigações observou-se que os nanoflúidos possuem melhores propriedades termofísicas como por exemplo, condutividade térmica, difusividade térmica, viscosidade e coeficientes de transferência de calor por convecção, quando comparados com os respectivos fluídos base [12-14]. Devido às suas características atrativas e únicas, os nanoflúidos prestam-se a aplicações numa infinidade de setores que vão desde a exploração espacial, indústria automóvel, e armazenamento de energia, até à medicina, incluindo a terapia do cancro [15].

Suspensões de nanopartículas em líquidos iónicos (ILs) são uma classe inovadora de novos nanoflúidos. Os líquidos iónicos consistem inteiramente em iões e têm um ponto de fusão inferior a 100 °C [16]. Apresentam várias características únicas (Figura 1.2) e como não são combustíveis ou voláteis em condições ambientais e são também recicláveis, são considerados fluídos amigos do ambiente [17].

Propriedades	Líquidos Iónicos
Número de solventes	>1,000,000
Aplicabilidade	Multifunção
Capacidade catalítica	Comum e sintonizável
Pressão de vapor	Insignificante em condições normais
Inflamabilidade	Normalmente não inflamável
Solvatação	Forte

Figura 1.2- Principais características dos líquidos iónicos. Adaptado de [17].

Em 2007, Fukushima e Aida foram os primeiros a misturar uma alta concentração de nanotubos de carbono (CNT) em líquidos iónicos à temperatura ambiente [18]. Desde então, inúmeros trabalhos de investigação têm sido desenvolvidos [19-22]. No entanto, apenas a investigação relacionada com as propriedades termofísicas destes novos fluídos tem sido profundamente discutida.

### **1.1.4 Aplicações energéticas dos nanoflúidos**

O roteiro da transição para uma economia competitiva de baixo carbono até 2050 [23] aumentou a consciência social sobre a necessidade de desenvolver tecnologias alternativas que contribuam efetivamente para uma diminuição significativa do efeito estufa. A produção de baterias e materiais de baterias que permitirão o transporte em grande escala por eletrificação, e o armazenamento de energias renováveis produzidas intermitentemente, tais como a eólica e a solar, são de importância vital.

As baterias de íons de lítio têm estado no centro da revolução tecnológica portátil, como foi reconhecido recentemente pelo Prémio Nobel Química de 2019 [24]. No entanto, a crescente procura de um desempenho ultraelevado (maior capacidade de armazenamento e potência), fácil recarregamento, fiabilidade, segurança e baixo preço não podem ser totalmente satisfeitos com os conhecimentos e tecnologia de eletroquímica existentes. Embora tenha havido grandes esforços no desenvolvimento de atualizações eficientes [25,26], pode afirmar-se que, globalmente, a investigação atual sobre baterias tem duas principais direções [27]: (1) evolução dos íons de lítio, que consiste na otimização da já totalmente desenvolvida tecnologia de íons de lítio; e (2) pós íons de lítio, onde são tentadas modificações dos seus componentes principais.

Independentemente da direção da investigação, o desenvolvimento de novos condutores de íons rápidos ou eletrólitos sólidos está no cerne do conceito de bateria de estado sólido [27,28]. Acelerar a investigação sobre a conceção dos materiais das baterias e interfaces, promovendo a investigação para incorporar funcionalidades de deteção inteligente e autocura em futuras baterias e garantir a produtibilidade, reciclabilidade e sustentabilidade, são de suma importância [29].

A aplicação de nanoflúidos na área da energia tem vindo a crescer exponencialmente nos últimos anos, conduzindo recentemente a desenvolvimentos bastante interessantes [30,31]. De acordo com Choi et al. [32], os nanoflúidos são dispersões estáveis de NPs num fluído base. A introdução das NPs no fluído base resulta num aumento dramático do desempenho de transferência de calor [33]. Esta área de investigação tem como fator impulsionador esta característica relevante dos nanoflúidos. A utilização de nanoflúidos como agentes eficazes de transferência de calor é bastante apelativa para várias áreas industriais, particularmente em aplicações energéticas. Hoje em dia, os fluídos convencionais utilizados nos motores e radiadores dos automóveis contêm partículas do tamanho de milímetros/micrómetros para aumentar a transferência de calor. No entanto, não são muito eficientes. A utilização destas

partículas dificulta a utilização de novas tecnologias de arrefecimento baseadas em microcanais, uma vez que podem entupir facilmente [34]. Neste sentido, o uso de nanoflúidos com maior estabilidade e condutividade térmica podem levar a uma melhoria da eficiência dos motores e dos radiadores, e conseqüentemente ao desenvolvimento de veículos mais leves com melhor economia de combustível [35].

Os nanoflúidos convencionais contêm água, óleos/lubrificantes e líquidos orgânicos, tais como, poli(etilenoglicol), bioflúidos, e soluções poliméricas, entre outras [34]. Embora os ILs tenham sido extensivamente explorados no campo da eletroquímica do estado sólido [36], a sua utilização como flúido base para formar nanoflúidos é escassa, mas bastante promissora [37,38]. De facto, a estabilidade térmica e eletroquímica dos ILs, juntamente com o aumento da condutividade quando associados a NPs, tornam-nos especialmente apelativos para resolver problemas fundamentais, tais como o desenvolvimento de baterias recarregáveis de lítio metálico onde a deposição desigual do lítio dificulta a sua estabilidade ao longo dos ciclos repetidos de carga/descarga [37].

Recentemente, foram desenvolvidos nanoflúidos sustentáveis baseados em Cdots de polissacarídeos sintéticos [39] ou de resíduos derivados de biomassa [40] funcionalizados com ILs à base de imidazolium. Os Cdots têm características intrínsecas, tais como condutividade térmica e elétrica e propriedades optoelectrónicas, que são extremamente dependentes da química de superfície. Devido à sua estrutura de banda única, os nanomateriais de carbono exibem uma notável mobilidade dos eletrões à temperatura ambiente. Estas características tornam os nanomateriais de carbono, incluindo os Cdots, bastante apelativos para fins energéticos gerais e, em particular, para aplicações em que é necessária uma condutividade elétrica elevada.

## **1.2 Materiais e métodos**

### **1.2.1 Materiais**

Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio ([Bmim]Cl) 98% (Acros Organics), triflato de 1-tosilato-3-metil-imidazólio ([Tmi][Trif]) 99% (Merck), ácido clorídrico (HCl) 37% (Honeywell), ácido nítrico HNO<sub>3</sub> 65% (PanReac), acetona (Fluka), poli(álcool vinílico) (PVA) (Fluka), solução de glutaraldeído 50% em H<sub>2</sub>O 5,6 M (Fluka), quitina de caranguejo (Sigma Aldrich), cloreto

cianúrico ((NCCL)<sub>3</sub>) 99% (Sigma Aldrich) e glucose (Fisher Scientific) foram utilizados como recebidos, salvo indicação em contrário. Foi utilizada em todas as soluções aquosas água ultrapura (resistividade 18 MΩ-cm, Interlab Sistem Purist UV set).

## **1.2.2 Métodos**

### **1.2.2.1 Síntese dos nanoflúidos**

Os Cdots de glucose (Cdots/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif]) e os de quitina de caranguejo (CdotsCHI/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif]) foram obtidos a partir da adição de [Bmim]Cl à glucose ou à quitina numa proporção de 1:10 (m/m) sob agitação magnética constante, respetivamente. Em seguida, 1 mL de [Tmi][Trif] puro foi adicionado às misturas e deixado a reagir a 100 °C num banho de óleo, durante 1 h. As NPs resultantes foram deixadas a arrefecer à temperatura ambiente. Após arrefecimento, os nanoflúidos resultantes apresentavam uma consistência viscosa. Os Cdots/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] tinham uma coloração castanha, e os CdotsCHI/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] exibiam uma cor laranja. Ambos os materiais permaneceram em diálise durante 72 h. Os nanoflúidos purificados apresentavam uma consistência viscosa à temperatura ambiente e após a liofilização, podem ser facilmente redispersos em água ou noutros solventes sempre que necessário.

### **1.2.2.2 Preparação das Membranas PVA/Nanoflúidos**

As membranas PVA/nanoflúidos foram preparadas dissolvendo 0,5 g de (NCCL)<sub>3</sub> em 20 mL de acetona. Em seguida, foram adicionados 1,0 g de PVA e 10 mL de água. A mistura preparada foi agitada durante 30 min à temperatura ambiente. O sólido foi separado por filtração a vácuo e lavado, primeiro com acetona e depois com água. Cobriu-se o sólido PVA/(NCCL)<sub>3</sub> com uma solução de nanoflúido em acetona (50% m/v). Após 1 h, 100 mg de PVA/nanoflúido foram dissolvidos em 2,0 mL de água, num banho a 80 °C durante 30 min, até à dissolução completa do PVA. Depois de um arrefecimento à temperatura ambiente, adicionou-se 0,05 mL de glutaraldeído aquoso e 0,05 mL de uma solução de HCl 4 M a 0,5 mL de solução PVA/nanoflúido. Uma alíquota de 50 µL foi aplicada sobre uma lâmina de vidro previamente limpa com uma solução de HNO<sub>3</sub> (1:3 v/v) e deixada a secar à temperatura ambiente durante 12 h. Em todos os casos foi formada uma película fina (Figura 1.3).

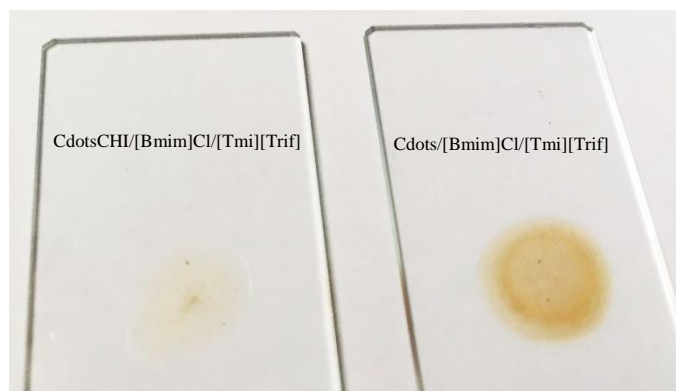


Figura 1.3 – Membranas PVA/nanofluidos

### 1.2.2.3 Caracterização

As medições da condutividade foram realizadas com um medidor de condutividade analógico WPA CM35 com uma sonda caseira com um valor constante de  $0,5468 \text{ cm}^{-1}$ . As medições da viscosidade dinâmica foram efetuadas num reómetro Brookfield DV-II equipado com uma placa cónica (SSA spindle 21). Em cada medição, colocou-se 2 mL da amostra dentro de um adaptador com parede dupla para assegurar a termostatização. Tanto as medições da condutividade como da viscosidade foram adquiridas em função da temperatura (entre os 5 e os 60 °C); recorrendo a um banho termostático Julabo F25. O equipamento tem uma calibração interna fornecida pelo fabricante, e nenhum outro procedimento de calibração foi realizado.

A estabilidade ao longo dos ciclos de secagem/molhagem das membranas foi monitorizada durante um mês para verificar qualquer lixiviação nanofluídica da membrana. A água desionizada onde as membranas foram imersas foi testada ao longo do tempo para avaliar qualquer possível fluorescência residual. Nessas medições utilizou-se um equipamento caseiro composto por um circuito eletrónico para estabilizar a corrente elétrica que alimenta uma fonte de luz constituída por um LED da Roithner Lasertechnik (Ref. LED450-01), um detetor CCD da Ocean Optics (USB2000), e um compartimento de amostragem da Ocean Optics (CUV-ALL-UV 4-way). Em todas as medidas de fluorescência, foram usadas cuvettes de quartzo de 1 cm com uma barra de agitação magnética. O compartimento de amostragem estava sobre um agitador magnético.

## 1.3 Resultados e discussão

### 1.3.1 Conceitos fundamentais

Os Cdots são muito conhecidos pelas suas propriedades fluorescentes, que foram aqui plenamente exploradas. Estes nanoflúidos podem ser utilizados como eletrólitos ou separadores comuns (aquando da imobilização na membrana de PVA). Em qualquer dos casos, a possibilidade de ter uma propriedade (fluorescência) que permita deduzir a estabilidade do eletrólito, bem como o seu aprisionamento bem sucedido na membrana, é de grande interesse. Além disso, as mudanças de fluorescência com a temperatura podem ser seguidas em tempo real apenas irradiando a amostra com uma simples luz negra (ultravioleta UV-A) e um fotodetector. Nos Cdots, é geralmente aceite que o mecanismo de fluorescência depende fortemente da matéria prima e das moléculas de funcionalização. Uma vez que tanto os defeitos de superfície como os grupos químicos de superfície são de extrema relevância nas propriedades óticas das NPs, analisámos a diferença entre a intensidade de fluorescência dos nanoflúidos obtidos a partir da glucose e da quitina.

A figura 1.4(a) mostra que apesar da utilização dos mesmos parâmetros de aquisição de fluorescência (comprimento de onda de excitação e abertura), o perfil de emissão e a intensidade de fluorescência de ambos os nanoflúidos são marcadamente diferentes. De facto, Cdots/[Bmim]Cl tem um comprimento de onda máximo de emissão de 495 nm e um comprimento de onda máximo de excitação de 400 nm. Assim sendo, tem um deslocamento de Stokes de 95 nm. Por outro lado, o deslocamento de Stokes tanto dos Cdots/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] como dos CdotsCHI/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] é de 103 nm (excitação máximo de 400 nm e emissão máxima de 503 nm). É também interessante notar que a largura máxima a meia altura (FWHM) dos nanoflúidos funcionalizados com [Tmi][Trif] são inferiores aos observados para o nanoflúido que contém apenas [Bmim]Cl. Além disso, o FWHM dos Cdots/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] é 13 nm superior (113 nm) ao dos CdotsCHI/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] (97 nm) e 11 nm superior ao do [Tmi][Trif] (Figura 1.4(b)(c)).

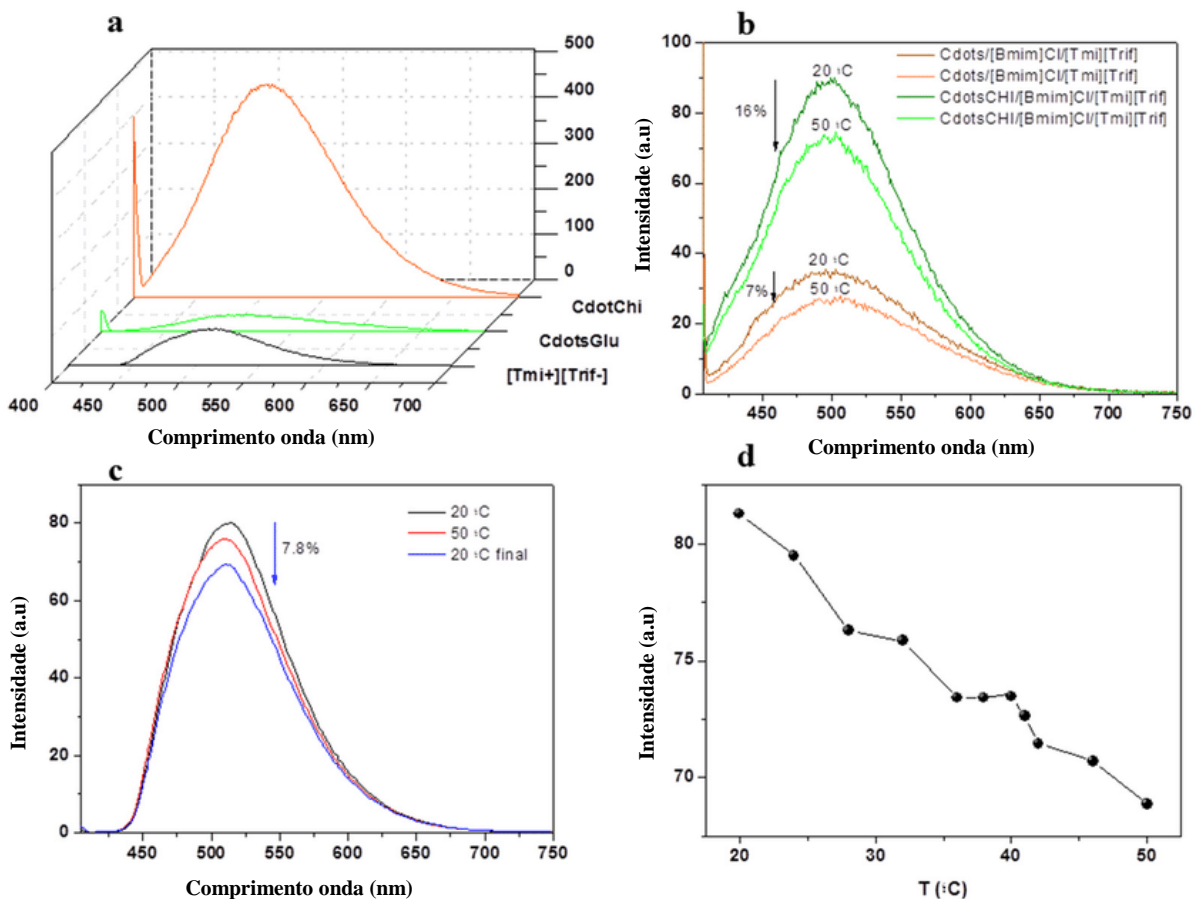


Figura 1.4 - (a) Perfil de emissão de fluorescência dos nanofluidos e do [Tmi][Trif] (comprimento de onda de excitação = 400 nm), (b) Perfil de intensidade de fluorescência da solução aquosa dos nanofluidos adquirida a 20 °C, e no final do primeiro ciclo de aquecimento (50 °C), (c) Intensidade de fluorescência no comprimento de onda máxima de emissão do [Tmi][Trif] (515 nm), em função da temperatura no primeiro ciclo de aquecimento/arrefecimento, (d) Perfil de emissão de fluorescência do [Tmi][Trif] (comprimento de onda de excitação = 400 nm), a 20 °C, à temperatura máxima do primeiro ciclo de aquecimento (50 °C), e a 20 °C no primeiro ciclo de aquecimento/arrefecimento. Adaptado de [41].

O facto da intensidade de fluorescência de ambos os nanofluidos diminuir e o FWHM aumentar com o aumento da temperatura é bastante interessante, uma vez que estudos anteriores atribuíram um FWHM > 100 nm a uma forte interação eletrão-eletrão [42]. Neste sentido, é possível dizer que a 50 °C, estas interações são superiores às observadas a 20 °C.

Outra característica interessante dos nanofluidos e do [Tmi][Trif] é a sensibilidade à temperatura (Figura 1.4(b)-(d)). A figura 1.4(d) mostra também que no primeiro ciclo de aquecimento/arrefecimento, a intensidade de fluorescência do [Tmi][Trif] não atingiu a intensidade de fluorescência inicial, independentemente do tempo que foi deixado à temperatura ambiente. Este efeito é bastante relevante e prova que o aumento da temperatura origina, muito provavelmente, a quebra de algumas ligações de hidrogénio que não foram

reformadas à medida que as moléculas regressavam à temperatura inicial. O resultado foi uma diminuição de 7,8% na intensidade máxima de fluorescência. É ainda relevante notar que este efeito é disfarçado pelos nanoflúidos. De facto, e ainda que apresentem uma tendência semelhante no ciclo de aquecimento/arrefecimento, a perda de fluorescência em cada ciclo não ultrapassa os 1%. Esta sensibilidade à temperatura não se restringe às propriedades de fluorescência. A figura 1.5(a) demonstra claramente que no primeiro ciclo de aquecimento e, considerando os valores obtidos para 50 °C, a introdução do [Tmi][Trif] na superfície dos Cdots foi responsável pelos aumentos de condutividade bastante significativos (de 1,30 mS cm<sup>-1</sup> nos Cdots/[Bmim]Cl a 2,79 mS.cm<sup>-1</sup> nos Cdots/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] e 17,5 mS.cm<sup>-1</sup> nos CdotsCHI/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif]), 54% e 92% de aumento respetivamente. Estes resultados são bastante apelativos, particularmente para o campo dos eletrólitos poliméricos da próxima geração de baterias de lítio/ião de sódio [43]. O número de artigos na literatura que relatam a utilização de Cdots para tal fim é bastante escasso. Ma et al. [43] relataram um novo eletrólito à base de nanocomposto de poli(óxido de etileno) com Cdots ricos em oxigénio que exibiu uma condutividade de 0,139 mS.cm<sup>-1</sup>, um valor significativamente inferior ao obtido aqui usando ILs como os grupos de superfície.

Além disso, estes nanoflúidos apresentam uma característica de auto melhoria durante vários ciclos [39,40], o que é evidente na Figura 1.5(c). Em quatro ciclos consecutivos de aquecimento/arrefecimento, a percentagem de aumento da condutividade nos nanoflúidos Cdots/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] e CdotsCHI/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] quando comparada com os Cdots/[Bmim]Cl foi de 63 e 94%, respetivamente [39,40]. Normalmente, os eletrólitos tendem a degradar-se em ciclos consecutivos; contudo, nestes nanoflúidos, notamos precisamente a tendência oposta (Figura 1.5(b)(c)). A natureza exata deste fenómeno bastante interessante ainda não está totalmente compreendida. No entanto, acreditamos que as armadilhas e os poros na superfície dos NPs, juntamente com a elevada mobilidade dos eletrões dos nanocarbonos e a formação/reformação das ligações de hidrogénio, proporcionam um caminho inovador para a auto melhoria dos nanomateriais, com condutividade cada vez mais elevada.

Esta característica interessante também foi observada em 95% das soluções aquosas dos nanoflúidos (Figura 1.5(b)) mas não no [Tmi][Trif], demonstrando que esta propriedade particular se deve à natureza inerente do nanomaterial e à sua composição química. No entanto, os ILs têm uma boa condutividade (0,14 mS.cm<sup>-1</sup> a 23 °C que sobe para 0,15 mS.cm<sup>-1</sup> a 50 °C).

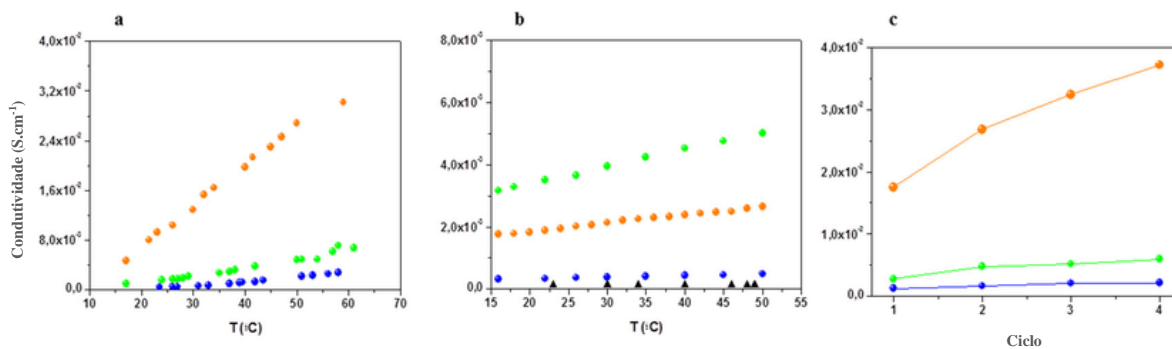


Figura 1.5 - Perfil de condutividade dos (a) nanofluidos originais; (b) 95% (p/p) das soluções aquosas do Cdots/[Bmim]Cl em azul e Cdots/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] em verde CdotsCHI/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] em laranja, e [Tmi][Trif] em preto. (c) Valores de condutividade obtidos a 50 °C após cada ciclo de aquecimento e de arrefecimento dos três nanofluidos originais. Adaptado de [41].

Um possível problema que pode dificultar as aplicações dos nanofluidos como eletrólitos é a sua elevada viscosidade. Ao considerar, por exemplo, a tecnologia das baterias de microcanais, a sua elevada viscosidade poderia levar a um problema de entupimento. O intercâmbio molecular e as forças de coesão contribuem para a viscosidade líquida, mas à medida que a temperatura aumenta, a energia de ligação diminui e, conseqüentemente, a viscosidade líquida também. Esta característica pode ser vista na figura 1.6, onde a viscosidade dinâmica diminui progressivamente com o aumento da temperatura. O nanofluido Cdots/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] tem uma viscosidade dinâmica de 24 Pa.s antes de realizar o primeiro ciclo de aquecimento a 24 °C, enquanto que Cdots/[Bmim]Cl tem 3,1 mPa.s. No primeiro ciclo de aquecimento/arrefecimento, houve uma queda drástica da viscosidade nos Cdots/[Bmim]Cl para 1,5 Pa.s (diminuição de 94%) e 2,2 mPa.s (diminuição de 26%) para os Cdots/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] (Figura 3b). Além disso, a figura 1.6(b) mostra que esta tendência se mantém durante mais de cinco ciclos, e mesmo que a amostra fique em repouso entre ciclos durante mais de 48 h, a viscosidade dinâmica nunca atinge o mesmo valor inicial, o que é típico para fluxos não-Newtonianos. No caso do nanofluido CdotsCHI/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif], houve a formação de estruturas do tipo cristal que pararam a medição da viscosidade dinâmica. Estas estruturas estão muito provavelmente relacionadas com a agregação de partículas [40].

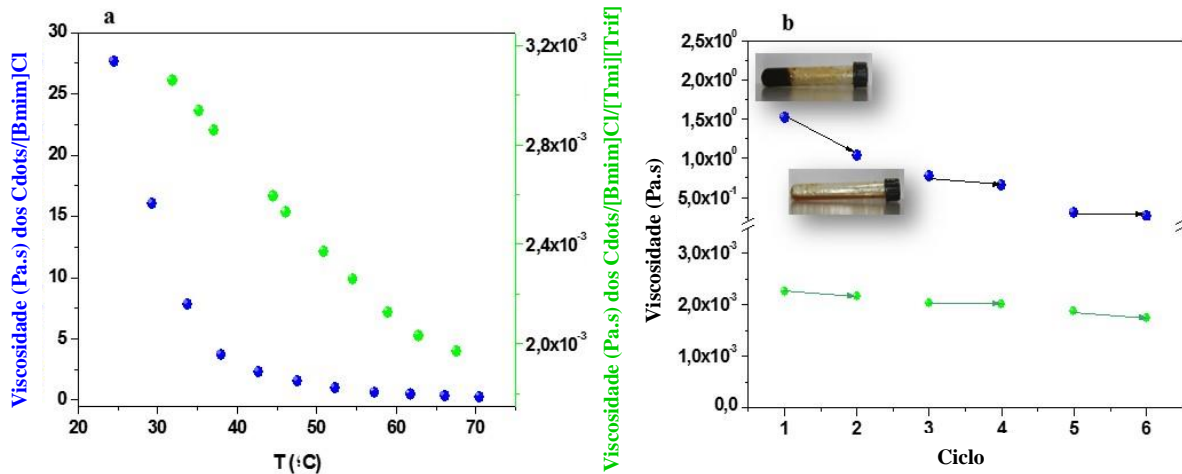


Figura 1.6 - a) Perfil de viscosidade dos nanoflúidos em estado puro e b) valores de viscosidade obtidos a 50 °C após cada ciclo de aquecimento e arrefecimento para Cdots/[Bmim]Cl em azul e Cdots/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] em verde. Inserção: imagens de Cdots/[Bmim]Cl antes do primeiro ciclo de aquecimento e após o arrefecimento. Adaptado de [41].

### 1.3.2 Imobilização dos nanoflúidos

Os resultados obtidos até agora levam-nos a acreditar que estes nanoflúidos são eletrólitos interessantes. No entanto, nós queríamos levar estes materiais para o nível seguinte. A utilização de um eletrólito que pode ser utilizado no estado líquido, mas que também pode ser imobilizado numa membrana compatível com as aplicações energéticas, pode ser uma grande vantagem. O principal problema das baterias de estado sólido é a estabilização das interfaces. As membranas de PVA têm sido propostas como materiais bastante eficientes para separadores em baterias de iões de lítio [43,44]. Neste sentido, imobilizamos os nanoflúidos que exibiam maior condutividade no estado nanofluido, ou seja, os Cdots/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] e os CdotsCHI/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] em membranas de PVA. Para efeitos de comparação, também imobilizamos o [Tmi][Trif] em PVA.

As membranas foram preparadas por ligação cruzada de PVA com glutaraldeído (GA) a 80 °C após uma etapa de ativação fornecida por (NCCl)<sub>3</sub>. Existem vários métodos para a preparação das membranas PVA. Este método combinou duas das opções tradicionais: um reticulador químico, GA e a temperatura, 80 °C (Figura 1.7). A combinação destes dois fatores permite (1) evitar a falta de estabilidade na água que os hidrogéis de PVA não modificados têm, o que nos permitiria limitar o desempenho e integridade do filme [44]; e (2) aumentar a cristalinidade fornecida pela organização das cadeias. De facto, a temperatura de entrada permitiu o estabelecimento de cadeias mais fortes de ligação de hidrogénio entre os grupos hidroxil [45].

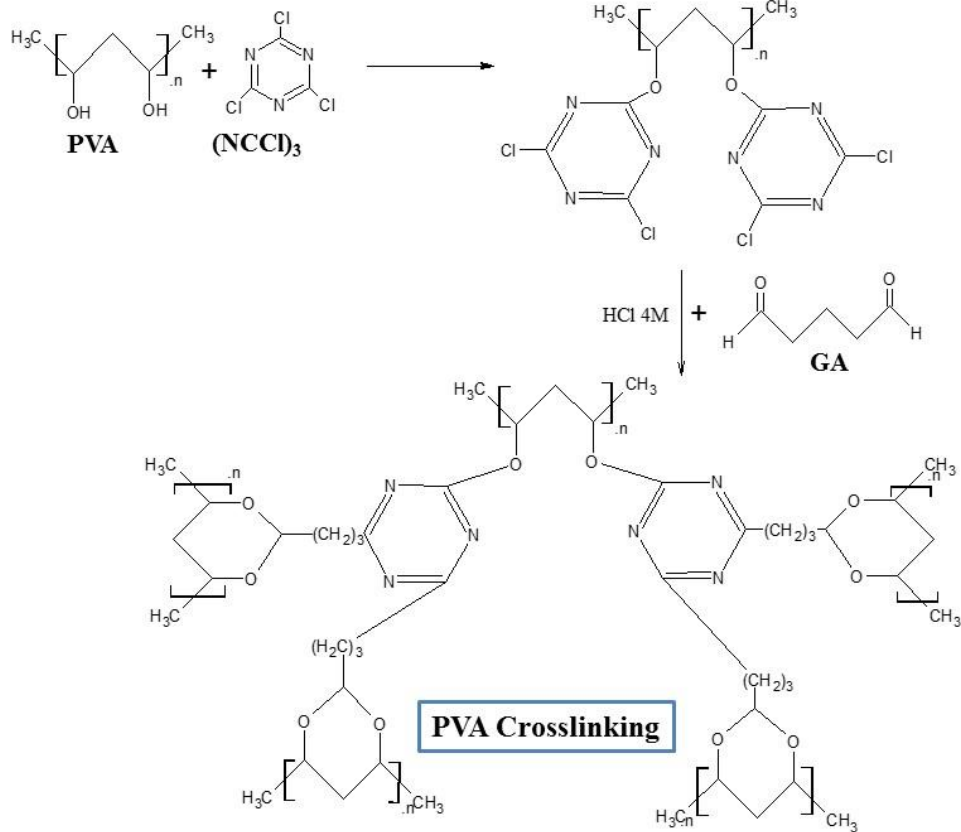


Figura 1.7 - Representação esquemática da formação da membrana de PVA. Adaptado de [45].

O aprisionamento dos Cdots dentro do PVA (Figura 1.8) foi anteriormente realizado usando Cdots com diferentes funcionalizações, que resultou na afinação do índice de refração [46], nos efeitos de forma-memória [47,48] e nos compósitos de aprisionamento de cargas [49]. De facto, e ainda que a reticulação do PVA seja necessária para aumentar a resistência à água, este processo tem um efeito substancial nas propriedades óticas do material aprisionado [50].

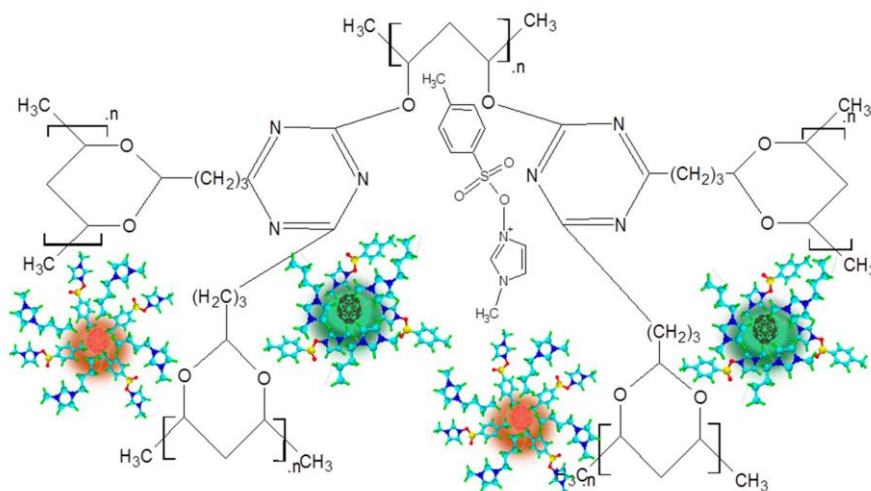


Figura 1.8 - Representação esquemática do aprisionamento de  $[Tmi][Trif]$ ,  $Cdots/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif]$ , e  $Cdots/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif]$  na membrana de PVA. Adaptado de [41].

Todas as membranas de PVA tinham um perfil de fluorescência inicial consistente com a solução aquosa de nanoflúidos e de  $[Tmi][Trif]$  (Figura 1.9). No entanto, notámos que a fluorescência diminuiu com o tempo na produção da membrana. Foi realizado um estudo sistemático a fim de avaliar a estabilidade da fluorescência da membrana com o tempo.

A figura 1.9 mostra que, embora a intensidade de fluorescência inicial de todas as membranas fosse diferente após 180 min, todas exibiram um valor semelhante. Este *quenching* da fluorescência, previamente descrito por Nechifor et al. [50], deve-se à interação química entre as espécies aprisionadas (nanoflúidos e  $[Tmi][Trif]$ ) e o reticulador (GA), o que resulta num aumento do mecanismo de decaimento não-radiativo.

Uma vez que a estabilidade na água foi também um parâmetro importante, e todas as espécies aprisionadas são fluorescentes, realizámos um ensaio adicional onde as membranas foram imersas em água durante 30 min e deixadas a secar à temperatura ambiente durante pelo menos 10 vezes consecutivas. A forma das membranas e a estabilidade foi conservada durante estes ciclos, salientando a sua insolubilidade na água. Além disso, analisámos a intensidade de fluorescência da água onde as membranas foram imersas. Concluiu-se que os nanoflúidos e  $[Tmi][Trif]$  foram presos com sucesso na membrana do PVA e, como tal, o efeito de *quenching* anteriormente observado não se deveu a um fenómeno de lixiviação.

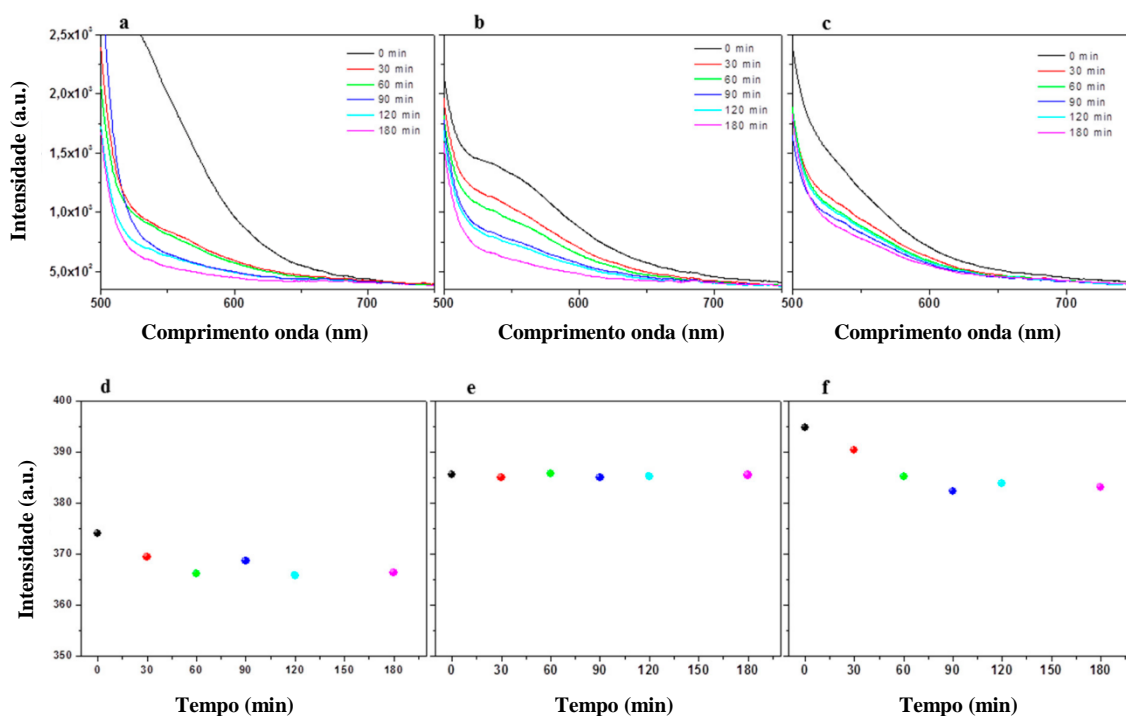


Figura 1.9 - Perfil de intensidade de fluorescência com o tempo de (a,d) [Tmi][Trif], (b,e) Cdots/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif], e (c,f) CdotsCHI/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] presos nas membranas de PVA. Adaptado de [41].

A figura 1.10 mostra imagens não tratadas das membranas produzidas (Figura 1.10(a)), a imagem da fluorescência que é semelhante em todas as membranas PVA com espécies aprisionadas (Figura 1.10(b)), e as imagens de microscopia óptica polarizada (sob polarizadores cruzados) de todas as membranas (Figura 1.10(c)-(e)). Embora o PVA tenha sido utilizado no passado em ecrãs de cristais líquidos [51], o PVA não tratado não exibe birrefringência ótica. No entanto, as membranas de PVA com nanoflúidos aprisionados e [Tmi][Trif] mostram birrefringência. Foi previamente mencionado que o tratamento de temperatura durante a reticulação do PVA poderia levar a um aumento do conteúdo de cristalinidade, e este parece ser o caso. De facto, a presença de ILs termotrópicos (por exemplo, [Bmim]Cl) e as suas interações iónicas tendem a estabilizar as mesofases lamelares devido ao empilhamento ião-ião e a interações eletrostáticas [52,53], o que leva a comportamentos de birrefringência. Este resultado é bastante interessante porque uma característica típica dos cristais e semi-cristais dos ILs é a condutividade iónica, que pode ser aplicada com sucesso no desenvolvimento de novos dispositivos de condutividade de corrente eléctrica anisotrópica [53].

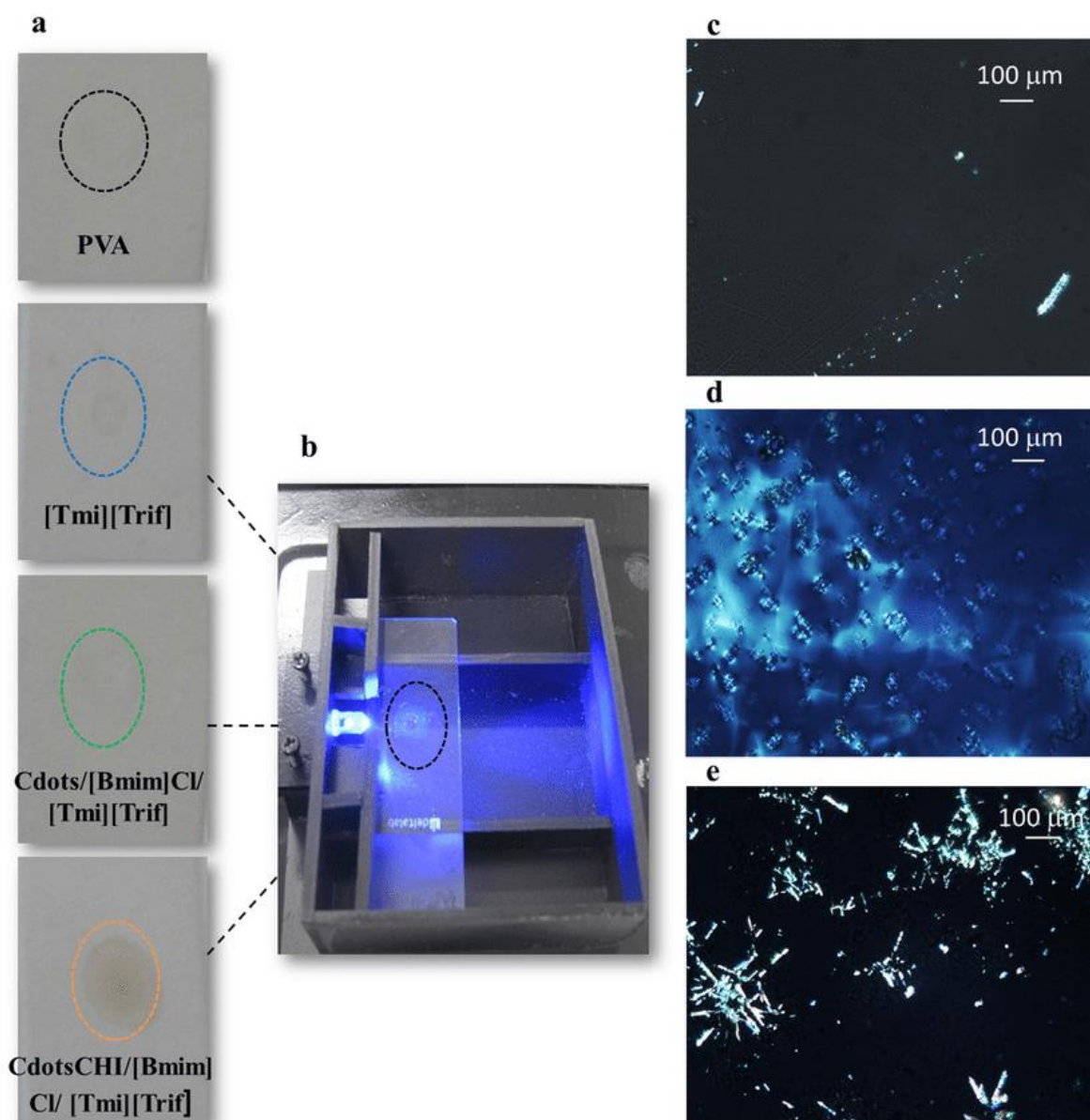


Figura 1.10 - (a) Imagens das membranas de PVA. (b) Imagem da fluorescência adquirida num dispositivo caseiro para medir a fluorescência de sólidos usando um LED de 450 nm como fonte de excitação. Imagens de (c) [Tmi][Trif], (d) Cdots/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif], (e) CdotsCHI/[Bmim]Cl/[Tmi][Trif] presos nas membranas de PVA usando um ângulo de polimerização cruzada de 90°. Adaptado de [41].

## 1.4 Conclusões

A utilização de nanoflúidos na área da energia tem vindo a crescer devido às suas características particulares. Aqui, apresentamos três nanoflúidos baseados em Cdots funcionalizados com dois ILs diferentes. A introdução do [Bmim]Cl e do [Tmi][Trif] permitiu não só a formação do nanoflúido, mas também definiu a sua condutividade protónica.

De facto, apesar do [Tmi][Trif] apresentar uma boa condutividade, este valor é reforçado quando associado com o aprisionamento intrínseco e os poros das NPs. Além disso, os nanoflúidos apresentam uma capacidade de autoaperfeiçoamento caracterizada pelo facto de que nos ciclos de aquecimento/arrefecimento, a condutividade aumenta e a viscosidade diminui, o que é um grande benefício em aplicações energéticas industriais. Estes nanoflúidos foram aprisionados numa membrana de PVA, e apesar do facto de a sua intensidade de fluorescência ter sido atenuada pela interação do nanofluido com o reticulador utilizado, permaneceram dentro da membrana mesmo após vários ciclos de molhagem/secagem. Adicionalmente, após a imobilização, e devido ao processo de reticulação aplicado ao PVA, foi possível detetar estruturas birrefringentes. As suas características visuais e morfológicas não se alteraram após os ciclos de molhagem/secagem e permaneceram constantes durante mais de quatro meses. De facto, estes nanoflúidos podem ser uma interessante abordagem para resolver alguns dos problemas atuais nos campos das baterias de estado sólido e do armazenamento de energia, entre outros.

É preciso recordar que é aceite que a nossa vida num futuro próximo dependerá da utilização de veículos elétricos. A sua utilização generalizada é complicada devido a várias dificuldades no desenvolvimento de baterias de lítio recarregáveis avançadas para o armazenamento de energia. Propriedades como uma elevada área de superfície específica, hierarquizada arquitetura, estabilidade térmica e química elevadas, custo relativamente baixo e natureza benigna, são alguns dos requisitos mais atrativos para estes dispositivos de armazenamento de energia. Nos últimos anos, os nanotubos de carbono e o grafeno foram propostos como dois candidatos extremamente atrativos [38], com um baixo custo e condutividade digna de nota. Mostrámos aqui que a combinação de ILs e Cdots é também muito interessante, levando não só a um aumento da estabilidade térmica e a uma maior condutividade iónica/eletrónica, mas também a uma marcada termosensibilidade, que pode fazer avançar a tecnologia atual.

## **1.5 Perspetivas futuras**

Sendo um tipo de nanopartículas promissoras, os Cdots têm atraído grande atenção devido às suas excelentes propriedades. Seria interessante avaliar a sua interação sob a ação de espécies reativas de oxigénio e de nitrogénio por fluorescência.



## Referências bibliográficas

- [1] K. O. Boakye-Yiadom, S. Kesse, Y. Opoku-Damoah, M. S. Filli, M. Aquib, M. Maviah B. Joelle, M. A. Farooq, R. Mavlyanova, F. Raza, R. Bavi, B. Wang (2019). Carbon dots: Applications in bioimaging and theranostics, *International Journal of Pharmaceutics*, 564.
- [2] F. Wang, Y. H. Chen, C. Y. Liu, D. G. Ma (2011). White light-emitting devices based on carbon dots' electroluminescence, *Chem. Commun*, 47, 3502-3504.
- [3] H. Li, X. He, Z. Kang, H. Huang, Y. Liu, J. Liu, S. Lian, C. H. A. Tsang, X. D. Yang, S. T. Lee (2010). Water-Soluble Fluorescent Carbon Quantum Dots and Photocatalyst Design, *Angew. Chem. Inter. Ed.* 49 (26), 4430–4434.
- [4] S. T. Yang, L. Cao, P. G. Luo, F. Lu, X. Wang, H. Wang, M. J. Meziani, G. Liu, G. Qi, Y. P. Sun (2009). Carbon Dots for Optical Imaging in Vivo, *J. Am. Chem. Soc.* 131, 11308-11309.
- [5] J. P. Ryman-Rasmussen (2007). Surface coatings determine cytotoxicity and irritation potential of quantum dot nanoparticles in epidermal keratinocytes, *J. Invest. Dermatol*, 127, 143-153.
- [6] S. N. Baker, G. A. Baker (2010). Luminescent Carbon Nanodots: Emergent Nanolights, *Angew. Chem. Int., Ed.* 49, 6726-6744.
- [7] H. Li, X. He, Y. Liu, H. Huang, S. Lian, S. T. Lee, Z. Kang (2011). One-step ultrasonic synthesis of water-soluble carbon nanoparticles with excellent photoluminescent properties, *Carbon* 49, 605-609.
- [8] M. V. R. Krishna, R. A. Friesner (1991), Quantum confinement effects in semiconductor clusters, *J. Chem. Phys.* 95, 8309-8315.
- [9] M. Nirmal, L. Brus (1999). Luminescence photophysics in semiconductor nanocrystals, *Acc. Chem. Res.* 32, 407-414.
- [10] S. K. Das, S. U. Choi, W. Yu, T. Pradeep (2007). *Nanofluids: Science and Technology*”, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ.

- [11] N. A. C. Sidik, H. A. Mohammed, O. A. Alawi, S. Samion (2014). A review on preparation methods and challenges of nanofluids, *International Communications in Heat and Mass Transfer*, 54, 115-125.
- [12] S. U. Choi (2009). Nanofluids: from vision to reality through research, *Journal of Heat Transfer*, 131(3), 033106.
- [13] Yu, W., France, D. M., Routbort, J. L., & Choi, S. U. (2008). Review and comparison of nanofluid thermal conductivity and heat transfer enhancements. *Heat Transfer Engineering*, 29(5), 432-460.
- [14] Das, S. K., Choi, S. U., & Patel, H. E. (2006). Heat transfer in nanofluids – a review. *Heat transfer engineering*, 27(10), 3-19.
- [15] S. A. Khan, M. A. Atieh, M. Koç (2018). Micro-Nano Scale Surface Coating for Nucleate Boiling Heat Transfer: A Critical Review, *Energies* 11, 3189.
- [16] P. Wasserscheid, T. Welton (2008). *Ionic liquids in synthesis*, VCH-Wiley, Weinheim.
- [17] K. Ghandi (2014). A review of ionic liquids, their limits and applications, *Green Sustain Chem*, 4, 44-53.
- [18] T. Fukushima, T. Aida (2007). Ionic liquids for soft functional materials with carbon nanotubes, *Chem-A Eur J*. 13, 5048-5058.
- [19] A.-A. Minea, W. M. El-Maghlany (2017). Natural convection heat transfer utilizing ionic nanofluids with temperature-dependent thermophysical properties, *Chemical Engineering Science* 174, 13-24.
- [20] K. Oster, C. Hardacre, J. Jacquemin, A.P.C. Ribeiro, A. Elsinawi (2018). Understanding the heat capacity enhancement in ionic liquid-based nanofluids (ionanofluids), *Journal of Molecular Liquids* 253, 26-339.
- [21] P. Cao, Y. Li, Y. Wu, H. Chen, J. Zhang, L. Cheng, T. Niu (2019). Role of base fluid on enhancement absorption properties of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/ionic liquid nanofluids for direct absorption solar collector, *Solar Energy* 194, 923-931.
- [22] B. Bakthavatchalam, K. Habib, R. Saidur, B. B. Saha, K. Irshad (2020). Comprehensive study on nanofluid and ionanofluid for heat transfer enhancement: A review on current and future perspective, *Journal of Molecular Liquids* 305, 112787.

- [23] European Commission. “A Roadmap for moving to a competitive low carbon economy in 2050”. 2011. <http://eurlex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/?uri=CELEX:52011DC0112> (acedido em 10 de outubro de 2019).
- [24] <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2019/summary/> (acedido em 10 de outubro 2019)
- [25] T. Placke, R. Kloepsch, S. Dühnen, M. Winter (2017). Lithium ion, lithium metal, and alternative rechargeable battery technologies: the odyssey for high energy density, *J. Solid State Electrochem.* 21, 1939–1964.
- [26] T. Inoue, K. Mukai (2017). Are all-solid-state lithium-ion batteries really safe? Verification by differential scanning calorimetry with an all-inclusive microcell, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9, 1507–1515.
- [27] T. Bartsch, F. Strauss, T. Hatsukade, A. Schiele, A.Y. Kim, P. Hartmann, J. Janek, T. Brezesinski (2018). Gas evolution in all-solid-state battery cells, *ACS Energy Lett.* 3, 2539–2543.
- [28] T. Famprakis, P. Canepa, J. A. Dawson, M. S. Islam, C. Masquelier (2019). Fundamentals of inorganic solid-state electrolytes for batteries, *Nat. Mater.* 18, 1476–4660.
- [29] “The Future of Batteries workshop - preparing a European initiative on future battery technologies.” *Energies* 2020. <https://ec.europa.eu/digital-single-market/en/news/future-batteries-workshop-preparing-european-initiative-future-battery-technologies> (acedido em 10 de outubro de 2019).
- [30] N. Dolatabadi, R. Rahmani, H. Rahnejat, C. P. Garner (2019). Thermal conductivity and molecular heat transport of nanofluids, *RSC Adv.* 9, 2516–5124.
- [31] Z. Zheng, Q. Jing, Y. Xie, D. Zhang (2019). An Investigation on the Forced Convection of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-water Nanofluid Laminar Flow in a Microchannel Under Interval Uncertainties, *Appl. Sci.* 9, 432–432.
- [32] S. Choi, D. A. Siginer, H. P. Wang (1995). Enhancing Thermal Conductivity of Fluids with Nanoparticles. In *Developments and Applications of Non-Newtonian Flows*, Eds., ASME FED: New York, USA.

- [33] J. Sarkar, P. Ghosh, A. Adil (2015). A review on hybrid nanofluids: Recent research, development and applications, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 43, 164–177.
- [34] H. Younes, A. A. Ghaferi, I. Saadat, H. P. Hong (2016). Nanofluids Based on Carbon Nanostructures. In *Advances in Carbon Nanostructures*, S. Eds, BoD–Books on Demand: Norderstedt, Germany.
- [35] Z. Said, M. El Haj Assad, A. A. Hachicha, E. Bellos, M. A. Abdelkareem, D. Z. Alazaizeh, B. A. Yousef (2009). Enhancing the performance of automotive radiators using nanofluids, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 112, 183–194.
- [36] D. R. MacFarlane, N. Tachikawa, M. Forsyth, J. M. Pringle, P. C. Howlett, G. D. Elliott, J. H. Davis, M. Watanabe, P. Simon, C. A. Angell (2014). Energy applications of ionic liquids, *Energy Environ. Sci.* 7, 232–250.
- [37] Y. Lu, K. Korf, Y. Kambe, Z. Tu, L. A. Archer (2013). Ionic-Liquid–Nanoparticle Hybrid Electrolytes: Applications in Lithium Metal Batteries, *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 488–492.
- [38] A. A. Minea, S. M. Sohel Murshed (2018). A review on development of ionic liquid based nanofluids and their heat transfer behavior, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 91, 584–599.
- [39] H. M. R, Gonçalves, R. F. P. Pereira, E. Lepleux, T. Carlier, L. Pacheco, S. Pereira, A. J. M. Valente, E. Fortunato, A. J. Duarte, V. de Zea Bermudez (2019). Nanofluid Based on Glucose-Derived Carbon Dots Functionalized with [Bmim]Cl for the Next Generation of Smart Windows, *Adv. Sustainable Syst.* 3, 1900047.
- [40] H. M. R, Gonçalves, R. F. P. Pereira, E. Lepleux, T. Carlier, L. Pacheco, A. J. Duarte, V. de Zea Bermudez. Non-Newtonian Thermosensitive Carbon Dots Nanofluid (submitted recently).
- [41] H. M. R. Gonçalves, Susana A.F. Neves, Abel Duarte, and Verónica de Zea Bermudez. (2020). Nanofluid Based on Carbon Dots Functionalized with Ionic Liquids for Energy Applications, *Energies* 13, 3: 649.
- [42] P. Yu, X. Wen, Y. R. Toh, J. Tang (2012). Temperature-Dependent Fluorescence in Carbon Dots, *J. Phys. Chem. C.* 116, 25552–25557.

- [43] C. Ma, K. Dai, H. Hou, X. Ji, L. Chen, D. G. Ivey, W. We (2018). High Ion-Conducting Solid-State Composite Electrolytes with Carbon Quantum Dot Nanofillers, *Adv. Sci.* 5, 1700996–1701005.
- [44] Q. B. Hoang, V. T. Mai, D. K. Nguyen, D. Q. Truong, X. D. Mai (2019). Crosslinking induced photoluminescence quenching in polyvinyl alcohol-carbon quantum dot composite, *Mater. Today Chem.* 12, 166–172.
- [45] J. Pandey, F. M. Qayoom, A. Shukla (2014). Synthesis of silica immobilized phosphotungstic acid (Si-PWA)-poly(vinyl alcohol) (PVA) composite ion-exchange membrane for direct methanol fuel cell, *Int. J. Hydrog. Energy* 39, 9473–9481.
- [46] S. Wu, W. Li, W. Zhou, Y. Zhan, C. Hu, J. Zhuang, H. Zhang, X. Zhang, B. Lei, Y. Liu (2018). Large-scale one-step synthesis of carbon dots from yeast extract powder and construction of carbon dots/PVA fluorescent shape memory material, *Adv. Opt. Mater.* 6, 1701150.
- [47] G. Yang, X. Wan, Y. Liu, R. Li, Y. Su, X. Zeng, J. Tang (2016). Luminescent poly (vinyl alcohol)/ carbon quantum dots composites with tunable water-induced shape memory behavior in different pH and temperature environments, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8, 34744–34754.
- [48] K. N. Ambasankar, L. Bhattacharjee, S. K. Jat, R. R. Bhattacharjee, K. Mohanta (2017). Study of electrical charge storage in polymer-carbon quantum dot composite, *Chemistry Select.* 2, 4241–4247.
- [49] Y. Cui, R. S. Zola, Y. C. Yang, D. K. Yang (2012). Alignment layers with variable anchoring strengths from polyvinyl alcohol, *J. Appl. Phys.* 111, 063520.
- [50] C. D. Nechifor, M. Postolache, R. M. Albu, A. I. Barzic, D. O. Dorohoi (2019). Induced birefringence of rubbed and stretched polyvinyl alcohol foils as alignment layers for nematic molecules, *Polym. Adv. Technol.* 30, 2143–2152.
- [51] C. D. Nechifor, E. Angheluta, D. O. Dorohoi (2010). Birefringence of etired poly (vinyl alcohol) (PVA) foils, *Plast. Mater.* 47, 164–166.
- [52] K. V. Axenov, S. Laschat (2011). Thermotropic Ionic Liquid Crystals, *Materials* 4, 206–259.
- [53] K. Binnemans (2005). Ionic liquid crystals, *Chem. Rev.* 105, 4148–4204.



## Capítulo 2 - Sensor *turn-on*, fotoestável, não tóxico e específico para o ferro(II)

### 2.1 Introdução

Os íons metálicos são necessários em numerosas reações biológicas no corpo humano. O ferro é o metal de transição mais abundante nos humanos e a sua homeostasia é cuidadosamente mantida [1]. Uma perturbação na concentração de ferro no organismo pode desencadear eventos de stress oxidativo e está associada a várias doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, Alzheimer e múltiplos tipos de cancro, entre outras patologias [2], [3], daí que a determinação da sua disponibilidade biológica seja extremamente importante. No passado uma deficiência de ferro era bastante comum, hoje em dia o problema quase que se inverte e o número de sobrecargas crónicas de ferro na população mundial tem vindo a aumentar.

Devido ao facto do ferro ter dois estados de valência,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , que são facilmente intercambiáveis, é difícil detetar com precisão um deles [4]. A complexidade de íons metálicos em ambiente biológico precisa de ser cuidadosamente abordada porque existem numerosos elementos que podem reagir de forma semelhante. Atualmente, os métodos de deteção de íons ferrosos requerem instrumentos caros, operações complexas, difíceis pré-tratamentos de amostras e raramente atuam em tempo real. A este respeito, é de grande importância desenvolver um método novo e simples para a determinação do  $\text{Fe}^{2+}$ .

Os métodos de deteção seletiva de espécies intracelulares de ferro sob a forma de Fe(II) têm tido uma grande procura devido à sua importância no stress oxidativo. A técnica de fluorescência é um dos métodos mais poderosos para monitorizar processos biológicos, especialmente para detetar espécies de vida curta como o Fe(II) catalítico em células vivas. De facto, a bioimagem de íons metálicos *in vivo* é um campo de investigação em rápido crescimento e desafiante [5]. No entanto, é bastante importante que o sensor fluorescente seja biocompatível antes e após a reação com a substância a analisar. É também desejável uma cinética rápida na água sob restrições biológicas de pH fisiológico, elevado teor de sal e grande excesso de tióis nucleófilos reativos, tais como glutatona e cisteína [6]. Tendo em conta estes fatores, foram obtidos alguns resultados interessantes utilizando sensores de ferro fluorescentes [7-11]. Devido aos eletrões não emparelhados ou orbitais parcialmente cheias, típico dos íons metálicos, estes sensores são baseados na diminuição da intensidade da fluorescência

(*quenching*). Este fenómeno foi observado pela primeira vez em 1919 por Stern e Volmer que determinaram a sua relação com a deteção da fluorescência [12]. O *quenching* ocorre através de uma reação bimolecular entre uma molécula luminescente excitada,  $M^*$ , e uma molécula *quencher* externa,  $Q$ . A molécula fluorescente absorve luz e passa para um estado excitado. Quando estas duas moléculas interagem, a molécula fluorescente decompõe-se por mecanismos não-radiativos com uma constante de desexcitação  $k_q$  (Figura 2.1). A passagem de  $M^*$  para o estado fundamental também acontece na ausência de um *quencher*, mas a sua presença origina uma diminuição de intensidade da fluorescência mais rápida. Os mecanismos de *quenching* são fotofísicos, isto é, após todos os processos de desativação o fluoróforo regressa ao estado fundamental inalterado,  $M$  [13]. O tempo de vida do estado excitado ou tempo de vida de fluorescência,  $\tau''$ , é dado pelo tempo médio durante o qual as moléculas permanecem no estado excitado.

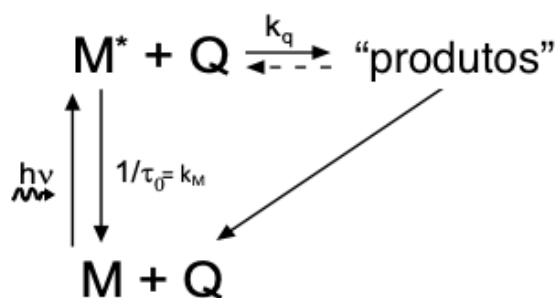


Figura 2.1 - Diagrama simplificado do processo de *quenching*. Adaptado de [13].

Existem dois métodos disponíveis comercialmente baseados no *quenching* para a monitorização do ferro em células vivas: PG-SK [14-15] e Calcein [14], [16]. Tang et al. [17] também relataram um novo sensor fluorescente para a deteção seletiva de Fe(II). No entanto, o mecanismo de resposta do sensor baseia-se nos efeitos de *quenching* do Fe(II) através da quelação. Sensores *turn-off* como estes apresentam alguns problemas de bioimagem, porque se o fenómeno de *quenching* não for completo, a quantificação ou mesmo a observação de alterações significativas na intensidade da fluorescência pode não ocorrer [7]. Tem havido algum esforço por parte da comunidade científica no sentido de desenvolver sensores de ferro *turn-on* de fluorescência. De facto, uma resposta do tipo *turn-on* fornece um sinal brilhante contra um fundo escuro, o que maximiza a resolução espacial e permite uma discriminação superior entre o ruído e o sinal, aumentando assim a capacidade do sensor para a deteção e quantificação da substância a analisar. Esposito et al, [18] desenvolveram um sensor fluorescente de Fe(II) para monitorização intracelular baseado em 1,2,3 dihidro-rodamina.

Apesar de ser uma abordagem apelativa, é um sensor indireto e não seletivo, eficaz para uma vasta gama de espécies reativas de oxigénio produzidas por reações catalíticas mediadas por Fe(II). Outros sensores fluoróforos orgânicos interessantes têm vindo a ser desenvolvidos ao longo dos anos. Os que parecem apresentar os limites de deteção mais interessantes baseiam-se em novos sensores fluorescentes de base Schiff [19], rodamina B [20], [21] e derivados cumarínicos [22]. No entanto, requerem geralmente procedimentos de síntese química orgânica extensivos, solventes orgânicos tóxicos e procedimentos de purificação dispendiosos/demorados [23]. Além disso, é normal que o sensor exija uma etapa inicial de dissolução num solvente orgânico [19-25] ou uma mistura de solventes orgânicos e água [12], [19], [24].

O Fe(II) pode ser facilmente oxidado a Fe(III) em condições aeróbias aquosas, pelo que é bastante difícil desenvolver um sensor específico para este ião. De facto, esta capacidade de doar e aceitar eletrões com relativa facilidade é uma das suas características mais atrativas e é provavelmente a razão pela qual este elemento assume tal importância em meios biológicos, no entanto, é também a razão pela qual é tão difícil desenvolver um sensor biocompatível. Existem várias técnicas para a deteção de Fe(II), nomeadamente, espectroscopia de absorção [26], espectrofotometria [27], métodos eletroquímicos [26] e colorimetria [29]. No entanto, a técnica de fluorescência é uma ferramenta poderosa que tem a simplicidade dos ensaios e a fiabilidade como principais vantagens em relação às técnicas mais tradicionais.

A fluoresceína (FL) (Figura 2.2(a)) é bastante comum e acessível [30-32]. Entre outras fluoresceínas, os derivados que contêm os grupos NH<sub>2</sub> são de especial interesse porque servem de suporte para reagentes mais complicados. Uma das propriedades mais interessantes destes amino-derivados é a sua capacidade de conversão de um estado não fluorescente para um estado fluorescente, dependendo de fatores externos ou internos. Observou-se que, quando em solução, a fluoresceína é facilmente reduzida por zinco sólido em meio ácido [33], com base na redução da 1',7'-diclorodihidrofluoresceína reduzida e da dihidrorodamina [34], uma estrutura provável de fluoresceína reduzida é mostrada na Figura 2.2(b).

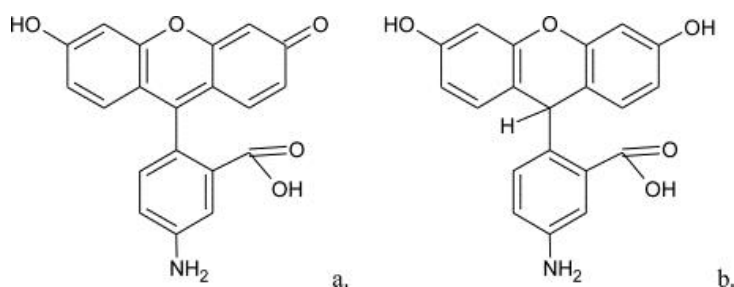


Figura 2.2 - Estruturas químicas de fluoresceína (a) e provável redução da fluoresceína (b). Adaptado de [35].

## 2.2 Materiais e Métodos

### 2.2.1 Materiais

Fluoresceinamina, pó de zinco, cloreto de tris hidroxilmetilamônio, citrato trissódico, sulfato de ferro(II) heptahidratado, cloreto de estrôncio hexahidratado, sulfato de amônio(II) hexahidratado, sulfato de amônio(III) dodecahidratado, 1,10-fenantrolina, ácido mercaptoacético (ácido tioglicólico), glucose e etanol foram comprados à Sigma-Aldrich Química. Hidróxido de sódio, ácido clorídrico, cloreto de ferro(III), hexacianoferrato de potássio(III), hexacianoferrato de potássio(II) trihidratado, molibdato de sódio desidratado, cloreto de níquel(II) hexahidratado, nitrato de chumbo(II), cloreto de manganês(II) tetrahidratado, cloreto de cobre(II), cloreto de sódio, cloreto de cobalto(II) hexahidratado, nitrato de mercúrio(II), nitrato de sódio, cloreto de cádmio monohidratado, dicromato de potássio, cromato de potássio, sulfato de potássio, acetato de amônio, ácido acético, nitrato de zinco tetrahidratado, borohidreto de sódio, telúrio, hidrogenofosfato dipotássico, dihidrogenofosfato de potássio foram obtidos na Merck. Foi utilizada água desionizada em todas as experiências com resistividade superior a  $4 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ .

### 2.2.2 Métodos

#### 2.2.2.1 Redução da Fluoresceinamina

A preparação da fluoresceinamina reduzida (RFL) foi realizada através de um método de redução com zinco metálico em meio ácido, anteriormente relatado em Duarte et al [35]. Diluir 1,4 mL de uma solução de fluoresceinamina (FL) ( $1,45 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) com ácido clorídrico (0,1 M) até um volume final de 14,0 mL, obtendo-se assim uma solução de trabalho FL de  $1,45 \times 10^{-4} \text{ M}$ . Para obter a RFL adiciona-se 0,5 g de pó de zinco à solução de trabalho FL e agita-se até que a fluorescência e a cor amarela desapareçam. Esta mistura fica a reagir durante 30 min. Após centrifugação, 5,0 mL da solução RFL obtida foi diluída com 10,0 mL de tampão tris (pH 7,4) e 4,7 mL de hidróxido de sódio (0,1 M) em quantidades iguais. Esta solução é estável durante pelo menos duas horas quando devidamente acondicionada.

### 2.2.2.2 Medições de rendimento quântico de fluorescência

Os rendimentos quânticos (QY) foram determinados comparando as intensidades de fluorescência e absorção integradas com um fluoróforo de referência, neste caso sulfato de quinina em ácido clorídrico 0,1 M (QY = 0,54) [36]. A medição do rendimento quântico da referência (sulfato de quinina), da FL e da RFL em contacto com o Fe(II) foi realizada preparando uma solução concentrada de  $1 \times 10^{-5}$  M, que foi diluída de modo a obter valores de absorvância inferiores a 0,1 para minimizar os efeitos de reabsorção. Os espectros de fluorescência foram medidos no comprimento de onda máximo de emissão, por exemplo,  $\lambda_{exc} = 480$  nm para o sulfato de quinina e  $\lambda_{exc} = 450$  nm para a FL e a RFL.

O rendimento quântico foi calculado usando a seguinte equação 2.1 [37]:

$$\Phi_x = \Phi_{ref} \left( \frac{Grad_x}{Grad_{ref}} \right) \left( \frac{\eta_x^2}{\eta_{ref}^2} \right) \quad \text{Equação 2.2.1}$$

onde os subscritos ref e x referem-se respetivamente à referência e à amostra, Grad o gradiente da parcela, que corresponde à intensidade de fluorescência integrada vs absorvância e  $\eta$  o índice de refração do solvente que foi considerado igual a 1.

### 2.2.2.3 Titulações de iões metálicos e pH

O tampão tris (pH 7,4) foi preparado por dissolução e mistura de  $50 \times 10^{-3}$  M de cloreto tris hidroximetilamónio e  $20 \times 10^{-3}$  M de citrato trissódico. O pH foi ajustado com hidróxido de sódio. Todas as soluções aquosas de metais foram preparadas por conveniente pesagem, dissolvendo e diluindo o respetivo sólido com água desionizada. Após a preparação das soluções aquosas padrão, a sua influência na fluorescência da RFL foi testada realizando medições comuns de fluorescência. As soluções aquosas padrão de FeSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, MnCl<sub>2</sub>, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, NiNO<sub>3</sub>, CoCl<sub>2</sub>, SrCl<sub>2</sub>, NaCl, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, citrato de sódio e ácido cítrico foram preparadas em água com concentrações de  $5,00 \times 10^{-4}$  M. Numa medição de fluorescência comum, 0,100 mL de uma solução metálica foram adicionados a 2,40 mL da solução RFL diluída em tampão tris (pH 7,4), usando os seguintes parâmetros de fluorescência: 10 s de tempo de integração, 450 nm de comprimento de onda de excitação e uma cuvette de quartzo de 1 cm.

A determinação do Fe(II) em amostras reais foi realizada utilizando o método da fenantrolina

descrito nos Métodos Padrão. A solução de fenantrolina foi preparada dissolvendo 100 mg em 100 mL de água desionizada, seguida pela adição de três gotas de ácido clorídrico concentrado. A solução tampão de acetato de amônio foi feita dissolvendo 250 g de acetato de amônio com 150 mL de água desionizada e adicionando 700 mL de ácido acético concentrado.

As medições de absorvância foram efetuadas da seguinte forma: 5 mL de cada amostra foram adicionados a 0,10 mL de ácido clorídrico concentrado, 2 mL de solução fenantrópica e 1 mL de tampão de acetato de amônio. A mistura foi deixada a agitar durante 10 min. e depois a absorvância foi medida.

A fim de efetuar medições de pH, foi necessário preparar uma solução de reserva de fluoresceinamina ( $1,45 \times 10^{-3}$  M). As medições de pH da fluoresceinamina reduzida foram realizadas adicionando diferentes quantidades de ácido clorídrico e hidróxido de sódio, a fim de obter um intervalo de pH de 4-11.

#### **2.2.2.4 Síntese de nanopartículas de CdTe**

Uma solução aquosa de  $\text{Te}^{2-}$  foi preparada pela adição de 12,5 mg de borohidreto de sódio e 20,0 mg de pó de telúrio num frasco de 10 mL com 1,0 mL de água desionizada, mantendo o sistema de desoxigenação durante pelo menos 4 h com um fluxo de azoto. Num frasco de fundo redondo de 250 mL, dissolvemos 0,11 g de cloreto de cádmio em 150 mL de água desionizada. Com agitação constante adicionamos 47,4  $\mu\text{L}$  de ácido mercaptoacético. Removemos o oxigênio da solução de cádmio com um fluxo de azoto e juntamos 0,360 mL de  $\text{Te}^{2-}$ . Aquecemos o frasco até ebulição durante cerca de 2 h, depois de arrefecida a mistura, lavamos as nanopartículas de CdTe duas vezes com etanol. O precipitado fica a secar, sob baixa pressão, à temperatura ambiente.

#### **2.2.2.5 Medições de fluorescência e absorvância**

Todas as medições de fluorescência foram realizadas com um equipamento caseiro contendo um circuito eletrónico para estabilizar a corrente elétrica que alimenta a fonte de luz constituída por LEDs de 450 nm da Roithner Lasertechnik (Ref. LED450-01), um detetor CCD da Ocean Optics (USB2000) ligado a um computador pessoal, um compartimento de amostras da Ocean Optics (CUV-ALL-UV 4-way); uma cuvette de quartzo de 1 cm com uma barra de agitação

magnética. O compartimento de amostras encontra-se sobre um agitador magnético. Os espectros de absorção UV-Vis foram registados num espectrofotómetro Jenway 6405 UV-Vis. Foram utilizadas cuvets padrão de 10 mm em todos os testes.

### 2.2.2.6 Limite de deteção, limite de quantificação, sensibilidade do método e pH

O limite de deteção (DL), o limite de quantificação (QL) e a sensibilidade do sensor são os parâmetros mais importantes a ter em conta na avaliação de um novo sensor para a comunidade científica e, em última análise, para o mercado. Estes parâmetros foram calculados utilizando uma curva de calibração obtida a partir da parcela de intensidade de fluorescência máxima em função do ferro(II):

$$DL = \frac{3,3 \alpha SD}{k} \quad \text{Equação 2.2.2}$$

$$QL = \frac{10 \alpha SD}{k} \quad \text{Equação 2.2.3}$$

onde SD é o desvio padrão do branco e k a inclinação da curva de calibração [38].

Embora a fluoresceinamina mostre um comportamento polielectrólito, a variação da sua intensidade de fluorescência resultante da reação de ionização pode ser linearizada usando uma equação do tipo Henderson-Hasselbalch que permite o cálculo de um  $pK_a$  aparente:

$$pH = pK_a + n \log[(I_{max} - I) \div (I - I_{min})] \quad \text{Equação 2.2.4}$$

onde  $I_{max}$  e  $I_{min}$  são respetivamente o máximo e o mínimo da intensidade de fluorescência da espécie de base ácida ou conjugada e I a intensidade de fluorescência em função do pH.

### 2.2.2.7 Determinação de parâmetros de ligação

A capacidade de deteção da RFL para o Fe(II) pode ser mais explorada utilizando a constante de ligação, o coeficiente de Hill's e a constante de dissociação. Estes parâmetros permitem perceber melhor a força de ligação e a estabilidade da ligação sensor-analito. As constantes de ligação ( $K_b$ ) podem ser obtidas através da equação modificada de Benesi-Hildebrand [39]:

$$\frac{1}{F_x - F_0} = \frac{1}{F_\infty - F_0} + \frac{1}{K_b (F_\infty - F_0)} \frac{1}{[Fe(II)]} \quad \text{Equação 2.2.5}$$

onde  $F_0$ ,  $F_x$  e  $F_\infty$  são a intensidade da fluorescência no zero, numa concentração intermédia e

numa concentração para uma interação completa com Fe(II), respetivamente;  $K_b$  é a constante de ligação e  $[Fe(II)]$  é a concentração da RFL.

A constante de dissociação aparente ( $K_D$ ) e o coeficiente de Hill ( $n$ ) do sistema sensor-analito podem ser estimados pelo gráfico de Hill usando os dados da deteção de fluorescência do Fe(II) [40]:

$$\log \left( \frac{Q}{1-Q} \right) = \log K_D + n \log [Fe(II)], \text{ onde } Q = \frac{F}{F_{max}} \quad \text{Equação 2.2.6}$$

## 2.3 Resultados e discussão

### 2.3.1 Propriedades fluorescentes da FL e da RFL

A fluoresceína é um fluoróforo orgânico que tem sido utilizado há bastante tempo devido à sua forte fluorescência. Até agora, tem sido assumido que a reação de derivação tem pouco ou nenhum efeito sobre as propriedades indicadoras da molécula mãe, desde que o anel de xanteno permaneça insubstituído [41]. Neste trabalho, utilizámos uma molécula orgânica derivada, a fluoresceinamina. Foi relatado anteriormente que quando na presença de zinco sólido a FL é rapidamente reduzida e forma um complexo não fluorescente [35], a fluoresceinamina reduzida (RFL). O que observámos neste trabalho é que quando a solução de RFL é posta em contacto com o Fe(II), as características fluorescentes da FL são rapidamente restauradas, como é possível ver na Figura 2.3. Esta reação reversível é bastante interessante porque indica que a deslocalização eletrónica do anel xanteno é restaurada quando se forma um complexo de FL-Fe(II). Normalmente, este não é o comportamento típico de um fluoróforo em contacto com um ião metálico. De facto, os centros de iões metálicos são na maioria das vezes potentes supressores de estados de excitação fluorescentes devido aos seus eletrões não emparelhados ou orbitais parcialmente preenchidas [7].

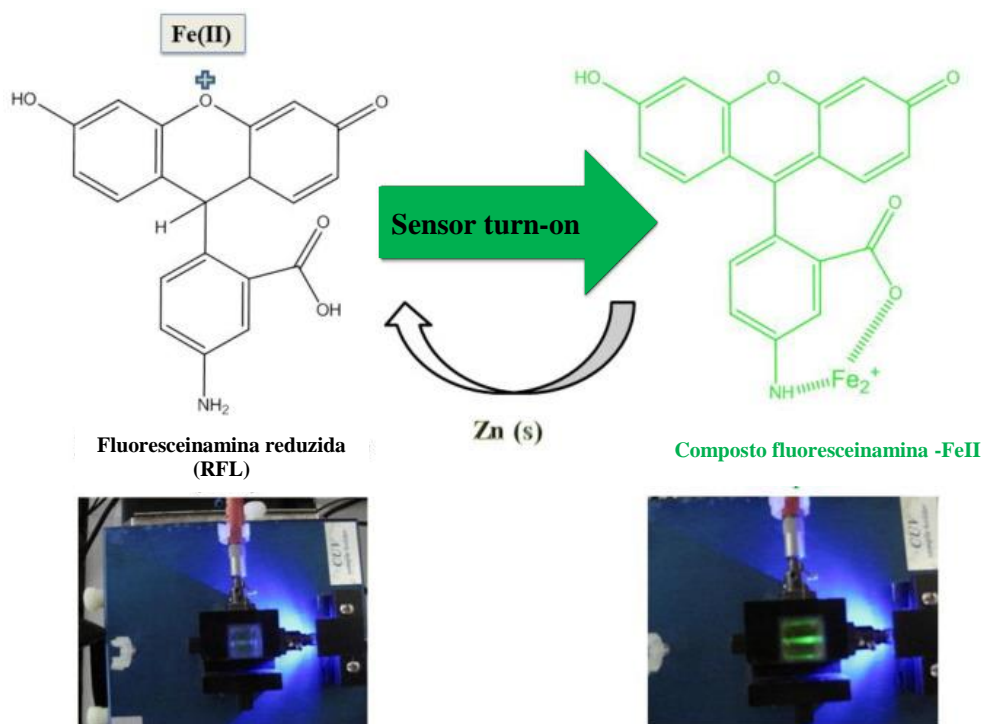


Figura 2.3 - Esquema do comportamento de detecção da fluorescência da RFL. Adaptado de [41].

Para explorar melhor o mecanismo de fluorescência deste fluoróforo orgânico outros metais foram testados. Verificou-se que o Co(II) e o Fe(III) também produziram um complexo fluorescente, Figura 5.4(a). No entanto, a intensidade de fluorescência obtida com a adição de Fe(II) à RFL é 93% e 95% superior à do Co(II) e de Fe(III), respetivamente. Além disso, em todos os casos, houve uma mudança no comprimento de onda de emissão em direção ao azul. Isto é uma indicação de que embora a deslocalização eletrónica do anel xanteno tenha sido restaurada em todos os casos, a energia LUMO do complexo aumentou do Fe(III) para o Co(II) e isto refletiu-se na intensidade de emissão que foi significativamente inferior à do complexo FL-Fe(II) [40]. Esta mudança de emissão é também uma boa forma de discriminar um possível interferente provocado pela presença destas duas espécies na solução teste, por exemplo, o sensor de Fe(II) descrito é altamente específico e pode ser utilizado mesmo na presença de um interferente conhecido. Na figura 2.4(a) é também possível ver que, apesar da RFL em contacto com o Fe(II) ter um deslocamento de Stokes relativamente baixo (65 nm), tem uma boa discriminação entre a excitação e a banda de emissão. Este facto é altamente relevante, particularmente quando se consideram aplicações de bioimagem, uma vez que ajuda a reduzir os artefactos causados pelos efeitos de dispersão da luz de excitação [42]. Outra característica interessante do sensor RFL é a sua fotoestabilidade. De facto, mesmo quando exposto a um comprimento de onda de 450 nm durante 2 h, o efeito de *photobleaching* é quase insignificante

(Figura 2.4(b)). Efetivamente, a maioria dos fluoróforos orgânicos são bastante sensíveis à exposição à luz e são muitas vezes afetados pelo processo irreversível de *photobleaching* que limita o sinal de saída do fluoróforo e a sua aplicabilidade prática [43]. Além disso, a metade da largura máxima (FWHM) é de 41 nm, o que permite a utilização de marcação multicolorida, normalmente utilizada em aplicações de bioimagem [44]. É também importante salientar que o sensor RFL é completamente solúvel em água e, portanto, não requer um veículo que assegure a miscibilidade da água. Esta característica química da RFL é bastante apelativa, uma vez que a maioria dos fluoróforos orgânicos que têm propriedades fotofísicas e/ou biológicas interessantes adequadas à bioimagem, são altamente hidrofóbicos [42]. Embora seja possível utilizar um veículo solvente que seja miscível com água, por exemplo, o dimetilsulfóxido (DMSO) e depois diluir o fluoróforo num meio aquoso antes da sua aplicação, a percentagem do volume final do veículo é geralmente estritamente limitada. Por exemplo, ao utilizar DMSO em experiências de cultura celular, a concentração não deve exceder 1% v/v, uma vez que concentrações mais elevadas são citotóxicas [44].

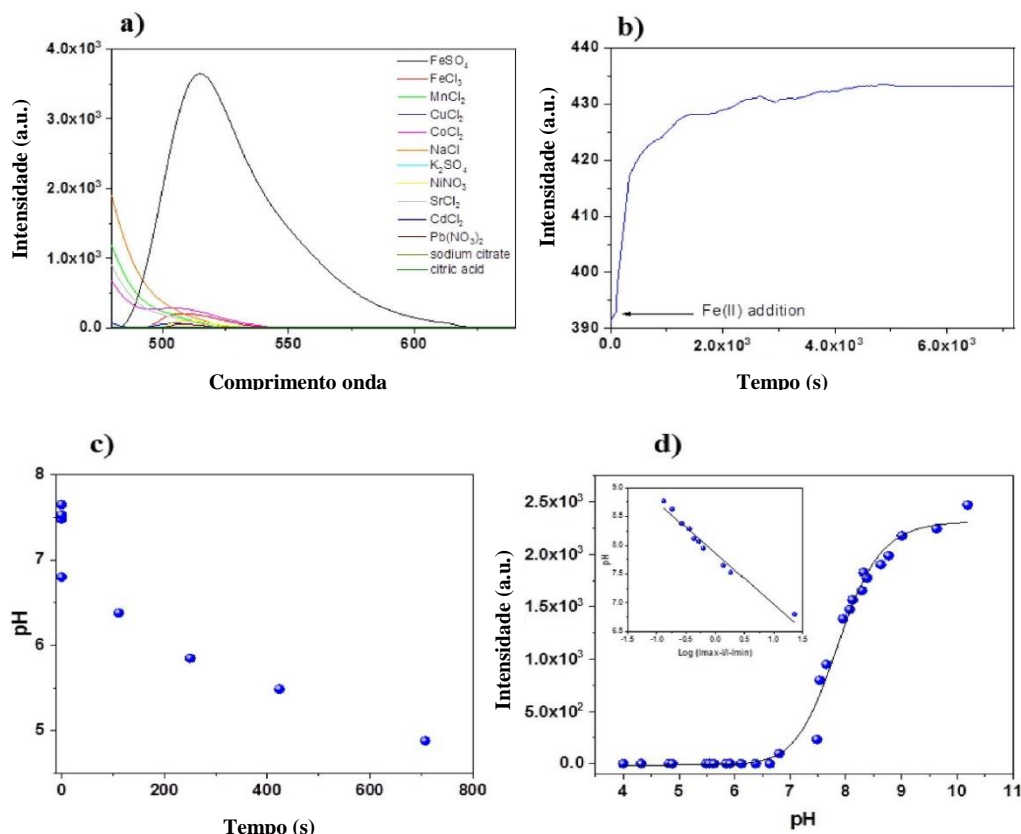


Figura 2.4 - a) Emissão de fluorescência da RFL em contacto com diferentes iões metálicos (Fe(II), Fe(III), Mn(II), Cu(II), Pb(II), Cd(II), Ni(II), SrCl<sub>2</sub>, NaCl, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, citrato de sódio, ácido cítrico e Co(II)) usando um comprimento de onda de excitação de 450 nm e uma concentração de iões metálicos de  $6.70 \times 10^{-2}$  M. b) Efeito de fotobleaching ao longo de 2 h da RFL, mediante a adição de 200  $\mu$ L de solução de reserva de Fe(II) (5 mM). c) Tempo necessário para variação de intensidade de fluorescência com o pH da solução, utilizando um comprimento de onda de excitação de 450 nm. d) Linearização Henderson-Hasselbach do aumento da fluorescência obtida para a gama de pH 6,8-10 para um tempo de aquisição de 10 s. Estes valores representam uma média de pelo menos três medições independentes. Adaptado de [41].

sensibilidade para o pH nesta gama. No entanto, quando a fluorescência foi medida após algum tempo há uma pequena resposta (Figura 2.4(c)). Na gama de pH entre 6,7 e 10, a resposta da fluorescência ao pH é instantânea e tem uma forma sigmoidal que pode ser linearizada utilizando a abordagem de Henderson-Hasselbach. Como é possível ver na figura 2.5(b), foi encontrada uma tendência linear que permitiu a determinação de um pKa aparente de  $7,9 \pm 0,1$ , o que é consistente com o valor determinado por Duong et al [45]. Esta sensibilidade global do pH é relevante para fazer deste sensor um sensor versátil. De facto, é quase insensível abaixo do pH 6,8 e tem um comportamento linear na gama 6,8-10. Isto permite a sua utilização em sistemas biológicos sem ter de considerar o pH como um fator interferente. De facto, no pH fisiológico (7,4) o aumento da fluorescência é de apenas 10 %.

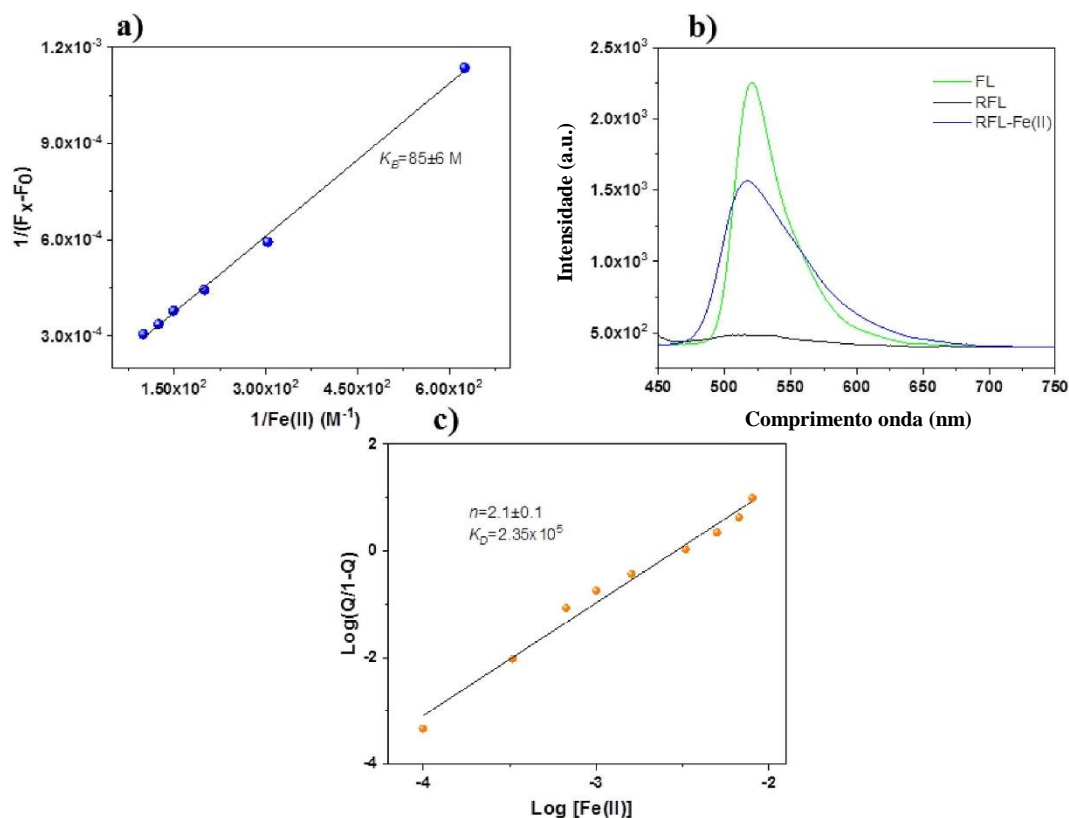


Figura 2.5 - a) Gráfico de Benesi-Hildebrand para a RFL em contacto com quantidades crescentes de Fe(II). b) Espectros de emissão de fluorescência da FL, da RFL e do composto RFL-Fe(II), usando um comprimento de onda de excitação de 450 nm. c) Gráfico de Hill para a RFL em contacto com quantidades crescentes de Fe(II). Estes valores representam uma média de pelo menos três medições independentes. Adaptado de [41].

Ao determinar a possibilidade de utilizar um fluoróforo na bioimagem, é também importante determinar o seu rendimento quântico. O rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_F$ ) pode ser descrito como a relação entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos e reflete a eficiência com que um complexo emite luz. Um rendimento quântico de fluorescência de fluoróforo é altamente dependente do solvente em que é dissolvido. Uma vez que a RFL e a FL são solúveis em água, o  $\Phi_F$  foi determinado usando o sulfato de quinina como referência ( $\Phi_F = 0,54$ ). A RFL por si só não tem sinal de intensidade de fluorescência, como tal, a fim de comparar os sinais obtidos da FL e do complexo RFL-Fe calculámos o  $\Phi_F$  do complexo RFL-Fe. Verificou-se que o  $\Phi_F$  da FL e do complexo RFL-Fe é  $0,22 \pm 0,06$  e  $0,11 \pm 0,03$ , respetivamente. Estes valores de rendimento quântico são competitivos com os fluoróforos orgânicos comuns e comercialmente disponíveis que emitem na gama espectral verde-amarelo. Por exemplo, o NBD (4-nitrobenzeno-2-oxa-1,3-diazol) e seus derivados podem ser utilizados para a deteção de metais em células [46] e como marcadores lipídicos [47] com um  $\Phi_F = 0,3$  [43]. No entanto, e apesar de serem descritos como estáveis em água, ainda requerem a adição de tetrahidrofurano como veículo solvente. Outra família interessante de fluoróforos orgânicos são os derivados do naftaleno. Este grupo de sensores inclui o amarelo Lucifer que é conhecido pelas suas aplicações *in vivo* com um  $\Phi_F$  de 0,27 na água [48].

### 2.3.2 Mecanismo de ligação do Fe(II) à RFL

Com o objetivo de compreender melhor o mecanismo de ligação entre a RFL e o Fe(II), calculou-se a constante de ligação através do modelo de Benesi-Hildebrand (Figura 2.5(a)). Este modelo fornece uma ideia sobre qual a estequiometria de reação. De acordo com os dados obtidos, a constante de ligação é de  $85 \pm 7$  M com um  $R^2$  de 0,9982. Esta tendência linear é uma indicação de uma estequiometria 1:1 [49]. De facto, ao contrário do sensor para o Zn(II) descrito por Johnson et al. [49], o Fe(II) forma um complexo com a RFL usando carboxílico e amina. A deslocalização de eletrões assim obtida é responsável pelo aumento da intensidade de fluorescência devido à formação do complexo e ao desvio máximo de emissão de 6 nm para o azul quando comparado com a FL (Figura 2.5(b)).

Informação adicional sobre o mecanismo de interação entre a RFL e o Fe(II) pode ser obtida utilizando a equação de Hill. De facto, a ligação de um analito a uma macromolécula, pode ser reforçada pela presença de outros ligandos que já interagem com a macromolécula, o que é conhecido como ligação cooperativa positiva. O coeficiente do Hill (constante de dissociação)

fornece uma forma de quantificar o grau de interação entre o ligante e os sítios de ligação da macromolécula [49]. De acordo com o gráfico (Figura 2.5(c)) foi encontrada uma constante de dissociação de  $2,35 \times 10^5$ . Esta ordem de grandeza é uma indicação de que o complexo fluorescente formado entre a RFL e o Fe(II) é muito estável. Além disso, o número de Hill obtido é superior a um ( $n = 2,1 \pm 0,1$ ). Este valor confirma que a interação entre a RFL e o Fe(II) é regida por uma cooperação positiva ( $n > 1$ ), o que está de acordo com as conclusões obtidas a partir do modelo de Benesi-Hildebrand para uma estequiometria 1:1 [49,50].

### **2.3.3 Efeito dos iões metálicos na fluorescência da RFL**

A FL é uma molécula fluorescente relativamente barata que quando em contacto com o zinco em pó perde o seu perfil de fluorescência, produzindo um complexo não emissor: a RFL. Esta perda de fluorescência e o aparecimento de um complexo não emissor normalmente não é bom. No entanto, neste caso particular, abriu caminho para o desenvolvimento de um novo sensor para o Fe(II). Esta espécie de metal é particularmente relevante no ser humano devido à sua abundância e relevância biológica. De facto, o ferro participa em numerosas reações biológicas chave e a necessidade de acompanhar a sua presença e concentração no mecanismo biológico criou a necessidade de um sensor específico para o Fe(II). Esta não é uma tarefa fácil, uma vez que o Fe(II) oxida rapidamente ao Fe(III) e, portanto, o Fe(III) é uma espécie interferente comum no desenvolvimento de um sensor analítico específico para o Fe(II). A RFL atua como um sensor fluorescente de ativação para o Fe(II), uma vez que forma um complexo de fluorescência estável: o RFL-Fe(II). Como é possível ver pela análise da figura 2.6, a intensidade de fluorescência aumenta com a concentração de Fe(II). De facto, foi encontrada uma tendência linear entre estes dois parâmetros com um R2 de 0,9995, e uma inclinação de  $4,78 \times 10^5$  M. De acordo com estes dados foi possível determinar o DL [ $21,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ], o QL [ $65,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ] e a sensibilidade [ $48 \pm 3 (x 10^7) \mu\text{M}$ ] do sistema de deteção. Estes valores são bastante interessantes e competitivos. Além disso, o nível de ferro no soro humano para os homens varia de 14 a 32  $\mu\text{M}$  e de 11 a 29  $\mu\text{M}$  para as mulheres [51], tornando possível a utilização do sensor RFL para fins de deteção.

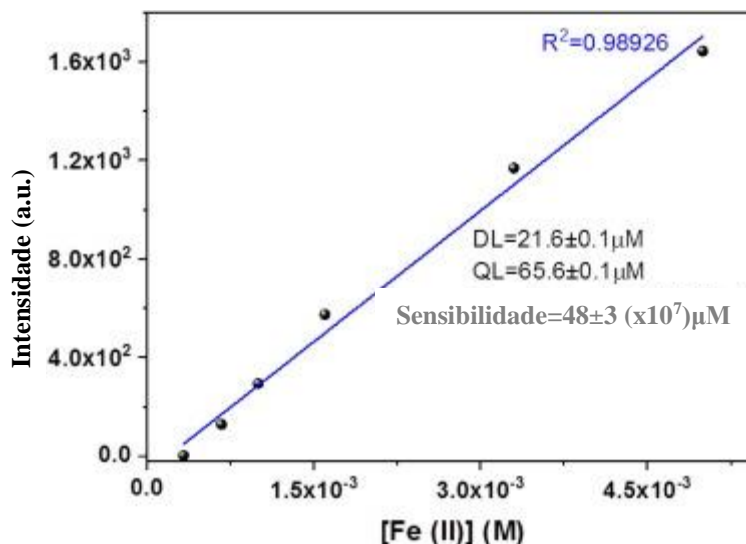


Figura 2.6 - Variação da intensidade de fluorescência da RFL em contacto com Fe(II) numa gama de concentração de  $3,30 \times 10^{-6}$  -  $6,70 \times 10^{-2}$  M e um comprimento de onda de excitação de 450 nm. Estes valores representam uma média de pelo menos três medições independentes. Adaptado de [41].

Para determinar possíveis interferentes, foram testados vários iões metálicos e verificou-se que o Co(II) e o Fe(III) também reagem com a FL (Figura 5.4(a)). O Co(II) é um interferente comum na deteção de Fe(II). Contudo, quando consideramos os mamíferos é necessário ter em conta que o Co(II) está presente sob a forma de cobalamina (vitamina B12) e que o ião cobalto nesta forma está fortemente ligado e normalmente não é um interferente relevante. No entanto, o aumento da fluorescência é significativamente inferior ao observado para o Fe(II) e há um desvio máximo do comprimento de onda de emissão para o azul de 68 nm. Este desvio é suficiente para desenvolver um sistema ratiométrico, se se considerar necessário. No caso do Fe(III), o aumento é ainda mais baixo e quase insignificante.

## 2.4 Conclusões

Neste trabalho, foi desenvolvido um sensor específico para o Fe(II), baseado no fluoróforo orgânico fluoresceinamina reduzida (RFL). Este sensor foi testado para outros analitos que normalmente atuam em meios biológicos e foi determinado que apenas respondia ao Co(II). No entanto, mesmo na concentração máxima de iões,  $6,70 \times 10^{-2}$  M, o sinal de fluorescência desta interferência é apenas 7% quando comparado com o Fe(II) nas mesmas condições. Além disso, esta interferência é facilmente acompanhada uma vez que tem um desvio de emissão de 68 nm para a gama azul. As propriedades de fluorescência deste sensor são bastante apelativas para

aplicações de bioimagem. De facto, tem uma fotoestabilidade elevada que é comparável a alguns corantes comerciais e superior à maioria e um rendimento quântico de  $0,11 \pm 0,03$  usando sulfato de quinina como fluoróforo de comparação ( $\Phi_F = 0,54$ ). Esta estabilidade e especificidade do sensor necessitava de ser mais explorada. Por isso, foi determinado que o mecanismo de ligação entre a RFL e o Fe(II) tem uma estequiometria 1:1, ou seja, o Fe(II) interage com uma molécula de RFL usando dois sítios de ligação. Esta estequiometria foi ainda confirmada pelo gráfico de Hill onde o número de Hill obtido,  $n = 2,1 \pm 0,1$ , fornece mais provas do cooperativismo positivo que existe neste tipo de estequiometria 1:1. A fotoestabilidade deste sensor também pode ser explicada pela elevada constante de dissociação ( $K_d$ ) de  $2,35 \times 10^5$  que confirma a estabilidade do complexo RFL-Fe(II). Este sensor apresenta-se como um bom candidato para a deteção do Fe(II), o que permitirá um melhor conhecimento da localização e efeito biológico deste metal.



## Referências bibliográficas

- [1] K. Pantopoulos, S.K. Porwal, A. Tartako, L. Devireddy (2012). Mechanisms of mammalian iron homeostasis, *Biochemistry* 51, 5705-5724.
- [2] C.O. Reichert, J. da Cunha, D. Levy, L.M.F. Maselli, S.P. Bydlowski, C. Spada (2017). Hepcidin: homeostasis and diseases related to iron metabolism, *Acta Haematol.* 137, 220-236,
- [3] G.J. Kontoghiorghes, A. Spyrou, A. Kolnagou (2010). Iron chelation therapy in hereditary hemochromatosis and thalassemia intermedia: regulatory and non regulatory mechanisms of increased iron absorption, *Hemoglobin* 34, 251-264.
- [4] J.L. Weiland, L.K. Sherrow, D.A. Jayant, K.D. Katz (2017). Chemical hand warmer packet ingestion: a case of elemental iron exposure, *Wilderness & Environ. Med.* 28 (3), 246-248,
- [5] J.D. Chartres, M. Busby, M.J. Riley, J.J. Davis, P.V. Bernhardt (2011). A turn-on fluorescent iron complex and its cellular uptake, *Inorg. Chem.* 50 (18), 9178-9183.
- [6] R. Balamurugan, W.-I. Chang, Y. Zhang, S. Fitriyani, J.-H. Liu (2016). A turn-on fluorescence chemosensor based on a tripodal amine [tris(pyrrolyl- $\alpha$ -methyl)amine]-rhodamine conjugate for the selective detection of zinc ions, *Analyst* 141 (18), 5456-5462.
- [7] J. Chan, S.C. Dodani, C.J. Chang (2012). Reaction-based small-molecule fluorescent probes for chemoselective bioimaging, *Nature Chem.* 4, 973-984.
- [8] Z. Guo, Q. Niu, T. Li (2018). Highly sensitive oligothiophene-phenylamine-based dual-functional fluorescence “turn-on” sensor for rapid and simultaneous detection of Al<sup>3+</sup> and Fe<sup>3+</sup> in environment and food samples, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 200, 76-84.
- [9] H.Y. Au-Yeung, J. Chan, T. Chantarojsiri, C.J. Chang (2013). Molecular imaging of labile iron(II) pools in living cells with a turn-on fluorescent probe, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (40), 15165-15173.
- [10] T. Hirayama, K. Okuda, H. Nagasawa (2013). A highly selective turn-on fluorescent probe for iron(ii) to visualize labile iron in living cells, *Chem. Sci.* 4 (2013), 1250-1256.
- [11] O. Garcia-Beltran, N. Mena, O. Yanez, J. Caballero, V. Vargas, M.T. Nunez, B.K. Cassels (2013). Design, synthesis and cellular dynamics studies in membranes of a new coumarin-based “turn-off” fluorescent probe selective for Fe<sup>2+</sup>. *Eur. J. Med. Chem.* 67, 60-63.

- [12] J. R. Lakowicz (1999). Principles of Fluorescence Spectroscopy, Chapter 1, Kluwer-Plenum, New York.
- [13] B. Valeur (2001). Molecular Fluorescence Principles and Applications, Chapter 4, Wiley-VCH, New York.
- [14] R.K. Muir, N. Zhao, J. Wei, Y.-H. Wang, A. Moroz, Y. Huang, Y.-C. Chen, R. Sriram, J. Kurhanewicz, D. Ruggiero, A.R. Renslo, M.J. Evans (2019). Measuring Dynamic Changes in the Labile Iron Pool in Vivo with a Reactivity-Based Probe for Positron Emission Tomography, ACS Cent. Sci. 5 (4), 727-736.
- [15] O. Kakhlon, Z.I. Cabantchik (2002). The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes, Free Radic. Biol. Med., 22, 1037.
- [16] M. Shvartsman, E. Fibach, Z.I. Cabantchik (2010). Transferrin-iron routing to the cytosol and mitochondria as studied by live and real-time fluorescence, Biochem. J. 429, 185.
- [17] P. Li, L. Fang, H. Zhou, W. Zhang, X. Wang, N. Li, H. Zhong, B. Tang (2011). A new ratiometric fluorescent probe for detection of Fe<sup>2+</sup> with high sensitivity and its intracellular imaging applications, Chem. Eur. J. 17, 10520.
- [18] B.P. Espósito, W. Breuer, P. Sirankapracha, P. Pootrakul, C. Hershko, Z.I. Cabantchik (2003). Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation Blood 102, 2670.
- [19] X. Zhu, Y. Duan, P. Li, H. Fan, T. Han, X. Huang (2019). A highly selective and instantaneously responsive Schiff base fluorescent sensor for the “turn-off” detection of iron(III), iron(II), and copper(II) ions, Anal. Methods 11, 642.
- [20] T. Hirayama, H. Tsuboi, M. Niwa, A. Miki, S. Kadota, Y. Ikeshita, K. Okuda, H. Nagasawa (2017). A universal fluorogenic switch for Fe(II) ion based on N-oxide chemistry permits the visualization of intracellular redox equilibrium shift towards labile iron in hypoxic tumor cells, Chem. Sci. 8, 4858.
- [21] S. Lee, H. Jang, J. Lee, S.H. Jeon, Y. Sohn, C.S. Ra (2017). Selective and sensitive morpholine-type rhodamine B-based colorimetric and fluorescent chemosensor for Fe(III) and Fe(II), Sens. Actuat. B 248, 646-656.

- [22] S. Ghezelsefloo, J.K. Rad, M. Hajjali, A.R. Mahdavian (2021). Rhodamine-based fluorescent polyacrylic nanoparticles: A highly selective and sensitive chemosensor for Fe (II) and Fe (III) cations in water, *J. Environ. Chem. Eng.* 9, 105082.
- [23] S. Khatun, S. Biswas, A. Binoy, A. Podder, N. Mishra, S. Bhuniya (2020). Highly chemoselective turn-on fluorescent probe for ferrous ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ion detection in cosmetics and live cells, *J. Photochem. Photobiol. B*, S1011–1344, 30393.
- [24] S.Q. Makki, N.M.A. Alhussein, H.H. Tizkam, A.A. Balakit (2020). Highly sensitive and selective colorimetric sensor for iron (II) ion detection based on 4-amino-antipyrine derivative, *AIP Conf. Proc.* 2290, 030019.
- [25] Y. Ma, Z. Liu, R.C. Hider, F. Petrat (2007). Determination of the Labile Iron Pool of Human Lymphocytes using the Fluorescent Probe, CP655, *Analytical Chemistry Insights* 2, 61-67.
- [26] S. Carter, A.S. Fisher, M.W. Hinds, S. Lancaster, J. Marshall (2013). Atomic spectrometry update: review of advances in the analysis of metals, chemicals and materials, *J. Anal. At. Spectrom.* 28, 1814.
- [27] M. West, A.T. Ellis, P.J. Potts, C. Strelci, C. Vanhoof, P. Wobrauschek (2021). Atomic spectrometry update – a review of advances in X-ray fluorescence spectrometry and its special applications, *J. Anal. At. Spectrom.* 31, 1706.
- [28] S.-H. Chen, Y.-X. Li, P.-H. Li, X.-Y. Xiao, M. Jiang, S.-S. Li, W.-Y. Zhou, M. Yang, X.-J. Huang, W.-Q. Liu (2018). Electrochemical spectral methods for trace detection of heavy metals: a review, *Trends Anal. Chem.* 106, 139-150.
- [29] Y.Y. Zhang, X.Z. Chen, X.Y. Liu, M. Wang, J.J. Liu, G. Gao, X.Y. Zhang, R.Z. Sun, S.C. Hou, H.M. Wang (2018). A highly sensitive multifunctional sensor based on phenylene-acetylene for colorimetric detection of  $\text{Fe}^{2+}$  and ratiometric fluorescent detection of  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ , *Actuat. B Chem.* 273, 1077.
- [30] M. Ding, K. Wang, M. Fang, W. Zhu, L. Du, C. Li (2020). MPA-CdTe quantum dots as “on-off-on” sensitive fluorescence probe to detect ascorbic acid via redox reaction, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 234, 118249.

- [31] Z. Zhang, Y. Zhang, W. Ma, R. Russell, Z.M. Shakhsher, C.L. Grant, W.R. Seitz, D.C. Sundberg (1989). Poly(vinyl alcohol) as a substrate for indicator immobilization for fiber-optic chemical sensors, *Anal. Chem.* 61, 202–205.
- [32] H.D. Duong, O.J. Sohn, H.T. Lam, J.I. Rhee (2006). An optical pH sensor with extended detection range based on fluoresceinamine covalently bound to sol-gel support, *Microchem. J.* 84, 50–55.
- [33] M. Hudlicky (1984). *Reductions in Organic Chemistry*, Ellis Horwood Limited: New York, NY, USA.
- [34] M. Wrona, K. Patel, P. Wardman (2005). Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals, *Free Radic. Bio. Med.* 38, 262–270.
- [35] A.J. Duarte, J.C.G. Esteves da Silva (2010). Reduced fluoresceinamine as a fluorescent sensor for nitric oxide, *Sensors* 10, 1661-1669.
- [36] W.H. Melhuish (1961). Quantum efficiencies of fluorescence of organic substances: effect of solvent and concentration of the fluorescent solute, *The Journal of Physical Chemistry* 65, 229-235.
- [37] H. J. Yvon (2012). HORIBA, Jobin Yvon Ltd.
- [38] F.W. Gilcreas (1966). Standard methods for the examination of water and waste water. *Am. J. Public Health* 56, 387-388.
- [39] B. Jana, S. Senapati, D. Ghosh, D. Bose, N. Chattopadhyay (2012). Spectroscopic exploration of mode of binding of ctDNA with 3-hydroxyflavone: a contrast to the mode of binding with flavonoids having additional hydroxyl groups, *J. Phys. Chem. B* 116, 639-645.
- [40] M. M. Ciazek-Jurczyk, J. Równicka-Zubik, R. Dyja, A. Sułkowska (2013). Comparative analysis of KP-HSA complex by spectroscopic methods, *Acta Physica Polonica* 123 (4), 673-680.
- [41] Helena M.R. Gonçalves, Isabel S. Tavares, Susana A.F. Neves, Rui Fontes, Abel J. Duarte (2022). Turn-on, photostable, nontoxic and specific, iron(II) sensor, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Volume 265, 120380.

- [42] C. Munkholm, D.R. Parkinson, D.R. Walt (1990). Intramolecular fluorescence self-quenching of fluoresceinamine, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (7), 2608-2612,
- [43] V.I. Martynov, A.A. Pakhomov, N.V. Popova, I.E. Deyev, A.G. Petrenko (2016). Synthetic Fluorophores for visualizing biomolecules in living systems, *Acta naturae* 8, 33–46.
- [44] M. Timm, L. Saaby, L. Moesby, E.W. Hansen (2013). Considerations regarding use of solvents in in vitro cell based assays, *Cytotechnology* 65 (5), 887-894.
- [45] H.D. Duong, O. Sohn, H.T. Lam, J.I. Rhee (2006). An optical pH sensor with extended detection range based on fluoresceinamine covalently bound to sol–gel support, *Microchem. J.* 84, 50.
- [46] Q. Meng, Y.u. Shi, C. Wang, H. Jia, X. Gao, R. Zhang, Y. Wang, Z. Zhang (2015). NBD-based fluorescent chemosensor for the selective quantification of copper and sulfide in an aqueous solution and living cells, *Org. Biomol. Chem.* 13 (10), 2918-2926.
- [47] H.D. Duong, O. Sohn, H.T. Lam, J.I. Rhee (2006). An optical pH sensor with extended detection range based on fluoresceinamine covalently bound to sol–gel support, *Microchem. J.* 84, 50.
- [48] T. Makiyama, H. Nakamura, N. Nagasaka, H. Yamashita, T. Honda, N. Yamaguchi, A. Nishida, T. Murayama (2015). Trafficking of acetyl-C16-ceramide-NBD with long-term stability and no cytotoxicity into the Golgi complex, *Traffic* 16 (5), 476-492.
- [49] V.S.D. Gomes, H.M.R. Gonçalves, R.E.F. Boto, P. Almeida, L.V. Reis (2020). Barbiturate squaraine dyes as fluorescent probes for serum albumins detection, *J. Photochem. Photobiol. A* 400, 112710.
- [50] A.D. Johnson, R.M. Curtis, K.J. Wallace (2019). Low molecular weight fluorescent probes (LMFPs) to detect the group 12 metal triad, *Chemosensors* 7, 22.
- [51] C.S.G. Mircioy, S.J. Wilkins, G.C.C. Hung, S.L. Helman, G.J. Anderson, D.M. Frazer (2018). Circulating iron levels influence the regulation of hepcidin following stimulated erythropoiesis, *Haematologica* 103 (10), 1616.