

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA - CAMPUS DE ARARAQUARA/SP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS
ANALÍTICOS COM NANOPARTÍCULAS PARA A
AVALIAÇÃO DE ADULTERAÇÃO OU CONTAMINAÇÃO DE
ALIMENTOS**

Dayana Borges Bittar

- Tese de Doutorado -

Araraquara – SP

2017

Dayana Borges Bittar

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS
ANALÍTICOS COM NANOPARTÍCULAS PARA A
AVALIAÇÃO DE ADULTERAÇÃO OU CONTAMINAÇÃO DE
ALIMENTOS**

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Profa. Dra. Helena Redigolo Pezza (Orientadora)

Araraquara – SP

2017

DADOS CURRICULARES

1. Formação acadêmica

1.1. Graduação

Licenciatura em Química

UNIPAM - Centro Universitário de Patos de Minas/MG

Período: 2000-2004

1.2. Pós-Graduação

1.2.1. Mestrado em Química Analítica

UFU - Universidade Federal de Uberlândia/MG

Período: 2006-2008

1.2.2. Doutorado Sanduíche

Universidade do Porto – Faculdade de Farmácia (UFUP) –
Porto/Portugal

Período: Maio/2015 a Outubro/2015

1.2.3. Doutorado em Química Analítica

UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química

Período: 2º semestre/2013 a 1º semestre/2017.

2. Atuação Profissional

- Professora no Centro Universitário de Patos de Minas - **UNIPAM**, em Patos de Minas/MG, no período de agosto de 2009 a maio de 2010.

- Professora na Faculdade do Noroeste de Minas - **FINOM**, em Paracatu/MG, no período de maio a julho de 2010.

- Professora de Química, efetiva, na rede estadual de Patos de Minas, de fevereiro de 2005 até o presente momento.

3. Produção Bibliográfica

3.1. Artigos completos publicados em periódicos

3.1. Catelani, T.A.; **Bittar, D.B.**, Pezza, L.; Pezza, H.R. A Rapid and Eco-Friendly Method for Determination of Hydrolysable Tannins and Its Application to Honey Samples. **Food Analytical Methods**. DOI: 10.1007/s12161-016-0454-1.

3.2. **Bittar, D.B.**; Catelani, T.A.; Nighogossian, K.; Barud, H.S.; Ribeiro, S.J.L.; Pezza, L., Pezza, H.R. Optimized Synthesis of Silver Nanoparticles by Factorial Design with Application for the Determination of Melamine in Milk. **Analytical Letters**, DOI. 10.1080/00032719.2016.1196213.

3.3. **Bittar, D. B.**, Ribeiro, D. S. M., Pascoa, R. N. M. J., Soares, J. F. X., Rodrigues, S. S. M., Castro, R. C., Pezza, L., Pezza, H. R., Santos, J. L. M. Multiplexed analysis combining distinctly-sized CdTe-MPA quantum dots and chemometrics for multiple mutually interfering analyte determination. **Talanta**, (<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.071>)

3.4. **Bittar, D.B.**, Catelani, T. A., Pezza, L., Pezza, H.R. A fast method for the determination of lead in honey samples using stabilizer-free silver nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, DOI:10.1016/j.saa.2017.08.032.

4. Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

4.1. Euroanalysis 2015 – Congresso Científico de Química Analítica realizado no período de 06 a 10 de Setembro de 2015 em Bordeaux-França.

Título: Use of digital images to detection of melamine based on interaction between melamine and gold nanoparticles.

4.2. 54° CBQ 2014 - Congresso Brasileiro de Química realizado no período de 03 a 07 de novembro de 2014 em Natal – RN.

Título: Desenvolvimento de sistema de "screening" utilizando nanopartículas de prata para a detecção de melamina.

4.3. VI ASSINPOSPq 2014 - Simpósio Internacional de Pós-Graduação e Pesquisa, em Ribeirão Preto/SP de 16 a 19 de setembro de 2014. (Ouvinte)

DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese a Deus, por ter me dado força e fé para concluí-la;
aos meus pais, Lindomar e Norma, pelo amor, incentivo, apoio e
entusiasmo constante; e à minha filha, Laura, pela ternura,
pela alegria e por ter sido o “combustível” da minha
disposição e força nos momentos mais difíceis.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por proporcionar-me vida e saúde, para que eu pudesse concluir esse trabalho; vitória tão sonhada e almejada.

Ao meu esposo Daniel, por sonhar e viver comigo esse sonho. Por me apoiar, incentivar e me ajudar em todos os momentos com muita paciência, compreensão e amor. Pra sempre em meu coração!

À minha filha Laura, por ser tão amorosa, alegre e gostosa. Por sempre me receber com um sorriso maravilhoso após toda uma parte do dia em que estive ausente.

Aos meus pais, por serem os grandes responsáveis, não só por esta, mas por todas as minhas conquistas. Amo vocês!

Aos meus irmãos e ao meu cunhado pela força e por sempre acreditarem em mim.

À professora Dra. Helena Redigolo Pezza pela compreensão, pela paciência, amizade e, principalmente, pela orientação. Como seus ensinamentos foram válidos; não tenho palavras para agradecer!

Ao prof. Dr. José Luís F. Costa Lima e prof. Prof. Dr. João Luís Machado dos Santos pela oportunidade de desenvolver parte do meu doutorado na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto/Portugal.

Aos colegas do departamento de química analítica do grupo Fritz Feigl Maria Izabel, Eduardo, Marcos, Paulo, João Victor, Mayara e Michael por todo o apoio, a alegria e a convivência e, em especial ao Tiago, amigo/irmão que sempre esteve ao meu lado, ensinando-me e orientando-me, vivendo e convivendo comigo. Muito obrigada!

Ao Hernane da Silva Barud e à Karina Nigoghossian pelas valiosas contribuições, pelos ensinamentos, pela ajuda, pela amizade e pela paciência que tiveram comigo. Vocês são demais!

A todas as minhas amigas de Patos de Minas/MG que acompanharam, mesmo a quilômetros de distância, essa jornada de quatro anos de estudo, de aprendizado e superação com palavras de apoio, de força e carinho. Vocês são as irmãs de coração que eu pude escolher...obrigada!

À CAPES pela bolsa de pesquisa concedida no Brasil e pela bolsa de pesquisa de doutorado sanduíche concedida durante o período de seis meses em Porto/Portugal.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Ando devagar
Porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque eu já chorei demais

Hoje me sinto mais forte
Mais feliz, quem sabe
Eu só levo a certeza
De que muito pouco eu sei
Ou nada sei ...

(Almir Sater/Renato Teixeira)

RESUMO

Neste trabalho, desenvolvimento e otimização de métodos foram propostos utilizando nanopartículas metálicas a fim de aumentar a sensibilidade desses métodos e detectar contaminantes/adulterantes em matrizes alimentares complexas como leite e mel. Em uma primeira etapa, um método de detecção colorimétrico baseado em nanopartículas de prata foi desenvolvido para a determinação da melamina no leite. As nanopartículas de prata foram sintetizadas sem uso de qualquer agente estabilizante, utilizando borohidreto de sódio como agente redutor. A otimização das variáveis experimentais para a formação das nanopartículas foi realizada utilizando o planejamento fatorial, resultando em nanopartículas de prata coloidal estável com um diâmetro médio de $14,0 \pm 2,7$ nm. As medidas espectrofotométricas realizadas a 475 nm mostraram uma faixa linear de $0,033$ - $1,50$ mg L⁻¹ de melamina ($r = 0,999$), com limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) de $0,009$ e $0,031$ mg L⁻¹, respectivamente. O método proposto forneceu detecção e quantificação sensível de melamina em amostras de leite. Em uma segunda etapa, um método sensível, rápido e robusto baseado no uso de nanopartículas de prata isentas de estabilizantes foi desenvolvido para a detecção e quantificação de chumbo em amostras mel. As nanopartículas de prata foram sintetizadas sem o uso de qualquer estabilizante, utilizando-se como precursores nitrato de prata e borohidreto de sódio; este último como agente redutor. A otimização das variáveis experimentais (AgNO₃ e NaBH₄) para a formação das nanopartículas foi realizada utilizando-se diferentes volumes dessas soluções. Medições espectrofotométricas a 393 nm foram realizadas mostrando uma faixa linear de trabalho entre $0,0500$ - $0,167$ mg L⁻¹ de chumbo ($r = 0,994$), com LOD e LOQ de $0,0135$ e $0,0451$ mg L⁻¹, respectivamente. O método proposto forneceu detecção sensível para chumbo em amostras de mel. Na terceira etapa, a combinação na mesma análise de múltiplos quantum dots de CdTe-MPA, cada um com uma capacidade particular de interagir com o analito, assegurou uma detecção de multi-ponto que não foi apenas explorada para uma discriminação mais precisa do analito, mas também para a discriminação simultânea de múltiplas espécies mutuamente interferentes, na mesma amostra. A análise de componentes principais (PCA) e a regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) foram utilizados para análise de dados de fluorescência. Foram testadas misturas de dois *quantum dots* de CdTe-MPA, emitindo nos diferentes comprimentos de onda: $549/566$, $549/634$ e $566/634$ nm e os resultados obtidos mostraram que a abordagem desenvolvida é capaz de resolver mistura binária e ternária de Pb (II), Hg (II) e Cu (II), fornecendo informações precisas sobre a concentração de Pb (II) e Hg (II) e sinalizando a ocorrência de Cu (II). Outro método de detecção colorimétrico baseado na análise de imagens digitais, utilizando o sistema de cores RGB (Red – Green – Blue), obtidas após a reação entre as nanopartículas de ouro e a melamina, foi desenvolvido para a determinação do contaminante melamina em amostras de leite. As nanopartículas de ouro não modificadas foram sintetizadas utilizando citrato de sódio dihidratado como agente redutor. A otimização dos canais RGB para a obtenção dos melhores resultados de intensidade efetiva foi realizada utilizando o software GIMP 2.8. As nanopartículas de ouro apresentaram um diâmetro médio de $23,0 \pm 2,2$ nm. As medidas de intensidade efetiva foram obtidas com canal azul e apresentaram

linearidade na faixa de 0,100 a 0,275 mg L⁻¹ de melamina ($r = 0,998$), com LOD e LOQ de 0,013 e 0,043 mg L⁻¹, respectivamente. O método proposto apresentou sensibilidade para a determinação de melamina em amostras de leite quando comparado a outros trabalhos encontrados na literatura.

Palavras-chave: nanopartículas de prata, nanopartículas de ouro, quantum dots de CdTe, melamina, mel, metais tóxicos, colorimetria, imagem digital, fluorescência, quimiometria de multiplexagem

ABSTRACT

In this work, development and optimization of methods were proposed using metallic nanoparticles in order to increase the sensitivity of these methods and detect contaminants / adulterants in complex food matrices such as milk and honey. In a first step, a colorimetric detection method based on silver nanoparticles was developed for the determination of melamine in milk. Silver nanoparticles were synthesized without the use of any stabilizing agent, using sodium borohydride as a reducing agent. The optimization of experimental variables for nanoparticle formation was performed using factorial design, resulting in stable colloidal silver nanoparticles with a mean diameter of 14.0 ± 2.7 nm. The spectrophotometric measurements performed at 475 nm showed a linear range of 0.033-1.50 mg L⁻¹ melamine ($r = 0.999$), with detection limits (LOD) and quantification (LOQ) of 0.009 and 0.031 mg L⁻¹, respectively. The proposed method provided sensitive detection and quantification of melamine in milk. In a second step, a sensitive, rapid and robust method based on the use of stabilizer-free silver nanoparticles was developed for the detection and quantification of lead in honey samples. Silver nanoparticles were synthesized without the use of any stabilizer, using silver nitrate and sodium borohydride as precursors; the latter as a reducing agent. The optimization of the experimental variables (AgNO₃ and NaBH₄) for the formation of the nanoparticles was carried out using different volumes of these solutions. Spectrophotometric measurements at 393 nm were performed showing a linear working range between 0.0500-0.167 mg L⁻¹ lead ($r = 0.994$), with LOD and LOQ of 0.0135 and 0.0451 mg L⁻¹, respectively. The proposed method provided sensitive detection for lead in honey samples. In the third step, the combination in the same analysis of multiple quantum dots of CdTe-MPA, each with a particular ability to interact with the analyte, ensured a multi-point detection that was not only explored for more accurate discrimination of the analyte, but also for the simultaneous discrimination of multiple mutually interfering species in the same sample. Principal component analysis (PCA) and partial least squares regression (PLS) were used for analysis of fluorescence data. Two different quantum dots of CdTe-MPA were tested, emitting different wavelengths: 549/566, 549/634 and 566/634 nm and the results showed that the developed approach is capable of solving binary and ternary Pb mixtures (II) and Cu (II), providing accurate information on the concentration of Pb (II) and Hg (II) and signaling the occurrence of Cu (II). Another method of colorimetric detection based on the analysis of digital images using the RGB color system (Red - Green - Blue), obtained after the reaction between gold nanoparticles and melamine, was developed for the determination of the contaminant melamine in milk. The unmodified gold nanoparticles were synthesized using sodium citrate dihydrate as a reducing agent. The optimization of the RGB channels to obtain the best results of effective intensity was performed using GIMP software 2.8. The gold nanoparticles had a mean diameter of 23.0 ± 2.2 nm. The effective intensity measurements were obtained with blue channel and presented linearity in the range of 0.100 to 0.275 mg L⁻¹ of melamine ($r = 0.998$), with LOD and LOQ of 0.013 and 0.043 mg L⁻¹, respectively. The proposed method presented sensitivity for the determination of melamine in milk when compared to other works found in the literature.

Keywords: Silver nanoparticles, gold nanoparticles, CdTe - quantum dots, melamine, honey, heavy metals, colorimetry, digital imaging, fluorescence, chemometrics multiplexing

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – Introdução

Figura 1: Algumas estruturas e suas respectivas dimensões.....	26
Figura 2: Níveis de energia desde um átomo até o material macroscópico (<i>bulk</i>) de um mesmo material.....	28
Figura 3: Representação do estado fundamental e dos estados excitados singleto e tripleto	36
Figura 4: Fórmula estrutural da melamina	41

CAPÍTULO II – Optimized Synthesis of Silver Nanoparticles by Factorial Design with Application for the Determination of Melamine in Milk

Figure 1: (a) Central composite design and (b) its projection based on absorbance measurements as functions of AgNO ₃ and NaBH ₄ concentrations	53
Figure 2: Absorbance as a function of time for the silver nanoparticles: (□) literature conditions using 1.00 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ AgNO ₃ , 2.00 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ NaBH ₄ and (■) this work using 3.00 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ AgNO ₃ and 1.25 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ NaBH ₄ . The absorbance was measured at 400 nm with a pathlength of 1 cm.....	54
Figure 3: Absorption spectrum at 400 nm for silver nanoparticles in the absence of melamine	54
Figure 4: Transmission electron micrographs of silver nanoparticles in the (a) absence and (b) presence of 1.50 mg L ⁻¹ melamine	55
Figure 5: (a) Photographs of the nanoparticles at various melamine concentrations and (b) the calibration curve obtained using 0.033, 0.133, 0.333, 0.833, 1.17, and 1.50 mg L ⁻¹ melamine	56

CAPÍTULO III – A fast method for the determination of lead in honey samples using stabilizer-free silver nanoparticles

Figure 1: Stability of the nanoparticles 1 (■), 2 (□), 3 (▲), 4 (○) and 5 (●) synthesized with different molar ratios of the precursor solutions of AgNO₃ and NaBH₄64

Figure 2: (a) AgNP spectrum in the absence of lead obtained according to the conditions of experiment 5, table 1, with b = 1 cm (quartz cuvette) and λ = 393 nm; **(b)** Transmission electron microscopy images of the silver nanoparticles...64

Figure 3: Absorbance behavior of the working AgNP obtained in the presence of the different concentrations of NaCl: 1.00, 0.50, 0.10, 0.05, and 0.01 mol L⁻¹, respectively 65

Figure 4: Relationship between absorbance and pH of silver nanoparticles colloidal solution (λ = 393 nm, quartz cuvette)65

Figure 5: (a) Colors obtained for different concentrations of lead in the presence of AgNPs and a blank in the absence of the analyte; **(b)** Calibration curve obtained by the measured absorbance (λ = 393 nm) of the AgNPs system with final lead concentrations of 0.0500; 0.0670; 0.0830; 0.100; 0.117; 0.133; 0.150; 0.167 mg L⁻¹, respectively 65

CAPÍTULO IV – Multiplexed analysis combining distinctly-sized CdTe-MPA quantum dots and chemometrics for multiple mutually interfering analyte determination

Figure 1: Normalized absorption (A) photoluminescence (B) spectra of the different sized MPA-CdTe- QDs. Photograph of the QDs solutions under ambient light (C) and irradiated with UV light at 365 nm (D)72

Figure 2: Normalized photoluminescence (A) spectrum of the nanohybrid 549/634 nm MPA-capped CdTe QDs system. Photograph of the fluorometric probe solutions under ambient light (B) and irradiated with UV light at 365 nm (C) 73

Figure 3: Photoluminescence emission spectra of 549/634 nm MPA-CdTe QDs fluorometric probe in the presence of A) Cu(II), B) Pb(II) and C) Hg(II) at different concentrations73

Figure 4: Linear regression model by projecting the predicted and the real ion concentrations using the PLS 1 algorithm 74

Figure 5: Regression coefficient vectors of the PLS models built with (A) Cu(II)-Hg(II); (B) Cu(II)-Pb(II) and (C) Pb(II)-Hg(II) mixtures fluorometric responses....	75
Figure 6: Regression coefficient vectors of the PLS models built with the Hg(II)-Pb(II)-Cu(II) mixture fluorometric response	76

CAPÍTULO V – Detecção rápida e sensível de melamina por imagem digital no sistema RGB utilizando nanopartículas de ouro não modificadas

Figura 1: Alterações da absorbância em função do tempo de armazenamento para as nanopartículas de ouro sintetizadas, $\lambda = 527$ nm; B = 1 cm	89
Figura 2: Espectro de absorção das nanopartículas de ouro na ausência de melamina obtido a 527 nm	89
Figura 3: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de ouro na ausência (a) e na presença (b) de melamina a $0,50 \text{ mg L}^{-1}$	90
Figura 4: Valores de transmitância obtidos pelos canais R (■), G (●), B (▲) para as concentrações de melamina $0,100$; $0,125$; $0,150$; $0,175$; $0,200$; $0,250$; $0,275 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente	91
Figura 5: (a) Diferentes cores obtidas pelas nanopartículas de ouro na presença de diferentes concentrações de melamina e (b) curva de calibração do analito melamina obtida a partir das concentrações $0,100$, $0,125$, $0,150$, $0,175$, $0,200$, $0,225$ e $0,275 \text{ mg L}^{-1}$	92

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II – Optimized Synthesis of Silver Nanoparticles by Factorial Design with Application for the Determination of Melamine in Milk

Table 1: Recovery of melamine in milk ($n = 3$)56

Table 2: Analytical figures of merit for this protocol and previously reported methods for the determination of melamine using silver nanoparticles57

CAPÍTULO III – A fast method for the determination of lead in honey samples using stabilizer-free silver nanoparticles

Table 1: Volumes of AgNO_3 and NaBH_4 tested for the synthesis of silver nanoparticles and their respective molar ratios63

Table 2: Analytical characteristics of the proposed method for lead analysis...65

Table 3: Interference factors of some metals commonly found in honey66

Table 4: Recovery values obtained using the proposed method (AgNP) and the comparative method (FAAS) as well as the values of calculated-t (Student's t-test) for the two methods 66

CAPÍTULO IV – Multiplexed analysis combining distinctly-sized CdTe-MPA quantum dots and chemometrics for multiple mutually interfering analyte determination

Table 1: Concentrations of the metal ions used in the mixtures71

Table 2: CdTe-MPA QDs characterization72

Table 3: PLS model results for each analyte74

Table 4: PLS model results for each analyte in the three mixtures containing two analytes74

Table 5: PLS model results for each analyte in the mixture containing three analytes 75

CAPÍTULO V – Detecção rápida e sensível de melamina por imagem digital no sistema RGB utilizando nanopartículas de ouro não modificadas

Tabela 1: Teste de recuperação de melamina adicionada às amostras de leite.....93

Tabela 2: Comparação do desempenho analítico da técnica proposta e alguns métodos previamente relatados na literatura para a determinação de melamina utilizando nanopartículas de ouro94

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- AgNPs – nanopartículas de prata (silver nanoparticles)
- AuNPs – nanopartículas de ouro (gold nanoparticles)
- BC – Banda de condução
- BV - Banda de Valência
- EU - European Union (União Europeia)
- FAAS - Flame atomic absorption spectrometry
- FAO - Food and Agriculture Organization
- FWHM - Full width at half maximum
- GC – Gas Chromatography (cromatografia gasosa)
- HPLC - High performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)
- IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry
- LOD – Limit of detection (limite de detecção)
- LOQ – Limit of quantification (limite de quantificação)
- LV - Latent variables
- MERCOSUL – Mercado Comum do Sul
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura (Scanning electron microscopy)
- MPA – ácido 3-mercaptopropiônico
- MS - Mass spectrometry (espectrometria de massas)
- PCA – (principal component analysis) análises de componentes principais
- PL – Photoluminescence (fotoluminescência)
- PLS – (partial least squares) mínimos quadrados parciais
- QDs – quantum dots
- QY – rendimento quântico (quantum yields)
- R^2_{CV} - coefficient of determination of cross-validation
- RGB – red-green-blue
- RMSECV - root mean square error of cross-validation
- TEM – Transmission electronic microscopy (microscopia eletrônica de transmissão)
- TOP/TOPO - trioctilfosfina/óxido de trioctilfosfina
- UV-Vis – Ultravioleta-visível

b – caminho óptico

r – coeficiente de correlação linear

s – desvio padrão relativo

D – tamanho das nanopartículas

λ – comprimento de onda de máxima absorção

ϵ – absorvidade molar

ΔE – energia de transição

C – concentração molar

N – número de amostras (number of samples)

y_i - experimental result for sample

i - value obtained for the calibration set (RMSEC)

\hat{y}_i - cross-validation (RMSECV)

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	24
1.1 Nanotecnologia e nanomateriais	25
1.1.1 Técnicas de síntese de nanomateriais.....	30
1.1.2 Caracterização de nanomateriais	33
1.1.3 Técnicas microscópicas.....	33
1.1.4 Técnicas espectroscópicas.....	34
1.1.4.1 Espectrofotometria de absorção de UV-Vis.....	34
1.1.4.2 Fluorescência.....	35
1.2 Análises por Imagem Digital.....	36
1.3 Adulteração/contaminação de alimentos.....	37
1.4 Matrizes alimentícias utilizadas para aplicação das metodologias propostas.....	38
1.4.1 Leite.....	38
1.4.2 Mel.....	40
1.5 Analitos utilizados na otimização das metodologias propostas.....	41
1.5.1 Melamina.....	41
1.5.2 Chumbo (Pb).....	42
1.5.3 Cobre (Cu).....	43
1.5.4 Mercúrio (Hg).....	43
1.6 Objetivos gerais e específicos	44
CAPÍTULO II – Síntese otimizada de nanopartículas de prata por planejamento fatorial com aplicação em determinação de melamina em leite...	46
Abstract	48
Introduction	48
Experimental	50
<i>Equipments and materials</i>	50
<i>Reagents and solutions</i>	50
<i>Preparation of the silver nanoparticles</i>	51
<i>Stability of the silver nanoparticles</i>	51
<i>Preparation of milk</i>	51
<i>Calibration relationships</i>	51

<i>Standard addition and recovery</i>	52
Results e discussion	52
<i>Stabilization of silver nanoparticles</i>	52
<i>Central composite design</i>	52
<i>Stability of the silver nanoparticles</i>	53
<i>Transmission electron microscopy and absorption spectra of silver nanoparticles ...</i>	54
<i>Analytical figures of merit</i>	55
<i>Analysis of milk</i>	55
Conclusion	57
References	57
CAPÍTULO III – A fast method for the determination of lead in honey samples using stabilizer-free silver nanoparticles	61
ABSTRACT	62
1. Introduction	62
2. Experimental	63
<i>2.1. Equipment and materials</i>	63
<i>2.2. Reagents and solutions</i>	63
<i>2.3. Preparation of silver nanoparticles</i>	63
<i>2.4. AgNPs surface properties: possibility of aggregation by influence of ionic strength and pH</i>	63
<i>2.5. Analytical Curve</i>	63
<i>2.6. Samples of honey</i>	63
<i>2.7. Dry digestion procedure of the samples</i>	63
<i>2.8. Study of interferences</i>	63
<i>2.9. Matrix effect study: pattern addition and recovery</i>	64
<i>2.10. Comparative method</i>	64
3. Results and discussion	64
<i>3.1. Interference of ionic strength and pH in the aggregation of AgNPs</i>	64
<i>3.2. Analytical figures of merit</i>	65
<i>3.3. Study of interferences</i>	65
<i>3.4. Addition and recovery tests: application in honey samples of different flowering</i>	66
4. Conclusion	67

References.....	67
CAPÍTULO IV – Multiplexed analysis combining distinctly-sized CdTe-MPA quantum dots and chemometrics for multiple mutually interfering analyte determination	68
ABSTRACT	69
1. Introduction	69
2. Experimental	70
2.1 <i>Reagents and solutions</i>	70
2.2 <i>Apparatus</i>	70
2.3 <i>Synthesis of MPA capped CdTe QDs assisted by microwave irradiation</i>	70
2.4 <i>Procedure for the fluorometric measurements</i>	70
2.5 <i>Experimental design</i>	70
2.6 <i>Data analysis</i>	71
3. Results and discussion	71
3.1 <i>Characterization of the as-prepared CdTe QDs capped with MPA</i>	71
3.2 <i>Preliminary assays</i>	71
3.3 <i>Interaction between the 549/634 nm MPA-CdTe QDs fluorometric probe and Hg (II), Pb (II) and Cu (II), individually</i>	72
3.4 <i>Interaction between the 549/634 nm MPA-CdTe QDs fluorometric probe and a mixture of two metal ions namely, Hg(II)-Pb(II), Hg(II)-Cu(II) and Pb(II)-Cu(II)</i>	74
3.5 <i>Interaction between the 549/634 nm MPA-CdTe QDs fluorometric probe and a mixture of three metal ions Hg(II)-Pb(II)-Cu(II)</i>	75
4. Conclusion	76
References.....	76
Supplementary material	78
CAPÍTULO V – Detecção rápida e sensível de melamina por imagem digital no sistema RGB utilizando nanopartículas de ouro não modificadas	81
Introdução	82
Experimental	84
<i>Equipamentos e materiais</i>	84
<i>Reagentes e soluções</i>	85
<i>Preparo das AuNPs estabilizadas com citrato</i>	85

<i>Estudo de estabilidade das nanopartículas de ouro</i>	86
<i>Preparo das amostras de leite</i>	86
<i>Procedimento e curva analítica</i>	87
<i>Adição de padrão e recuperação</i>	87
Resultados e discussão	87
<i>Estudo da estabilidade das nanopartículas de ouro</i>	88
<i>Espectro de absorção UV-Vis e imagens de microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de ouro</i>	89
<i>Figuras de mérito</i>	90
<i>Aplicação em amostras de leite: análise e recuperação</i>	92
Conclusões	94
Referências	95
CAPÍTULO VI – Conclusões	100
REFERÊNCIAS	102

Capítulo I

Introdução

1.1 Nanotecnologia e nanomateriais

A nanotecnologia já faz parte de nossas vidas há pouco mais de meio século. Mesmo sendo muito recente, já está abrindo novos campos para o futuro.

A pesquisa científica e tecnológica em nanotecnologia tem mostrado diversos avanços e resultados promissores em várias áreas do conhecimento como a saúde, a eletrônica, a biotecnologia, a indústria alimentar, a energia, dentre outras, fornecendo às diferentes indústrias a capacidade de criar produtos mais confiáveis, eficientes, sensíveis, seguros e ambientalmente amigáveis (Corbett et al, 2000).

Analisada sob o ponto de vista dos princípios da Química Verde, a nanotecnologia proporciona um caminho natural, pois lida diretamente com a questão da redução de escala material e energética, maior eficiência e seletividade nos processos, uso de materiais mais inteligentes, e ambientalmente corretos, e até o desenvolvimento de dispositivos analíticos para monitoração em tempo real (Toma, 2004).

Para um material ser considerado um nanomaterial, ele deve ter pelo menos uma das dimensões externas com tamanho igual ou inferior a 100 nm, sendo que 1 nm corresponde a 10^{-9} m (Fierascu et al., 2008). Em termos comparativos, um único fio de cabelo humano tem cerca de 80.000 nm de largura e um glóbulo vermelho 7.000 nm, enquanto, uma molécula de água apresenta 0,3 nm de diâmetro (Card et al., 2011).

A nanotecnologia é muito mais do que diminuir o tamanho. Ela é, sobretudo, explorar os fenômenos e as propriedades que a matéria apresenta na escala nano, onde a sua essência consiste na habilidade de se trabalhar em nível atômico, molecular e macromolecular a fim de criar materiais, dispositivos e sistemas com propriedades e aplicações fundamentalmente novas (Royal Society and Royal Academy of Engineering, 2014).

Os nanomateriais podem ser definidos como materiais que possuem ao menos uma dimensão na escala nanométrica, abaixo de um tamanho crítico capaz de alterar alguma de suas propriedades físico-químicas (Zarbin, 2007).

Em 2011, a Comissão Europeia definiu “nanomaterial” como um material natural, acidental ou manufaturado, que contém partículas na forma de

um agregado ou aglomerado ou em um estado desagregado, onde sua distribuição número-tamanho apresenta pelo menos 50% das partículas com uma ou mais dimensões externas com tamanhos compreendidos entre 1 nm e 100 nm (European Commission, 2011).

Para se ter uma referência, um vírus tem entre 20 e 300 nanômetros de tamanho. Na Figura 1 é ilustrado um exemplo de escala nanométrica.

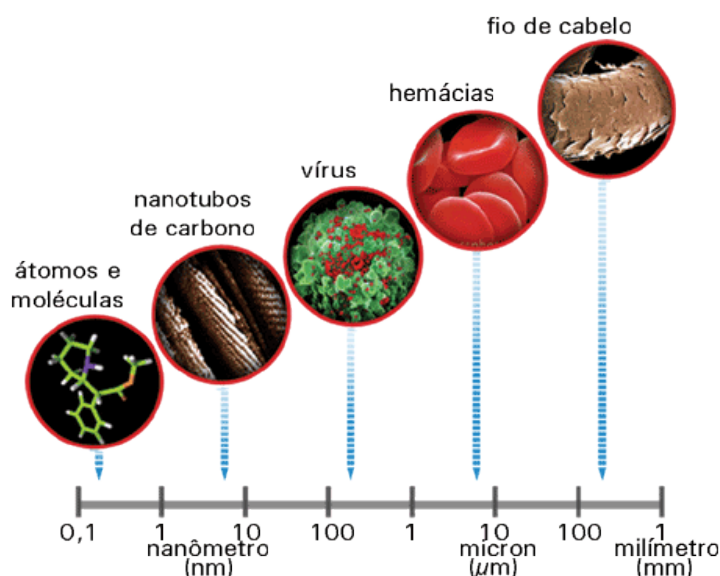


Figura 1: Algumas estruturas e suas respectivas dimensões.

Fonte: Disponível em <https://nanomateriais.wordpress.com/tag/nanoparticulas-de-ouro/>

O crescente interesse em torno da nanotecnologia e dos nanomateriais deve-se ao fato dessas partículas com tamanho extremamente reduzido apresentarem propriedades ópticas, mecânicas, químicas, magnéticas e/ou eletrônicas diferentes daquelas apresentadas pelos sólidos macroscópicos (*bulk*) compostos pelo mesmo material, ou seja, apenas com a redução de tamanho e sem alteração de substância, verifica-se que os materiais apresentam novas propriedades e características como resistência, maleabilidade, elasticidade, condutividade e poder de combustão, além de apresentarem também uma grande área superficial, o que as torna tão interessantes no âmbito da pesquisa, da economia e do desenvolvimento (Zarbin, 2007; Rad et al., 2011). Alguns materiais quimicamente inertes tornam-se reativos quando produzidos em escala nanométrica.

As novas propriedades físico-químicas que são observadas na escala dos nanomateriais estão associados aos efeitos quânticos e de superfície que ocorrem nesses sistemas. Na verdade, a alteração das propriedades de um material ao atingir a escala nanométrica se deve à combinação de dois fatores: reescrever objetos com essas dimensões que os efeitos quânticos se manifestam de maneira mais evidente e observar que quanto menor for o tamanho da amostra, mais importantes tornam-se os efeitos de superfície, pelo aumento da proporção entre sua área e seu volume (Melo e Pimenta, 2004; Toma, 2004).

No primeiro momento, o efeito de confinamento quântico pode ser explicado pelo modelo quântico de partícula na caixa. Por exemplo, em um semicondutor, quando um elétron é excitado da banda de valência (BV) para a banda de condução (BC), este deixa um “buraco” na BV, que pode ser tratado como sendo um carregador de carga positiva. Elétrons e buracos estão sujeitos à atração Coulômbica, formando um par elétron-buraco, do tipo hidrogenóide, ao qual é dado o nome de éxciton. O efeito de confinamento quântico ocorre quando o tamanho do cristal torna-se comparável ao comprimento de onda de De Broglie do éxciton. Nesta condição, os carregadores são tratados quanticamente como partículas na caixa, onde o tamanho da caixa é dado pelas dimensões do cristal. Isto significa que o éxciton fica confinado às dimensões reduzidas do material e como consequência, as bandas características de sólidos estruturam-se em níveis eletrônicos discretos, com espaço entre estes níveis aumentando de maneira proporcional ao decréscimo do tamanho da partícula (Alivisatos, 1996; Brus, 1984; Liz-Marzán, 2004). Um diagrama esquemático das estruturas de bandas para um semicondutor, em nível atômico, *bulk* e na forma de nanopartículas, está representado na Figura 2.

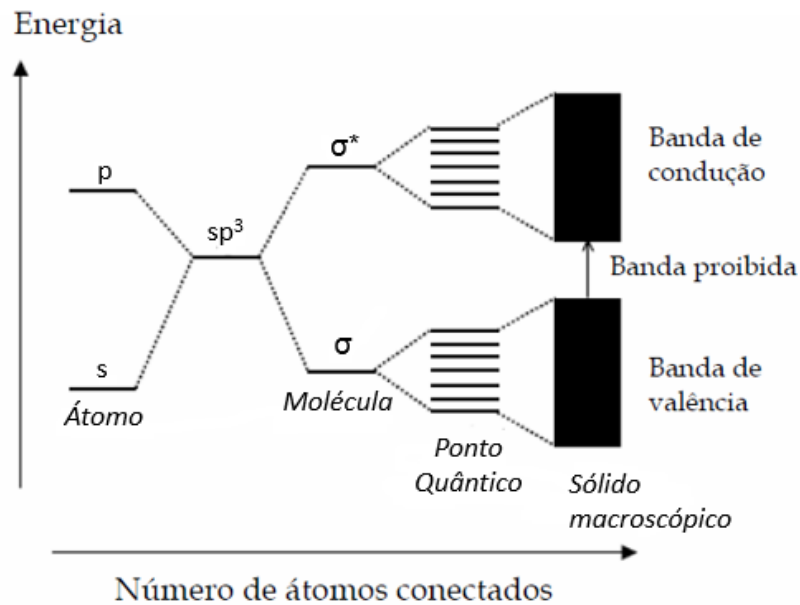


Figura 2: Níveis de energia desde um átomo até o material macroscópico (*bulk*) de um mesmo material (Alivisatos, 1997)

De uma maneira geral, o efeito de confinamento quântico para metais é observado em partículas variando de 1 a 10 nm, e para semicondutores entre 1 e 200 nm. Estes valores, entretanto, são aproximados, e a extensão do efeito depende fundamentalmente da composição e estrutura de cada material. Como pode ser observado na Figura 2, para os nanocristais temos uma densidade de estados variando entre os níveis discretos do átomo isolado e os limites do sólido *bulk*. No segundo momento, com a alta relação superfície/volume dos materiais em escala nanométrica de tamanho, tem-se que o número de átomos presentes na superfície do cristal é comparável ao número dos que estão localizados no seu interior, o que faz com que propriedades físicas e químicas, que são convencionalmente controladas pelo *bulk*, tornem-se dominadas pela estrutura de defeitos da superfície, mudando as propriedades do nanomaterial (Drexler, 1986; Shi et al., 2004; Jortner e Rao, 2002; Fendler, 1996; Ozin, 1992; Baer et al., 2003; Flory et al., 2011; Alivisatos, 1996; Brus, 1984; Soriano et al., 2017).

Dentro da categoria dos nanomateriais inorgânicos pode-se encontrar nanopartículas de metais de transição como o ouro e a prata que possuem propriedades ópticas peculiares que fundamentam inúmeras aplicações sendo, portanto, as mais estudadas e usadas. Há ainda os nanocristais semicondutores

comumente conhecidos como “*quantum dots*” (QDs) (Michalet et al., 2005) constituídos, na maioria das vezes, por cádmio, telúrio, selênio e outros elementos dos grupos II, III, IV, V e VI da tabela periódica e que apresentam propriedades óticas, eletrônicas, eletroquímicas e catalíticas excepcionais (Valcárcel e López-Lorente, 2014).

Em particular, nanopartículas metálicas exibem propriedades óticas extremamente interessantes. A variedade de cores observada para essas nanopartículas está relacionada às oscilações dos elétrons de condução, em ressonância com a luz incidente, denominada ressonância dos *plasmons* de superfície (Carbó-Argibay et al., 2007). Vale ressaltar que este fenômeno de ressonância dos *plasmons* de superfície não ocorre com qualquer nanopartícula, uma vez que há a necessidade da existência de elétrons livres de condução em sua superfície, como é o caso de nanopartículas de ouro e prata (Liz-Marzán, 2004).

O tamanho das nanopartículas de ouro (AuNPs) influencia a capacidade de absorção da luz. Partículas maiores que 20 nm de diâmetro deslocam a banda de absorção para comprimentos de onda maiores que 530 nm, ao passo que partículas menores geram um efeito contrário, ou seja, deslocam a absorção para comprimentos de onda menores. Assim, é possível ter partículas com diferentes cores (do vermelho ao azul), desde que seja capaz de controlar a distribuição do seu tamanho, ou seja, as propriedades óticas das AuNPs são dependentes de seu formato e tamanho. A cor característica do vidro ruby é a vermelha, que corresponde a uma absorção de comprimento de onda por volta de 530 nm, logo com partículas da ordem de 20 nm. Esses efeitos de cor são consequência do confinamento quântico dessas partículas e estão relacionados a mudanças na ressonância plasmônica de superfície (Casanova, 2010).

Para as nanopartículas de prata (AgNPs), a coloração amarela, referente ao *plasmon* ressonante dessas nanopartículas, revela uma banda de absorção em torno de 400 nm. AgNPs apresentam como característica grande área superficial. Com a alta relação superfície/volume dos materiais em nanoescala, tem-se que o número de átomos presentes na superfície do cristal é comparável ao número dos que estão localizados no seu interior, o que faz

com que propriedades físicas e químicas tornem-se dominadas pela interface, mudando as propriedades do nanomaterial (Oliveira, 2005).

Já para semicondutores nanocristalinos, os *quantum dots* (QDs), um efeito interessante é o alargamento da faixa entre os estados eletrônicos ocupados e os estados eletrônicos desocupados, o que afeta diretamente as propriedades ópticas dos QDs. Assim, à medida que o tamanho desses pontos quânticos diminuem, o *gap* de energia entre a banda de valência e a banda de condução aumenta, ou seja, com o decréscimo da partícula o *gap* aumenta e, conseqüentemente, pode-se observar que os espectros de absorção e luminescência dos semicondutores deslocam-se para energias mais altas (Redigolo et al., 1999). QDs pequenos têm um espectro de absorção e/ou emissão deslocado para comprimentos de onda menores, mais curtos (Zhou e Glosh, 2006).

A exemplo, na indústria alimentar, as AuNPs são utilizadas como nanossensores para detecção de contaminantes ou adulterantes em alimentos, por mudanças de cor das nanopartículas na presença dos compostos em questão. É o caso das AuNPs ligadas ao ácido cianúrico que se ligam seletivamente a melamina, um adulterante utilizado para elevar o teor proteico em alimentos para animais e formulações infantis. A agregação causada pela melamina provoca uma mudança de cor das AuNPs de vermelho para azul (Ai et al., 2009). Outra aplicação das AuNPs na indústria alimentar refere-se ao seu uso como ensaios colorimétricos altamente sensíveis para a detecção de diferentes agentes patogênicos como *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* (Verma et al., 2015).

Assim, a nanotecnologia, em poucos anos, passou a ser considerada um instrumento estratégico e uma ferramenta poderosa, que além de promover a inovação tecnológica, também melhorou a qualidade dos produtos através da assimilação de recursos e procedimentos mais inteligentes, limpos, modernos e evoluídos. Tudo isso fazendo uso de nanomateriais sintetizados, otimizados e caracterizados.

1.1.1 Técnicas de síntese de nanomateriais

Existem vários métodos de síntese conhecidos para a obtenção de materiais em escala nanométrica, sendo os métodos químicos os mais utilizados, os quais são baseados em reações realizadas em solução, que levam à formação de nanopartículas dispersas em um solvente adequado (Ferreira e Rangel, 2009, Pinto et al., 2010).

Soluções coloidais de metais como prata e ouro são sistemas em nanoescala particularmente interessantes, devido à facilidade com que podem ser preparadas e modificadas quimicamente.

As nanopartículas metálicas podem ser preparadas por diversos métodos, sendo que sua estabilidade, tamanho e propriedades dependem do método de síntese. Alguns dos métodos estudados são: redução eletroquímica, deposição térmica, deposição vapor-metal, redução química, entre outros. No entanto, a técnica mais simples e versátil é a redução química. Geralmente os processos de preparação envolvem o uso de agentes redutores, tais como citrato de sódio, boroidreto de sódio, hidrazinas, formaldeídos, hidroxilaminas, álcoois saturados e insaturados e açúcares. (Yin et al., 2004; Panigrahi et al., 2005; Andreescu et al., 2006).

Apesar de existirem diferentes métodos para sintetizar nanopartículas, geralmente todos eles baseiam-se em quatro componentes fundamentais: o meio (solvente utilizado na reação), o precursor (os sais de metais em sua grande maioria), o agente redutor (que agirá para reduzir o íon ao seu estado metálico) e o estabilizante (utilizado para recobrir a superfície das nanopartículas evitando a agregação das mesmas) (Rocha, 2008). São várias as técnicas capazes de produzir diferentes nanomateriais. Estas técnicas podem ser classificadas em técnicas “*bottom-up*” ou “*top-down*”, e diferenciam-se pelo modo com que abordam a produção do nanomaterial (Mizuta e Oda, 2008).

As técnicas de “*bottom-up*” baseiam-se na produção de nanoestruturas a partir de estruturas menores, como átomos e moléculas, sendo que estas estruturas menores são desenhadas de forma a terem características especiais, que as tornam capazes de formar espontaneamente estruturas supramoleculares bem definidas e organizadas (Cockburn et al., 2012).

As técnicas de “*top-down*” partem do material de escala macroscópica, sendo criadas progressivamente estruturas menores por processos físicos, como a litografia, até se obter o material desejado em escala

nanométrica (Sanguansri e Augustin, 2006). Os métodos “*top-down*” são precisos, confiáveis e são capazes de gerar dispositivos de alta complexidade, no entanto envolvem mais energia e geram mais resíduos do que o método “*bottom-up*”.

Por outro lado, as técnicas de “*bottom-up*” são bem mais simples de implementar, apresentam rendimentos mais elevados e custos energéticos menores. Contudo, devido à necessidade de parar o crescimento de todos os nanomateriais ao mesmo tempo, podem apresentar uma grande dispersão de tamanhos. Estas técnicas implicam, ainda, a utilização de um agente que se adsorve à superfície dos nanomateriais controlando o seu crescimento. Estes agentes de revestimento, por exemplo surfactantes, polímeros, dentre outros, são utilizados para evitar a agregação e precipitação dos nanomateriais em suspensão (Sanguansri e Augustin, 2006).

As AuNPs podem ser sintetizadas em meio orgânico ou aquoso. Tipicamente, um sal de ouro é submetido à ação de um agente redutor. Desse modo, a espécie Au^{3+} é conduzida à espécie Au^+ em um processo de nucleação e redução, provocando a formação das nanopartículas. Atualmente adiciona-se agentes passivantes/estabilizantes ao meio para garantir a estabilidade da dispersão coloidal (Guo e Wang, 2007).

As AgNPs também tem sido produzidas por novos métodos. Os principais baseiam-se na redução química de sais de prata usando agentes redutores em solução aquosa. Elas também podem ser produzidas utilizando métodos eletroquímicos, decomposição térmica, ablação a laser e irradiação por microondas, processos de micelas reversas, dentre outros (Murugadoss e Chattopadhyay, 2008; Monteiro et al., 2009; Gúzman et al., 2009).

As técnicas de síntese química dos QDs são principalmente organometálica ou aquosa. As sínteses organometálicas são o grupo de métodos mais bem sucedido para a síntese de QDs, apresentando elevada qualidade de rendimento e tamanhos regulares (Silva et al. 2010; Kuang et al. 2011). Porém, este método de síntese conhecido como rota organometálica, ou método TOP/TOPO (trioctilfosfina/óxido de trioctilfosfina), utiliza precursores extremamente tóxicos, pirofóricos, de custo elevado e que necessitam de altas temperaturas de reação (Murray et al. 1993). Assim, devido a estes

inconvenientes significativos, os procedimentos de síntese em meio aquoso tem sido amplamente utilizados para a síntese de QDs.

Esses métodos apresentam boa reprodutibilidade dos materiais sintetizados, baixa toxicidade, menor custo e são capazes de formar *dots* solúveis em água, garantindo a biocompatibilidade dos mesmos (Liu e Yu, 2009) e, conseqüentemente, sua efetiva aplicação, principalmente em sistemas biológicos, o que é um fator determinante em biomedicina.

No decorrer deste trabalho, para a síntese química dos QDs foram utilizadas técnicas que se enquadram na categoria “*bottom-up*”.

1.1.2 Caracterização de nanomateriais

O aprimoramento de metodologias analíticas, para a caracterização rápida e eficiente dos nanomateriais é de grande interesse para o desenvolvimento da nanotecnologia. O conhecimento das características químicas (como a composição), físicas (como o tamanho) e biológicas (como a toxicidade) são essenciais. Assim, são várias as técnicas disponíveis para a caracterização dos nanomateriais e da sua superfície química. As diferentes técnicas podem ser classificadas em técnicas microscópicas, espectroscópicas e de separação (Valcárcel e López-Lorente, 2014). Nesse trabalho, a caracterização das nanopartículas foi focada pelas duas primeiras técnicas citadas.

Imediatamente após a preparação e a adição dos reagentes, as soluções das nanopartículas foram caracterizadas por espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), permitindo a determinação dos comprimentos de onda referentes à ressonância dos *plasmons* de superfície em cada caso. Já a microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada como uma ferramenta bastante útil para a avaliação da geometria e dos tamanhos das nanopartículas.

1.1.3 Técnicas microscópicas

Dentro das técnicas microscópicas, as técnicas mais utilizadas para a caracterização de nanomateriais são a microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (TEM), microscopia de varrimento

com sonda, nomeadamente microscopia de força atômica e microscopia de corrente de tunelamento. Neste estudo o TEM foi a técnica microscópica utilizada.

Essa técnica fornece, além das imagens dos nanomateriais, informações referentes ao estado de agregação, dispersão, tamanho, estrutura e forma dos nanomateriais. Porém, apresenta a desvantagem de lidar com a subjetividade do operador, pois é ele quem decide qual parte da amostra é fotografada, sendo que para uma avaliação precisa da distribuição de tamanhos é necessário contar e medir um grande número de partículas de forma a obter dados estatísticos fidedignos (Reiss, Protiere e Li, 2009; Zarbin, 2007). Outra desvantagem encontra-se no fato desta técnica ser, em geral, destrutiva, ou seja, a mesma amostra não pode ser analisada mais do que uma vez, nem por outro método de avaliação.

1.1.4 Técnicas espectroscópicas

Alguns métodos espectroscópicos também têm sido utilizados para avaliar nanomateriais. Por exemplo, técnicas com base em fluorescência são usadas para a análise de nanopartículas com fluorescência nativa forte, sendo caracterizadas pelo seu espectro de absorção ou de fluorescência.

Outra técnica utilizada é a espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta-visível (UV-Vis). Assim, nanopartículas metálicas e nanoestruturas com dimensões significativamente menores que o comprimento de onda da luz de excitação são caracterizadas por uma intensa e ampla banda de absorção na região visível do espectro (Hutter e Fendler, 2004).

1.1.4.1 Espectrofotometria de absorção de UV-Vis

A espectrofotometria de absorção de UV-Vis é uma técnica utilizada na rotina de trabalho para a validação das sínteses e verificação da estabilidade coloidal das suspensões de nanopartículas. Essa técnica envolve a absorção da radiação ultravioleta/visível, que compreende a faixa de 200 a 800 nm, pela espécie, causando a promoção dos elétrons do estado fundamental para o estado excitado. O espectro é obtido pela irradiação da luz através de uma

solução diluída da amostra e o espectro de absorção é dado pela razão da intensidade da radiação, que passa pela amostra e pelo branco/referência (Skoog et al., 2006)

A medida da absorção na região do UV-Vis, observada em nanopartículas metálicas, baseia-se no fenômeno de ressonância da banda plasmônica. Neste caso, uma onda eletromagnética incide sobre uma nanopartícula metálica ocasionando a oscilação em ressonância da nuvem eletrônica dessa nanopartícula, transformando a energia das ondas eletromagnéticas em energia térmica (Zhang e Noguez, 2008). Além disso, esta técnica é importante no estudo da estabilidade das soluções de nanopartículas, uma vez que ela é capaz de monitorar o decaimento da banda plasmônica das soluções, desde o seu preparo.

Esta técnica é utilizada para determinar de um modo quantitativo a concentração de substâncias em solução que absorvem radiação quando expostas à radiação na região do visível e ultravioleta, segundo a lei de Lambert-Beer: $A = \epsilon c l$; onde A representa a absorvância, ϵ representa a absortividade molar (ou coeficiente de extinção molar), c a concentração e l o percurso óptico, desde que a constante óptica das nanopartículas seja conhecida (Valcárcel e López-Lorente, 2014).

Para tanto, o papel do químico no desenvolvimento da nanociência e nanotecnologia é fundamental, desenvolvendo rotas de síntese e métodos de aplicação de nanomateriais estáveis, homogêneos (na forma e no tamanho) e com propriedades e características pré-determinadas.

1.1.4.2 Fluorescência

A luminescência molecular é a emissão de radiação eletromagnética (na região do UV-Vis) proveniente de moléculas que foram excitadas e retornaram ao seu estado fundamental emitindo energia. Esse fenômeno é denominado de fotoluminescência, quando a absorção de fótons de luz é o responsável pela excitação da molécula pela elevação de elétrons de valência de um orbital menos energético para um orbital de maior energia (Frigerio, 2012).

De acordo com Köhler, Wilson e Friend (2002), a fotoluminescência molecular é formalmente dividida em fluorescência e fosforescência,

dependendo da natureza do estado excitado envolvido no processo. Se o estado excitado envolvido é um estado excitado singleto, onde o spin do elétron no orbital excitado mantém sua orientação original, tem-se a fluorescência (Figura 3). Por outro lado, se a orientação do elétron que foi promovido ao estado excitado é invertida (estado excitado tripleto, T_n), tem-se a fosforescência. Em consequência da retenção da orientação original, o retorno de uma população que se encontra no estado excitado singleto para o estado fundamental (que tem caráter singleto), é permitido e ocorre rapidamente (tempo de vida na ordem de ns).



Figura 3: Representação do estado fundamental e dos estados excitados singleto e tripleto (adaptado SKOOG et al., 2006)

Assim, a fluorescência é intrinsecamente um fenômeno luminescente mais comum que a fosforescência. Como consequência direta disso, é possível observar facilmente fluorescência na temperatura ambiente e diretamente em solução, o que torna o procedimento experimental fluorimétrico bastante simples.

Portanto, a fluorescência é a base da fluorimetria que engloba o conjunto de técnicas analíticas baseadas na detecção dos fótons emitidos por moléculas excitadas de caráter singleto quando estas retornam para o estado fundamental (Skoog, Holler e Nieman, 2002).

1.2 Análises por Imagem Digital

O uso de imagens digitais tem se tornado uma tendência analítica de grande validade pois permite realizar determinações quali e quantitativas com uma considerável sensibilidade e baixo custo quando comparado aos métodos espectroscópicos convencionais (Almeida, 2012; Mirasoli et al., 2012).

As imagens digitais podem ser obtidas por diferentes aparelhos como câmeras digitais, scanners, aparelhos de raios-X, radares, aparelhos de ultrassom, microscópios eletrônicos (Machado e Souki, 2004), celulares e outros dispositivos eletrônicos.

De acordo com Khandual, Baciú e Rout (2013), o conceito de imagem digital, remete aos tipos de cores do sistema RGB, onde as respostas aos canais (ou componentes) vermelho (R), verde (G) e azul (B) são dependentes dos sensores ou dispositivos que são utilizados (parâmetros), incluindo iluminação do ambiente e utilização ou não de filtros de correção.

O uso dos conceitos de imagem digital e suas aplicações apresenta-se como uma importante ferramenta em diversas determinações analíticas, a qual apresenta bons resultados de aplicação e é indispensável para a obtenção de resultados rápidos, os quais podem ser obtidos em laboratório ou em campo, armazenamento de dados e utilização de equipamentos de baixo custo. O foco desse tipo de aplicação está cada vez mais direcionado à obtenção de imagens reais (sem qualquer tratamento) e sua análise no menor tempo possível.

1.3 Adulteração/contaminação de alimentos

A autenticidade dos alimentos é um problema global. A adulteração de alimentos é uma prática antiga e que preocupa não somente os consumidores, mas também os produtores, as indústrias bem como todos os envolvidos direta e indiretamente com matrizes alimentares. Tal tema vem ganhando destaque, sendo crescente a demanda por produtos que apresentem garantia da sua autenticidade e confiabilidade (Karoui e Baerdemaeker, 2007).

Com o aumento do crescimento populacional, as indústrias do ramo alimentício aceleraram consideravelmente a produção de alimentos. Porém, essa demanda por grandes e rápidas quantidades de produtos aumentou também ações antiéticas como adulteração, contaminação e/ou alteração da composição dos alimentos a fim, apenas, de visar lucro para os empresários da área. Normalmente, substâncias químicas são adicionadas às matérias primas, no decorrer da linha de produção, para aumentar o volume ou a quantidade ou mesmo mascarar as características do produto final.

De acordo com a FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations – (1996), a sociedade tem o direito de ter acesso a alimentos de boa qualidade nutricional e que sejam isentos de compostos químicos que possam prejudicar a saúde humana. Vale ressaltar que esses dois fatos são de grande importância no contexto atual devido ao desbalanceamento nutricional das dietas alimentares, bem como o envenenamento dos alimentos, em nome de uma maior produtividade, cujos efeitos sobre a saúde humana, pelo menos alguns deles, ainda permanecem desconhecidos.

Com relação à detecção de adulterantes/contaminantes em matrizes alimentares existe a possibilidade de utilização da nanotecnologia para aumento da sensibilidade. Entre algumas aplicações possíveis da nanotecnologia estão a utilização de sensores nanoestruturados e nanobiossensores para detecção de microrganismos patogênicos, aditivos, toxinas e resíduos em produtos alimentícios (Rumayor et al., 2005; Malheiros et al., 2010).

Portanto, dentro dessa perspectiva de que as nanopartículas aumentam significativamente a sensibilidade dos métodos de detecção de contaminantes, aumentando os sinais de absorbância obtidos por leitura em espectrofotômetros UV-Vis, a melamina e alguns metais (Pb, Cu e Hg) foram selecionados para o presente estudo, os quais podem provocar sérios danos à saúde do homem se ingeridos, presentes em matrizes alimentares complexas, como leite e o mel.

1.4 Matrizes alimentícias utilizadas para aplicação das metodologias propostas

1.4.1 Leite

O leite é um alimento natural quase completo, do ponto de vista nutricional, por conter carboidratos, proteína, lipídeos, sais minerais e vitaminas. Tudo isto tornou o leite de vaca, e de outras espécies, uma importante fonte alimentar para pessoas de todas as idades.

No Brasil, a Instrução Normativa nº 62 (IN-62), de 29 de dezembro de 2011, estabelece as condições de qualidade do leite cru bovino, sendo eles: requisitos microbiológicos, físico-químicos, de contagem de células somáticas e de resíduos químicos (Brasil, 2011).

Devido às exigências estabelecidas por lei, os produtores de leite lidaram com pressão para melhorarem a qualidade do leite produzido, o que fez com que vários produtores buscassem assistência técnica ou realizasse investimentos para estar em conformidade com a legislação, porém outros tentaram mascarar/contaminar a má qualidade do leite ou mesmo aumentar o lucro por meio de adulterações.

É considerado leite fraudado, falsificado ou adulterado quando for adicionado água ao mesmo, tiver ocorrido remoção de algum dos seus componentes ou forem adicionadas substâncias conservadoras ou quaisquer elementos estranhos à sua composição (Brasil, 1997).

O leite cru, refrigerado na propriedade rural e transportado a granel, deve ser analisado pelo estabelecimento industrial que for realizar o beneficiamento dessa matéria prima, no seu próprio laboratório, para cada tanque móvel utilizado no seu transporte, em relação aos seguintes parâmetros de qualidade (Brasil, 2011): avaliação sensorial: aspecto e coloração; odor; matéria gorda (g/100g); densidade relativa a 15°C; acidez titulável (g ácido láctico/100 mL); extrato seco desengordurado (g/100g); extrato seco total (g/100g); temperatura (°C); teste do alizarol; índice crioscópico; proteína total (g/100g); pesquisa de resíduos de antibióticos; pesquisa de resíduos de outros agentes inibidores do crescimento microbiano [peróxido de hidrogênio, formaldeído e sanitizantes (cloro e hipocloritos)]; pesquisa de reconstituintes da crioscopia (álcool etílico); pesquisa de reconstituintes da densidade (sacarose, cloretos e amido); pesquisa de neutralizantes da acidez (pH, alcalinidade das cinzas, hidróxido de sódio, carbonatos e bicarbonatos) e pesquisa da fraude do leite por adição de soro (Brasil, 2011). Além disso, o leite pode ser adulterado com melamina, um contaminante capaz de elevar falsamente o teor proteico dessa matriz.

Em 2008, o Centro para Controle e Prevenção de doenças da China, ao efetuar análises laboratoriais em matérias-primas que eram usadas para a adulteração de leite em uma província da China, detectaram que os níveis médios de melamina eram extremamente elevados (WHO and FAO Experts, 2009). Esse adulterante era capaz de elevar falsamente o teor de proteínas e, dessa forma, aumentar o valor de venda do produto junto às indústrias, uma vez que a remuneração era feita em função do teor de proteína.

Neste contexto, levando-se em consideração o grande número de casos de contaminação/adulteração de leite por parte dos produtores, atravessadores e/ou indústrias de beneficiamento, faz-se necessária e urgente a tentativa de combater essa má conduta, a qual prejudica toda uma cadeia produtiva e alimentar.

1.4.2 Mel

O mel de abelha é um produto açucarado natural produzido, principalmente, pelas abelhas melíferas operárias (*Apis mellifera* L.), além de outras espécies de abelhas, a partir do recolhimento do néctar das flores ou de exsudações das partes vivas das plantas, para posterior transformação, combinação com compostos específicos e estocagem em favos. A sua composição e suas propriedades dependem, principalmente, da origem botânica do néctar ou das secreções (Bertelli, et al. 2010).

As propriedades benéficas do mel para a saúde impulsionaram o crescimento da sua produção e do seu consumo pela população nas últimas décadas (Lemos, et al. 2010). Porém, essa imagem de que o mel é uma substância natural e saudável, foi manchada a partir do surgimento de episódios sobre contaminação de mel distribuído para o consumo. Como atualmente muitos dos méis consumidos são produzidos em ambientes poluídos por diferentes fontes de contaminação, as características nobres desse produto estão sendo alteradas, impulsionando o interesse da pesquisa por estudos para identificar, quantificar e retirar esses contaminantes dessa matriz (Bogdanov, 2006).

As fontes de contaminação de mel são diversas. A exemplo podemos citar a contaminação por pesticidas, antibióticos, bactérias, organismos geneticamente modificados, metais pesados, radioatividade e repelentes utilizados para conter pragas (Bogdanov, 2006).

Segundo Ruoff e Bogdanov (2004), alguns métodos para verificar a autenticidade dos méis, tais como métodos físico-químicos, organolépticos e a microscopia, são usados no controle de qualidade dos mesmos.

A presença de metais tóxicos nos produtos apícolas em níveis acima daqueles estabelecidos pela legislação, especialmente no mel, representa uma

ameaça para os seres humanos devido à sua toxicidade e aos seus efeitos cumulativos no organismo (Magalhães, 2010). Os principais metais responsáveis pela contaminação dos produtos apícolas são: cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), zinco (Zn), cromo (Cr), manganês (Mn), níquel (Ni), prata (Ag), ferro (Fe), alumínio (Al), cobalto (Co) e estrôncio (Sr) (Franchini e Matos, 2007).

Assim, para evitar alguns tipos de fraude e garantir a qualidade do produto que chega ao consumidor existe uma série de parâmetros e análises que têm que ser realizadas no produto final. Como o Pb é um dos metais tóxicos mais estudados, por ser considerado um dos mais tóxicos, verifica-se a necessidade de desenvolver metodologias mais simples, baratas e mais rápidas que garantam resultados muito próximos ou iguais àqueles obtidos pelas metodologias oficiais/tradicionais.

1.5 Analitos utilizados na otimização das metodologias propostas

1.5.1 Melamina

Um dos adulterantes que já causou bastante problema, e até mesmo mortes, foi a melamina, oficialmente denominada de 1,3,5-triazina-2,4,6-triamina (Figura 4), a qual ao ser adicionada ao leite elevava falsamente o teor de proteínas dessa matéria prima devido à sua alta composição nitrogenada.

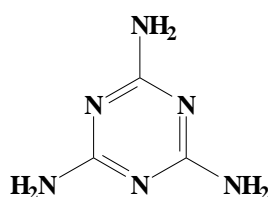


Figura 4: Fórmula estrutural da melamina

Esse fato ocorreu na China no segundo semestre de 2008 e chamou bastante a atenção por milhares de recém-nascidos terem apresentado um quadro clínico de pedras nos rins. Investigações posteriores revelaram que essa doença nos bebês estava diretamente ligada ao consumo de leite e seus derivados bem como a uma vasta gama de produtos lácteos (Sun et al., 2010).

Os métodos rotineiramente usados para a determinação de proteínas no leite são o de Kjeldahl e o de Dumas, porém são ensaios que determinam a quantidade total de nitrogênio na amostra. Conseqüentemente obtinha-se um falso negativo de contaminante/adulterante no leite, pois os átomos de nitrogênio que estão presentes na melamina, quase 66% do seu peso molecular, também eram detectados em razão de os métodos acima citados não apresentam seletividade para nitrogênio não proteico (Sáez-Plaza et al., 2013).

Após o ocorrido, os USA e a União Europeia determinaram que a máxima concentração de melamina permitida em alimentos seria de 2,5 mg L⁻¹ e a China, de 1,0 mg L⁻¹ (Zhu et al., 2009).

Desde este triste episódio, várias metodologias (Mauer et al., 2009; Filigenzi et al., 2007; Sancho et al., 2005; Kim et al., 2008) foram propostas a fim de detectar melamina em produtos lácteos. Porém, são metodologias, em sua maioria, que necessitam de aparelhos de alto custo, técnicos especializados para manuseá-los dentre outros fatores dispendiosos e pouco práticos.

Sendo assim, propor metodologias diferenciadas, de baixo custo, que utilizem a menor quantidade de reagentes e atendam às premissas da Química Verde torna-se imprescindível para que análises de detecção desse contaminante sejam mais rápidas, de baixo custo, demandem menos reagentes e possam ainda ser realizadas *in loco*. Ensaio com espectrofotômetro de absorção UV-Vis é bastante promissor bem como a utilização da nanotecnologia, em especial nanopartículas de prata, para aumentar a sensibilidade do método analítico na detecção de melamina em amostras de leite.

1.5.2 Chumbo (Pb)

A contaminação do mel por metais pode ser devido às tintas e vernizes protetores utilizados na conservação dos quadros de madeira das colmeias, à incorreta higienização dos veículos de transporte, às instalações de extração e acondicionamento, à utilização de utensílios e materiais inadequados dentre outros fatores (Neves, 2006).

O chumbo é um contaminante ambiental com efeitos tóxicos em diversos sistemas de órgãos. O rim, o sistema hematopoiético e o sistema nervoso estão entre os mais afetados (Weiss, 2010).

Após ser absorvido o chumbo entra na corrente sanguínea e a sua distribuição no organismo obedece a um modelo tricompartmental. O chumbo permanece aproximadamente um a dois meses nestes tecidos (fígado, rins, medula óssea e cérebro), causando toxicidade celular. Após este período difunde-se para o tecido ósseo onde é depositado e onde permanece durante o período de 10 a 30 anos (EFSA, 2010).

De acordo com a legislação internacional o limite máximo de Pb (II) para o mel de abelha é de $1,0 \text{ mg g}^{-1}$ (Codex Alimentarius Commission, 2001). A legislação brasileira estabelece limite máximo de apenas $0,5 \text{ mg g}^{-1}$ para Pb (II) (Brasil, 2013).

1.5.3 Cobre (Cu)

O metal cobre, apesar de ser um dos metais essenciais à vida, ou seja, um elemento essencial para o organismo, o qual participa do processo de fixação do ferro na hemoglobina do sangue, se consumido em elevadas doses pode apresentar um nível preocupante de toxicidade (Leblebici et al., 2008; Kabata-Pendia, et al. 2000). As fontes de exposição ao cobre são, principalmente, através da alimentação e da água ingerida.

O cobre ingerido é absorvido principalmente na porção proximal do intestino delgado e apenas uma pequena percentagem no estômago (EFSA, 2006).

A toxicidade aguda por ingestão de cobre é rara em humanos, e geralmente ocorre como consequência da contaminação alimentar (EFSA, 2006). Em adultos, a dose letal por ingestão aguda de cobre é de 4 a 400 mg kg^{-1} . A ingestão de doses elevadas de Cu^{2+} leva a hemorragia gastrointestinal, toxicidade hepatocelular, insuficiência renal aguda, dentre outras complicações (WHO, 2011).

De acordo com a legislação internacional, os valores máximos de Cu (II) em alimentos não devem exceder a $10,0 \text{ mg g}^{-1}$ (Codex Alimentarius Commission, 2001).

1.5.4 Mercúrio (Hg)

O mercúrio (Hg) é um metal de alta toxicidade e não essencial à saúde humana. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, ele está entre os dez elementos químicos que causam maiores preocupações para a saúde pública, podendo causar efeitos tóxicos em pulmões, rins, pele e olhos, e ainda sobre os sistemas nervoso, digestivo e imunológico (Jan et al., 2015).

Em sua forma metálica, o mercúrio volatiliza-se facilmente, liberando um gás, o qual é incolor, inodoro, quimicamente estável e altamente tóxico. Devido à sua estabilidade, o vapor de mercúrio pode permanecer na crosta terrestre por meses, depositando-se nos corpos d'água, no solo, na atmosfera e nos sedimentos (MMA, 2017).

As intoxicações por Hg (II) apresentam efeitos proporcionais à sua acumulação, ou seja, intoxicações leves caracterizam-se por causar anemia fraqueza, depressão, dermatite, dores de cabeça, anorexia, fadiga, hipertensão, insônia, irritabilidade, problemas de audição e visão e intoxicações mais severas podem levar a inúmeros problemas neurológicos permanentes (Rooney, 2007).

Nos USA, para a água potável, o teor máximo de mercúrio permitido é de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e, em peixes, é de 1 mg kg^{-1} . No Brasil, as normas e padrões de potabilidade de água com qualidade adequada ao consumo humano permite um valor máximo de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ para mercúrio (Micaroni, Bueno e Jardim, 2000).

1.6 Objetivos gerais e específicos

Face ao exposto, o presente trabalho tem por objetivo geral a síntese, a caracterização e o estudo das propriedades das nanopartículas de ouro, prata e de *quantum dots* de CdTe-MPA, bem como sua potencialidade de aplicação no aumento da sensibilidade dos métodos propostos a fim de detectar contaminantes/adulterantes em matrizes alimentares complexas.

Sendo assim, os próximos capítulos apresentaram os objetivos específicos desenvolvidos no decorrer dessa tese.

No segundo capítulo, é descrito o comportamento do contaminante melamina, que poderia estar presente ou não em amostras de leite, na presença de nanopartículas de prata sintetizadas na ausência de agentes passivantes, o que promoveu uma melhor sensibilidade para o método de detecção proposto.

No terceiro capítulo, o metal Pb (II), um dos perigosos contaminantes presentes em amostras de mel, é avaliado e quantificado com o auxílio de nanopartículas de prata sintetizadas sem qualquer agente estabilizante e otimizadas em termos de concentração agente precursor/agente redutor. Esse método de detecção de chumbo em amostras de mel mostrou-se significativamente interessante e viável por ser capaz de quantificar quantidades do metal abaixo daquelas exigidas pela legislação.

No quarto capítulo, *quantum dots* de telureto de cádmio passivados com ácido 3-mercaptopropiônico (CdTe-MPA) são sintetizados e caracterizados a fim de agirem como sondas fluorimétricas para detectar a interferência mútua de analitos metálicos (Cu, Pb e Hg) em sistemas binários e ternários.

No quinto capítulo, nanopartículas de ouro não modificadas são sintetizadas com o objetivo de detectar melamina em amostras de mel por imagem digital RGB. O software GIMP 2.8 foi utilizado para a quantificação do sinal analítico obtido e a partir dos resultados alcançados foi possível verificar que o método proposto mostrou-se bastante sensível frente a outras metodologias já citadas na literatura.

E, finalmente, no sexto e último capítulo, tem-se as conclusões acerca de toda a pesquisa realizada.

Capítulo II

Optimized Synthesis of Silver Nanoparticles by Factorial Design with Application for the Determination of Melamine in Milk



Optimized Synthesis of Silver Nanoparticles by Factorial Design with Application for the Determination of Melamine in Milk

Dayana Borges Bittar, Tiago Augusto Catelani, Karina Nigoghossian, Hernane da Silva Barud, Sidney José Lima Ribeiro, Leonardo Pezza & Helena Redigolo Pezza

To cite this article: Dayana Borges Bittar, Tiago Augusto Catelani, Karina Nigoghossian, Hernane da Silva Barud, Sidney José Lima Ribeiro, Leonardo Pezza & Helena Redigolo Pezza (2017) Optimized Synthesis of Silver Nanoparticles by Factorial Design with Application for the Determination of Melamine in Milk, *Analytical Letters*, 50:5, 829-841, DOI: [10.1080/00032719.2016.1196213](https://doi.org/10.1080/00032719.2016.1196213)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/00032719.2016.1196213>



Accepted author version posted online: 17 Jan 2017.
Published online: 17 Jan 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 57



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Citing articles: 1 View citing articles [↗](#)

SPECTROPHOTOMETRY

Optimized Synthesis of Silver Nanoparticles by Factorial Design with Application for the Determination of Melamine in Milk

Dayana Borges Bittar, Tiago Augusto Catelani, Karina Nigoghossian, Hernane da Silva Barud, Sidney José Lima Ribeiro, Leonardo Pezza, and Helena Redigolo Pezza

Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

A colorimetric method based on silver nanoparticles was developed for the determination of melamine in milk. Silver nanoparticles were synthesized without any stabilizer, using sodium borohydride as the reducing agent. Optimization of the variables for the formation of the nanoparticles was performed by factorial design, resulting in stable colloidal silver nanoparticles with a mean diameter of 14.0 ± 2.7 nm. Spectrophotometric measurements performed at 475 nm showed a linear range from 0.033 to 1.50 mg L^{-1} of melamine with limits of detection and quantification of 0.009 and 0.031 mg L^{-1} , respectively. The method provided highly sensitive determination of melamine in milk.

ARTICLE HISTORY

Received 1 April 2016
Accepted 27 May 2016

KEYWORDS

Adulteration; colorimetry; melamine; milk; silver nanoparticles

Introduction

The adulteration of dairy products, especially milk, may represent a health risk to consumers. The organic compound melamine is one of many potential contaminants that can cause severe intoxication. Melamine (1,3,5-triazine-2,4,6-triamine, $\text{C}_3\text{H}_6\text{N}_6$) is widely used in the production of plastics, resins, coatings, and fertilizers, among other applications (Venkatasami and Sowa 2010). The majority of the molecular mass of the compound consists of nitrogen atoms, which probably explains the illegal incorporation of this substance in milk products by entrepreneurs and milk producers, to maximize profits (Panuwet et al. 2010). Incidents of melamine poisoning provide an example of hazards caused by economically motivated adulteration (Moore et al. 2010).

The ingestion of food containing high concentrations of melamine can lead to serious renal injury or even death. In 2008, melamine was detected in milk and other infant food products produced in China, as well as in dairy products manufactured in the US (Moore et al. 2010). This caused the cessation of trade in these food products and the loss of credibility among consumers and importing countries (Cassoli et al. 2011). After these episodes, regulators implemented stringent rules governing the maximum permissible levels of

CONTACT Helena Redigolo Pezza  hrpezza@iq.unesp.br  Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, R. Prof. Francisco Degni 55, P.O. Box 355, Araraquara, São Paulo 14800-900, Brazil.

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/lanl.

melamine in milk. These are 2.5 mg L^{-1} in the USA and the European Union, and 1.0 mg L^{-1} for infant formulas in China (Zhu, Gamez et al. 2009).

Milk, the main dairy product, is a major dietary component consumed in many countries worldwide, and is therefore of considerable economic importance. Hence, it is essential that the food industry and regulatory agencies ensure the safety of milk and its derivatives consumed by the population.

The most common methods for protein measurement are the total determination of nitrogen by the Dumas or Kjeldahl techniques (Jung et al. 2003). Since these procedures measure total nitrogen in the sample, they are unable to distinguish protein-based nitrogen from nonprotein nitrogen.

The official method for melamine detection, specified by the Food and Drug Administration, uses gas chromatography–mass spectrometry, providing melamine quantification limits of between 0.05 and 10.0 mg kg^{-1} (Food and Drug Administration 2007). Various methods for the detection of melamine in milk products have been described in the literature. These include liquid chromatography with mass spectrometry (Gosciny et al. 2011), high-performance liquid chromatography (Ehling, Tefera, and Ho 2007; Sun et al. 2010), liquid chromatography with tandem mass spectrometry (Ge et al. 2011), gas chromatography with mass spectrometry (Zhu, Wang et al. 2009), capillary electrophoresis (Chang, Chu, and Tseng 2010), nuclear magnetic resonance (Lachenmeier et al. 2009), chemiluminescence analysis (Yokley et al. 2000), enzyme-linked immunosorbent assays (Wang et al. 2010), molecularly imprinted polymer-based sensors (Pietrzyk et al. 2009), matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (Guo et al. 2011), and tandem mass spectrometry/low-temperature plasma probe (Zhu, Gamez et al. 2009).

However, most of these methods require the use of expensive equipment, while others are time consuming and laborious due to the complex pretreatment of samples, requiring extraction, purification, and derivatization, as well as other steps. There is therefore the need for a sensitive, rapid, and inexpensive screening method for the determination of melamine in food.

In recent years, interest in nanoparticles has increased due to their ability to improve the sensitivity of traditional analytical methods used for the detection of contaminants/adulterants in food. The use of lanthanide-doped upconversion nanoparticles has been reported for the selective determination of melamine (Hazra, Adusumalli, and Mahalingam 2014). Several synthetic methods have been used to obtain nanoscale materials. The most widely used are chemical techniques based on reactions performed in solution, leading to the formation of colloids in which the nanoparticles are dispersed in a solvent (Oliveira et al. 2005; Araújo et al. 2012).

It is known that the interaction of metal ions with reducing substances, as well as the conditions and absorption by stabilization agents, strongly affects the size, stability, physicochemical properties, and morphology of metal nanoparticles (Knoll and Keilmann 1999; Chen et al. 2001; Sengupta et al. 2005). Silver nanoparticles are commonly synthesized in solution by reduction methods. These procedures require the use of reducing and stabilizing agents, which can be the same in some cases, such as sodium citrate (Henglein and Giersig 1999; Ping et al. 2012). The nature and concentration of reducing and stabilizing agents greatly influence the functional properties of silver nanoparticles (Ping et al. 2012). The use of stabilizing agents provides barriers that extend between the nanoparticles, hence increasing their stability. However, this type of protective coating

can prevent the nanoparticles from reacting with certain analytes (such as melamine), hindering the detection (Neena, Devraj, and Bhagat 2012). Due to their extremely high extinction coefficients and strongly distance-dependent optical properties, silver nanoparticles have been used for the colorimetric detection of proteins (Ping et al. 2012), small molecules (Yang et al. 2014), ions, and melamine (Miao et al. 2013).

Melamine detection using silver nanoparticles synthesized with sodium citrate has been described previously (Ping et al. 2012). Song et al. (2014a) reported chromotropic acid-modified silver nanoparticles for the visual detection of melamine. Subsequently, Song et al. (2014b) studied silver nanoparticles modified with sulfanilic acid for the detection of the same analyte. Han and Li (2010) developed *p*-nitroaniline-modified silver nanoparticles for visual detection of melamine in infant formula. In all the studies described in the literature, the nanoparticles were synthesized in the presence of stabilizing agents.

The goal of the present work was to determine the optimized experimental conditions for the development of a simple and low-cost process for the production of stable silver nanoparticles. The use of factorial design was shown to be an important tool for increasing the sensitivity of the analytical method, enabling optimization of the concentrations of AgNO₃ and NaBH₄ used to obtain the silver nanoparticles, which has not been previously described in the literature. The nanoparticles were subsequently used for the determination of melamine in milk products at concentrations that may be harmful to human health.

The interaction between melamine amine groups and silver nanoparticles results in alteration in the surface plasmon resonance of the metal nanoparticles (Menon et al. 2012), which may be used for analytical purposes. After optimization of the experimental conditions for the synthesis of the silver nanoparticles by factorial design, the nanoparticles were characterized by ultraviolet/visible spectrophotometry and transmission electron microscopy. Evaluation was then made of the potential of the silver nanoparticles in the absence of stabilizers for the determination of melamine by ultraviolet/visible spectrophotometry.

Experimental

Equipment and materials

Absorbance measurements were performed using a spectrophotometer (Model HP 8453, Hewlett Packard) equipped with a cuvette ($b = 1$ cm). An analytical balance (AG 204, Mettler Toledo) was used for weighing, and sample centrifugation used a refrigerated centrifuge (Universal 320 R, Hettich). An ultrasonic bath (Model T14, Thornton) was used to assist solubilization of the melamine solutions. Eppendorf micropipettes (100–1000 μ L) were used to deliver measured volumes in the experiments.

Reagents and solutions

All reagents were of analytical grade. Solutions were prepared in ultrapure water (18 M Ω cm, Milli-Q system, Millipore). An aqueous melamine (Sigma Aldrich, 99%) stock solution was prepared at a concentration of 1000 mg L⁻¹ by solubilization of 100 mg in deionized water in a 100-mL volumetric flask with sonication for 10 min. An intermediate 100 mg L⁻¹ concentration of melamine was prepared by suitable dilution, and working standards were prepared in the range from 0.1 to 4.5 mg L⁻¹.

Working solutions of AgNO_3 ($3.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) and NaBH_4 ($1.25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) were prepared by dilution of the corresponding $1.00 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ stock solutions. Trichloroacetic acid solution ($3.0 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$) was used to precipitate the proteins in milk.

Preparation of silver nanoparticles

All glassware used for preparation of the silver nanoparticles were dipped in freshly prepared aqua regia (HNO_3/HCl , 1:3) and then rinsed thoroughly with deionized water to ensure removal of contaminants that may influence the synthesis of the nanoparticles. The silver nanoparticles were prepared by the borohydride reduction method with modifications (Creighton, Blatchford, and Albrecht 1979). Optimization of the variables (NaBH_4 and AgNO_3 concentrations) was performed by experimental design methodology using central composite design with response surface. The Minitab 16 and Statistica 8.0 software packages were used for the multivariate analyses.

Under constant magnetic stirring, 6 mL of $1.25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ NaBH_4 was added to a beaker in an ice bath, followed by dropwise addition of 2 mL of $3.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ AgNO_3 , producing a golden-yellow solution. At the end of the synthesis, the stirrer was switched off and the solution was transferred to a bottle protected from light, for storage in a refrigerator before the subsequent experiments. The synthesized silver nanoparticles were stable for at least 5 days when stored at $4.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$.

Stability of the silver nanoparticles

To study the effect of storage on the silver nanoparticles prepared in this work using the optimized variable values as well as silver nanoparticles prepared as described in the literature (Solomon et al. 2007), the nanoparticles were stored in the dark at $4.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$, in polypropylene bottles covered with aluminum foil. Absorbance measurements at 400 nm of the silver nanoparticle solutions were performed for 7 days.

Preparation of milk

Four milk samples (A–D) were used to evaluate the performance of the proposed method. The samples were purchased from a local market in Araraquara (São Paulo, Brazil).

Milk is a highly complex matrix, so the samples were pretreated using the method described by Ni et al. (2014) with modifications. 5 mL of fresh milk was placed in a centrifuge tube, followed by the addition of 1.5 mL of $3.0 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ trichloroacetic acid. After 1 min of manual shaking, the tube was sonicated for 10 min and centrifuged at $9.0 \times 10^3 \text{ rpm}$ for 10 min. The supernatant was heated to boiling to precipitate serum proteins (Fox and Mcsweeney 1998; Vasbinder et al. 2003). The supernatant was collected and passed through filter paper, and the pH was adjusted to 7.0 with 10 mol L^{-1} NaOH. The resulting solution was passed through a $0.22\text{-}\mu\text{m}$ filter and diluted 25-d before analysis.

Calibration relationships

After optimization of the variables by multivariate analysis, 300- μL aliquots of melamine standard solutions at different concentrations were mixed with 600 μL of silver

nanoparticles, in triplicate, giving final melamine concentrations of 0.033, 0.133, 0.333, 0.833, 1.17, and 1.50 mg L⁻¹.

Standard addition and recovery

Standard addition was used to evaluate possible matrix interferences. Four liquid milk samples were used, fortified with melamine at 0.80 and 1.47 mg L⁻¹. The fortified samples were pretreated as described for the milk samples, and were then analyzed by ultraviolet/visible spectrophotometry at 475 nm.

Results and discussion

Preliminary tests with silver nanoparticles synthesized with stabilizers (sodium citrate, ascorbic acid, and pectin) were performed with the goal of improving the sensitivity of the method for the determination of melamine in milk samples (Turkevich, Stevenson, and Hillier 1951; Fukuyo and Imai 2002; Nigoghossian et al. 2015). However, no positive results were obtained, possibly because the stabilization agents formed a protective coating that blocked interaction with the analyte of interest. Passivation or functionalization agents were not used, because the objective was to achieve direct interaction between the silver nanoparticles and the analyte. In the reported method, silver nanoparticles were therefore used in the absence of stabilization agents, which resulted in a significant increase in sensitivity.

Stabilization of silver nanoparticles

Silver nanoparticles are stabilized in aqueous solution by coating them with citrate ions (Pinto et al. 2010). In the same way, silver nanoparticles may be stabilized in aqueous solution by the adsorption of borohydride, which provides a surface charge surrounding the nanoparticle. Excess borohydride is needed to reduce the ionic silver and stabilize the silver nanoparticles. The nanoparticles are held in solution by repulsive electrostatic forces (Doty et al. 2005) between the particles due to the adsorbed borohydride. The use of excess of borohydride increases the overall ionic strength and promotes aggregation. Therefore, the quantity of borohydride must be sufficient to stabilize the nanoparticles without promoting aggregation.

Central composite design

Since only two variables were considered (the concentrations of AgNO₃ and NaBH₄), central composite design was the best approach for optimization of the procedure (Montgomery and Myers 2002). The values of the variables were studied using five levels, with four central points.

The minimum and maximum concentrations of the variables used to obtain the response surface were (mol L⁻¹): (1) 1.00 × 10⁻³ and 5.00 × 10⁻³ (AgNO₃), and (2) 5.00 × 10⁻⁴ and 2.00 × 10⁻³ (NaBH₄). Figure 1 shows the three-dimensional response surface graph obtained from the results. The quadratic regression model is described by:

$$Z = -0.387 + 228.078x - 40928.125x^2 + 876.613y - 368822.222y^2 + 17666.667xy, \quad (1)$$

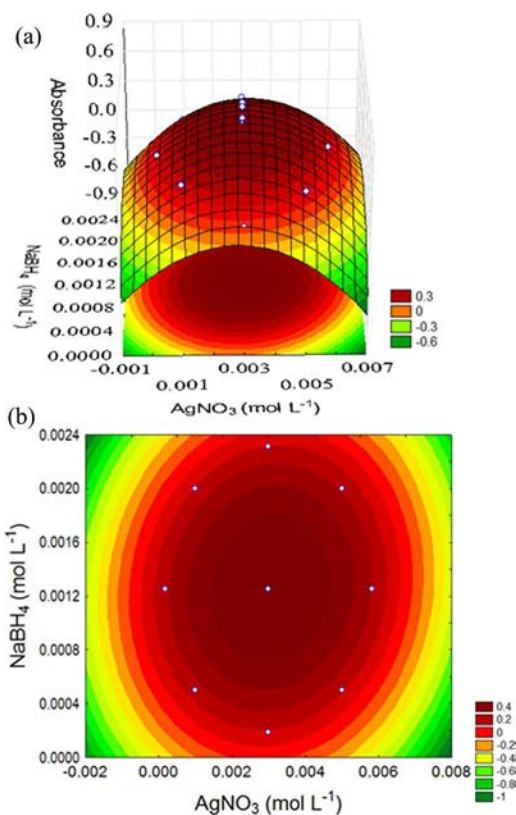


Figure 1. (a) Central composite design and (b) its projection based on absorbance measurements as functions of AgNO_3 and NaBH_4 concentrations.

where Z is the response factor (corresponding to an absorbance value), and the factors x and y are the concentrations of AgNO_3 and NaBH_4 , respectively. Figure 1 shows that the critical values (optimized variable values) for AgNO_3 and NaBH_4 were $3.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ and $1.25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, respectively. Therefore, an $\text{AgNO}_3/\text{NaBH}_4$ molar ratio of 1:1.25 was the best ratio for the minimum possible excess of sodium borohydride ensuring its stabilizing effect.

Stability of the silver nanoparticles

The stability of the silver nanoparticles using the optimized variable values (2 mL of $3.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ AgNO}_3$ and 6 mL of $1.25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ NaBH}_4$) was compared with those obtained using the synthesis conditions commonly described in the literature (1 mL of $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ AgNO}_3$ and 3 mL of $2.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ NaBH}_4$), where the $\text{AgNO}_3/\text{NaBH}_4$ molar ratio is 1:6. The latter condition uses an excess of sodium borohydride to reduce and stabilize the silver nanoparticles. However, the excess of NaBH_4 , when not optimized, increases the ionic strength of the system and causes aggregation of the nanoparticles (Solomon et al. 2007), which is undesirable for efficient interaction between the nanoparticles and the analyte.

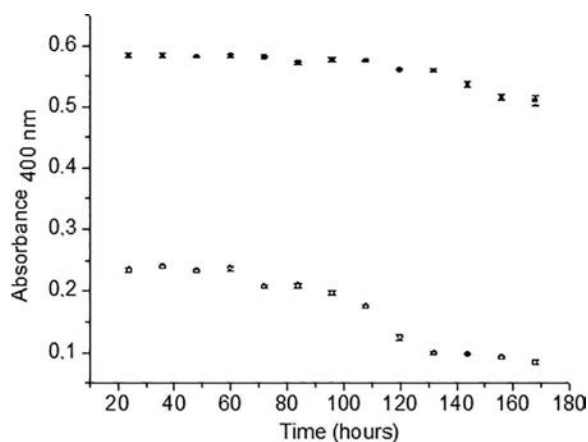


Figure 2. Absorbance as a function of time for the silver nanoparticles: (\square) literature conditions using $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ AgNO}_3$, $2.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ NaBH}_4$ and (\blacksquare) this work using $3.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ AgNO}_3$ and $1.25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ NaBH}_4$. The absorbance was measured at 400 nm with a pathlength of 1 cm.

The results in Figure 2 compare the changes in absorbance, as a function of the time, for the nanoparticles obtained by the synthesis procedures. The silver nanoparticles obtained using the optimized conditions showed higher stability and absorbance, indicating their suitability for use in the development of a highly sensitive spectrophotometric method for the quantification of melamine.

Transmission electron microscopy and absorption spectra of silver nanoparticles

It is well known that silver nanoparticles exhibit a yellow-brown color in aqueous solution, due to excitation of a surface plasmon resonance band in the ultraviolet/visible region (Hussain et al. 2011). The absorption spectrum of the stable silver nanoparticles showed a typical absorbance peak at 400 nm (Figure 3), indicating that the particles were well dispersed.

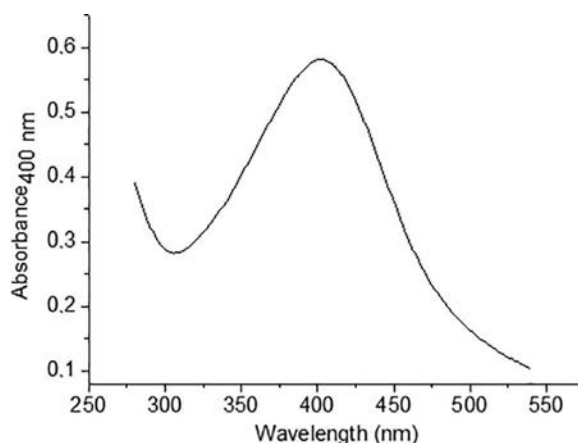


Figure 3. Absorption spectrum at 400 nm for silver nanoparticles in the absence of melamine.

After the addition of melamine to the solution, silver nanoparticles were rapidly added and a color change of the solution was observed. Ping et al. (2012) reported that only the three amino groups of melamine are important in the interaction between melamine and silver nanoparticles, causing a rapid color change from yellow to red, while the three-nitrogen hybrid ring makes no significant contribution. The transmission electron microscopy images of silver nanoparticles in the absence (Figure 4a) and in the presence (Figure 4b) of melamine (at a concentration of 1.50 mg L^{-1}) showed clear evidence of particle aggregation (Figure 4b). The average size of the silver nanoparticles was determined using ImageJ software. Fifty nanoparticles were used for the calculation, and the average size found was $14.0 \pm 2.7 \text{ nm}$.

Analytical figures of merit

The figures of merit of the analytical method evaluated included the limits of detection and quantification, precision, accuracy, and linear range. Under the optimized conditions, a linear response was obtained for melamine concentrations between 0.033 and 1.50 mg L^{-1} . The linear equation obtained was: $\text{Absorbance}_{(475\text{nm})} = 0.385 + 0.155 \times C_{\text{melamine}}$ ($R = 0.999$). Repeatability measurements using intraday and interday measurements of a 0.133 mg L^{-1} standard solution resulted in relative standard deviations less than 2.5%.

The detection and quantification limits were determined according to IUPAC recommendations (Long and Winefordner 1983), using the expressions $3 \times (s/b)$ and $10 \times (s/b)$, respectively, where s is the standard deviation of the points of the curve, and b is the slope of the linear range. The calculated detection and quantification limits were 0.009 and 0.031 mg L^{-1} , respectively. Figure 5 shows the analytical curves and the different colors of the silver nanoparticles. All measurements were performed at 475 nm .

Analysis of milk

The effectiveness of the method was evaluated by the analysis of melamine in milk. Recovery assays were performed to determine the accuracy of the method and detect

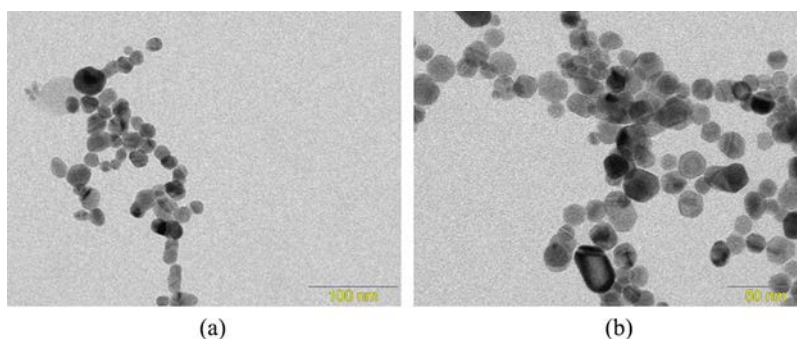


Figure 4. Transmission electron micrographs of silver nanoparticles in the (a) absence and (b) presence of 1.50 mg L^{-1} melamine.

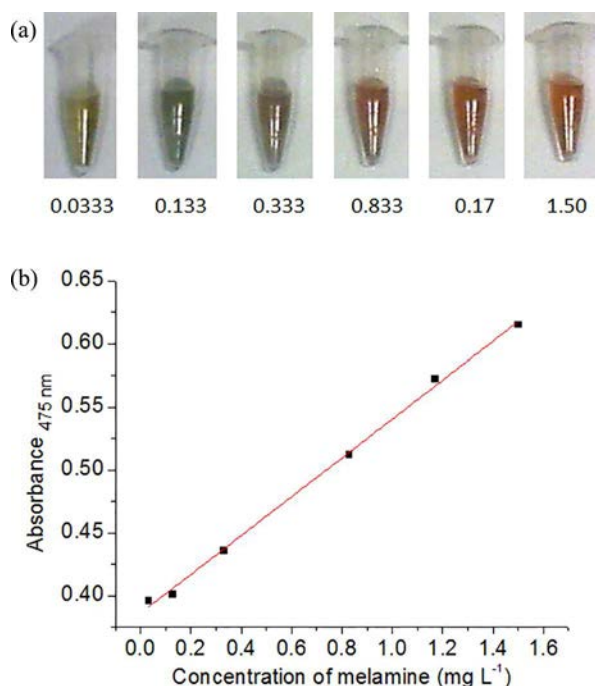


Figure 5. (a) Photographs of the nanoparticles at various melamine concentrations and (b) the calibration curve obtained using 0.033, 0.133, 0.333, 0.833, 1.17, and 1.50 mg L⁻¹ melamine.

possible matrix interferences. Samples spiked with melamine (Table 1) showed recoveries from 61.9 to 96.7%, indicative of good accuracy and an absence of any major matrix effects in the method.

Compared to previously reported methods for the determination of melamine using silver nanoparticles, this approach provides a lower detection limit, as shown in Table 2. The increased sensitivity in the absence of protective agents suggests greater interaction between the silver nanoparticles and the amino groups of melamine compared to other methods. The use of protective agents provides barriers between the nanoparticles. The obtained results suggest that this protective coating prevents the nanoparticles from reacting with melamine, hindering the detection of the latter. Additional advantages of the new method are that sample preparation involves straightforward dilution and that the subsequent quantification was performed with portable equipment, enabling in situ analysis.

Table 1. Recovery of melamine in milk ($n = 3$).

Sample	Added value (mg L ⁻¹)	Found value (mg L ⁻¹)	Recovery (%)
A	0.80	0.750 ± 0.001	93.8 ± 0.1
	1.47	1.160 ± 0.003	78.9 ± 0.2
B	0.80	0.700 ± 0.001	87.5 ± 0.1
	1.47	0.910 ± 0.003	61.9 ± 0.2
C	0.80	0.770 ± 0.001	96.3 ± 0.1
	1.47	0.950 ± 0.003	64.6 ± 0.2
D	0.80	0.670 ± 0.002	83.8 ± 0.3
	1.47	0.920 ± 0.002	62.6 ± 0.1

Table 2. Analytical figures of merit for this protocol and previously reported methods for the determination of melamine using silver nanoparticles.

Method	Linear dynamic range (mg L ⁻¹)	Limit of detection (mg L ⁻¹)	Reference
Colorimetric with silver nanoparticles	–	0.100	Han and Li (2010)
Colorimetric with label-free silver nanoparticles	0.50–21.4	0.292	Ping et al. (2012)
Surface-enhanced Raman spectroscopy with silver nanoparticles	0.50–10.0	0.010	Zhang et al. (2010)
Raman spectroscopy with silver nanoparticles	5.00–150	2.00	Rajapandiyan, Tang, and Yang (2015)
Colorimetric with silver nanoparticles without stabilizers	0.033–1.50	0.009	This work

Conclusion

A simple, rapid, and sensitive colorimetric method has been developed for the determination of melamine in milk, using its adsorption on the surfaces of silver nanoparticles by the amine groups. A simple synthesis of colloidal silver nanoparticles, without the need for any stabilization agent, was optimized by factorial design. The silver nanoparticles synthesized were stable for at least 5 days at $4.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$. The synthesis of silver nanoparticles without a colloid stabilizer likely resulted in a greater interaction between the silver nanoparticles and the amino groups of melamine, thereby increasing the sensitivity. The determination of melamine in commercial milk samples was demonstrated; therefore this approach offers a reliable and advantageous alternative to existing methods.

Funding

We would like to thank the Brazilian agencies CAPES and CNPq for financial support.

References

- Araújo, E. A., N. J. Andrade, L. H. M. da Silva, P. C. Bernardes, Á. V. N. de C. Teixeira, J. P. N. de Sá, J. F. Q. Fialho Jr., and P. E. Fernandes. 2012. Antimicrobial effects of silver nanoparticles against bacterial cells adhered to stainless steel surfaces. *Journal of Food Protection* 4:701–705. doi:10.4315/0362-028x.jfp-11-276
- Cassoli, L. D., B. Sartori, A. Zampar, and P. F. Machado. 2011. An assessment of Fourier transform infrared spectroscopy to identify adulterated raw milk in Brazil. *International Journal of Dairy Technology* 64:480–85. doi:10.1111/j.1471-0307.2011.00711.x
- Chang, C. W., S. P. Chu, and W. L. Tseng. 2010. Selective extraction of melamine using 11-mercaptopundecanoic acid-capped gold nanoparticles followed by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 1217:7800–806. doi:10.1016/j.chroma.2010.10.023
- Chen, W., W. Cai, L. Zhang, G. Wang, and L. Zhang. 2001. Sonochemical processes and formation of gold nanoparticles within pores of mesoporous silica. *Journal of Colloid and Interface Science* 238:291–95. doi:10.1006/jcis.2001.7525
- Creighton, J. A., C. R. Blatchford, and M. G. Albrecht. 1979. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* 75:790–98. doi:10.1039/f29797500790
- Doty, R. C., T. R. Tshikhudo, M. Brust, and D. G. Fernig. 2005. Extremely stable water-soluble Ag nanoparticles. *Chemistry of Materials* 17:4630–35. doi:10.1021/cm0508017

- Ehling, S., S. Tefera, and I. P. Ho. 2007. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous detection of the adulteration of cereal flours with melamine and related triazine by-products ammeline, ammelide, and cyanuric acid. *Food Additives and Contaminants* 24:1319–25. doi:10.1080/02652030701673422
- Food, and Drug Administration. 2007. Interim melamine and analogues safety/risk assessment. <http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/07n-0208-ra00001.pdf> (accessed February 23, 2015).
- Fox, P. F., and P. L. H. McSweeney. 1998. *Dairy chemistry and biochemistry*. London, UK: Blackie Academic and Professional.
- Fukuyo, T., and H. J. Imai. 2002. Morphological evolution of silver crystals produced by reduction with ascorbic acid. *Journal of Crystal Growth* 24:193–99. doi:10.1016/s0022-0248(02)00913-2
- Ge, J., L. W. Zhao, C. Y. Liu, S. R. Jiang, P. W. Lee, and F. M. Liu. 2011. Rapid determination of melamine in soil and strawberry by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Control* 22:1629–33. doi:10.1016/j.foodcont.2011.03.020
- Gosciny, S., V. Hanot, J. F. Halbardier, J. Y. Michelet, and J. Van Loco. 2011. Rapid analysis of melamine residue in milk, milk products, bakery goods and flour by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry: From food crisis to accreditation. *Food Control* 22:226–30. doi:10.1016/j.foodcont.2010.04.032
- Guo, Z. Y., P. P. Gai, T. T. Hao, S. Wang, D. Y. Wei, and N. Gan. 2011. Determination of melamine in dairy products by an electrochemiluminescent method combined with solid-phase extraction. *Talanta* 83:1736–41. doi:10.1016/j.talanta.2010.12.013
- Han, C., and H. Li. 2010. Visual detection of melamine in infant formula at 0.1 ppm level based on silver nanoparticles. *Analyst* 135:583–88. doi:10.1039/b923424a
- Hazra, C., N. K. B. Adusumalli, and V. Mahalingam. 2014. 3,5-Dinitrobenzoic acid-capped upconverting nanocrystals for the selective detection of melamine. *ACS Applied Materials & Interfaces* 6:7833–39. doi:10.1021/am5011089
- Henglein, A., and M. Giersig. 1999. Formation of colloidal silver nanoparticles: Capping action of citrate. *The Journal of Physical Chemistry B* 103:9533–39. doi:10.1021/jp9925334
- Hussain, J. I., S. Kumar, A. A. Hashmi, and Z. Khan. 2011. Silver nanoparticles: Preparation, characterization, and kinetics. *Advanced Materials Letters* 2:188–94. doi:10.5185/amlett.2011.1206
- Jung, S., D. A. Rickert, N. A. Deak, E. D. Aldin, J. Recknor, L. A. Johnson, and P. A. Murphy. 2003. Comparison of Kjeldahl and Dumas methods for determining protein contents of soybean products. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80:1169–73. doi:10.1007/s11746-003-0837-3
- Knoll, B., and F. Keilmann. 1999. Near-field probing of vibrational absorption for chemical microscopy. *Nature* 399:134–37.
- Lachenmeier, D. W., E. Humpfer, F. Fang, B. Schütz, P. Dvortsak, C. Sproll, and M. Spraul. 2009. NMR-spectroscopy for nontargeted screening and simultaneous quantification of health-relevant compounds in foods: The example of melamine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:7194–99. doi:10.1021/jf902038j
- Long, G. L., and J. D. Winefordner. 1983. Limit of detection: A closer look at the IUPAC definition. *Analytical Chemistry* 55:712A–24A. doi:10.1021/ac00258a724
- Menon, S. K., B. R. Mistry, K. V. Joshi, P. G. Sutariya, and R. V. Patel. 2012. Analytical detection and method development of anticancer drug Gemcitabine HCl using gold nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 94:235–42. doi:10.1016/j.saa.2012.02.061
- Miao, P., T. Liu, X. Li, L. Ning, J. Yin, and K. Han. 2013. Highly sensitive, label-free colorimetric assay of trypsin using silver nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics* 49:20–24. doi:10.1016/j.bios.2013.04.038
- Montgomery, D. C., and R. H. Myers. 2002. *Response surface methodology: Process and product optimization using design experiments*, 2nd ed. New York, US: Wiley.
- Moore, J. C., J. W. DeVries, M. Lipp, J. C. Griffiths, and D. R. Abernethy. 2010. Total protein methods and their potential utility to reduce the risk of food protein adulteration. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9:330–57. doi:10.1111/j.1541-4337.2010.00114.x
- Neena, D., K. M. Devraj, and A. P. Bhagat. 2012. Role of capping agent in the synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Pharmacy Research* 5:4710–12.

- Ni, P., H. Dai, Y. Wang, Y. Sun, Y. Shi, J. Hu, and Z. Li. 2014. Visual detection of melamine based on the peroxidase-like activity enhancement of bare gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics* 60:286–91. doi:10.1016/j.bios.2014.04.029
- Nigoghossian, K., M. V. dos Santos, H. S. Barud, R. R. da Silva, L. A. Rocha, J. M. A. Caiut, R. M. N. de Assunção, L. Spanhel, M. Poulain, Y. Messaddeq, and S. J. L. Ribeiro. 2015. Orange pectin mediated growth and stability of aqueous gold and silver nanocolloids. *Applied Surface Science* 341:28–36. doi:10.1016/j.apsusc.2015.02.140
- Oliveira, M. M., D. Ugarte, D. Zanchet, and A. J. G. Zarbin. 2005. Influence of synthetic parameters on the size, structure, and stability of dodecanethiol-stabilized silver nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* 292:429–35. doi:10.1016/j.jcis.2005.05.068
- Panuwet, P., E. L. Wade, J. V. Nguyen, M. A. Montesano, L. L. Needham, and D. B. Barr. 2010. Quantification of cyanuric acid residue in human urine using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 878:2916–22. doi:10.1016/j.jchromb.2010.08.019
- Pietrzyk, A., W. Kutner, R. Chitta, M. E. Zandler, F. D'Souza, F. Sanniccolo, and P. R. Mussini. 2009. Melamine acoustic chemosensor based on molecularly imprinted polymer film. *Analytical Chemistry* 81:10061–70. doi:10.1021/ac9020352
- Ping, H., M. Zhang, H. Li, S. Li, Q. Chen, C. Sun, and T. Zhang. 2012. Visual detection of melamine in raw milk by label-free silver nanoparticles. *Food Control* 23:191–97. doi:10.1016/j.foodcont.2011.07.009
- Pinto, V. V., M. J. Ferreira, R. Silva, H. A. Santos, F. Silva, and C. M. Pereira. 2010. Long time effect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium: Effect of the synthesis and storage conditions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 364:19–25. doi:10.1016/j.colsurfa.2010.04.015
- Rajapandiyam, P., W. L. Tang, and J. Yang. 2015. Rapid detection of melamine in milk liquid and powder by surface-enhanced Raman scattering substrate array. *Food Control* 56:155–60. doi:10.1016/j.foodcont.2015.03.028
- Sengupta, S., D. Eavarone, I. Capila, G. Zhao, N. Watson, T. Kiziltepe, and R. Sasisekharan. 2005. Temporal targeting of tumour cells and neovasculature with a nanoscale delivery system. *Nature* 436:568–72. doi:10.1038/nature03794
- Solomon, S. D., M. Bahadory, A. V. Jeyarajasingam, S. A. Rutkowsky, C. Boritz, and L. Mulfinger. 2007. Synthesis and study of silver nanoparticles. *Journal of Chemical Education* 2:322–25. doi:10.1021/ed084p322
- Song, J., F. Wu, Y. Wan, and L. H. Ma. 2014a. Visual test for melamine using silver nanoparticles modified with chromotropic acid. *Microchimica Acta* 181:1267–74. doi:10.1007/s00604-014-1227-4
- Song, J., F. Wu, Y. Wan, and L. H. Ma. 2014b. Colorimetric detection of melamine in pretreated milk using silver nanoparticles functionalized with sulfanilic acid. *Food Control* 50:356–61. doi:10.1016/j.foodcont.2014.08.049
- Sun, H. W., L. X. Wang, L. F. Ai, S. X. Liang, and H. Wu. 2010. A sensitive and validated method for determination of melamine residue in liquid milk by reversed phase high-performance liquid chromatography with solid-phase extraction. *Food Control* 21:686–91. doi:10.1016/j.foodcont.2009.10.008
- Turkevich, J., P. C. Stevenson, and J. Hillier. 1951. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society* 11:55–75. doi:10.1039/df9511100055
- Vasbinder, A. J., A. C. Alting, R. W. Visschers, and C. G. de Kruif. 2003. Texture of acid milk gels: Formation of disulfide cross-links during acidification. *International Dairy Journal* 13:29–38. doi:10.1016/s0958-6946(02)00141-3
- Venkatasami, G., and J. R. Sowa Jr. 2010. A rapid, acetonitrile-free, HPLC method for determination of melamine in infant formula. *Analytica Chimica Acta* 665:227–30. doi:10.1016/j.aca.2010.03.037
- Wang, Z. Y., X. Ma, L. Y. Zhang, W. J. Yang, L. M. Gong, P. L. He, and Z. Li. 2010. Screening and determination of melamine residues in tissue and body fluid samples. *Analytica Chimica Acta* 662:69–75. doi:10.1016/j.aca.2010.01.004

- Yang, N., Y. Gao, Y. Zhang, Z. Shen, and A. Wu. 2014. A new rapid colorimetric detection method of Al^{3+} with high sensitivity and excellent selectivity based on a new mechanism of aggregation of smaller etched silver nanoparticles. *Talanta* 122:272–77. doi:[10.1016/j.talanta.2014.01.035](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.035)
- Yokley, R. A., L. C. Mayer, R. Rezaaiyan, M. E. Manuli, and M. W. Cheung. 2000. Analytical method for the determination of cyromazine and melamine residues in soil using LC-UV and GC-MSD. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:3352–58. doi:[10.1021/jf991231w](https://doi.org/10.1021/jf991231w)
- Zhang, X., M. Zou, X. Qi, F. Liu, X. Zhu, and B. Zhao. 2010. Detection of melamine in liquid milk using surface-enhanced Raman scattering spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* 41:1655–60. doi:[10.1002/jrs.2629](https://doi.org/10.1002/jrs.2629)
- Zhu, L., G. Gamez, H. Chen, K. Chingin, and R. Zenobi. 2009. Rapid detection of melamine in untreated milk and wheat gluten by ultrasound-assisted extractive electrospray ionization mass spectrometry (EESI-MS). *Chemical Communications* 5:559–61. doi:[10.1039/b818541g](https://doi.org/10.1039/b818541g)
- Zhu, X. L., S. H. Wang, Q. Liu, Q. Xu, S. X. Xu, and H. L. Chen. 2009. Determination of residues of cyromazine and its metabolite, melamine, in animal-derived food by gas chromatography-mass spectrometry with derivatization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:11075–80. doi:[10.1021/jf902771q](https://doi.org/10.1021/jf902771q)

Capítulo III

A fast method for the determination of lead in honey samples using stabilizer-free silver nanoparticles



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/saa

A fast method for the determination of lead in honey samples using stabilizer-free silver nanoparticles



Dayana Borges Bittar, Tiago Augusto Catelani, Leonardo Pezza, Helena Redigolo Pezza *

Institute of Chemistry, Sao Paulo State University (UNESP), Rua Prof. Francisco Degni 55, P.O. Box 355, 14800-900 Araraquara, Sao Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 May 2017

Received in revised form 7 August 2017

Accepted 9 August 2017

Available online 12 August 2017

Keywords:

Silver nanoparticles

Lead

Contamination

Honey

ABSTRACT

A sensitive, rapid and robust method based on the use of stabilizer-free silver nanoparticles was developed for lead detection in honey. Silver nanoparticles were synthesized without the presence of any stabilizers using silver nitrate and sodium borohydride as precursors where the latter was applied as reducing agent. The optimization of the experimental variables (AgNO_3 and NaBH_4) for the formation of the nanoparticles was carried out using varying volumes of these solutions. Spectrophotometric measurements at 393 nm showed a linear working range between 0.0500 and 0.167 mg L^{-1} lead ($R = 0.994$), with limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 0.0135 and 0.0451 mg L^{-1} , respectively. The proposed method proved to be a significantly sensitive mechanism for lead detection in honey samples.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Honey is a natural product known to be endowed with nutritional properties and valuable therapeutic applications [1]. It is used as a means of nourishment for feeding thousands of people, from childhood to adulthood. As a result of its ample consumption, the control of the chemical and microbiological quality of honey is deemed to be hugely relevant. It is a natural food produced by the *Apis mellifera* bees, being one of the most complex products produced in nature, and contains a complex mixture of carbohydrates, mainly glucose and fructose, enzymes, amino acids, organic acids, aromatic substances, vitamins, pigments, wax and pollen, which together contribute towards the composition of its color, odor and taste [2,3]. Its composition largely depends on the floral origin of the plant, as well as the chemical composition of the nectar and secretions, and is subject to contaminants of diverse nature, namely environmental pollutants, agricultural pesticides, products used in beekeeping besides pathogenic microorganisms that can be incorporated into it during processing [4]. Several authors such as Conti and Botrè [5] and Perugini et al. [6] identify bees and their products as bio-indicators of environmental pollution.

Pollutants, in particular, heavy metals, may be deposited directly on bees, or contaminate them indirectly through nectar, pollen or from ingested water [6,7]. As such, the presence of heavy metals in honey may be indicative of environmental pollution. The control of residues and any adulterants or contaminants in honey provides a sanitary guarantee to this product, which along with the application of good hygiene practices throughout the production chain ensure the provision of a safe

and quality product to consumers [8]. Some metal contaminants can be introduced through artificial feeding of the bees. Nutritional supplementation solutions may present high concentrations of Cd, Co, Fe, K, Mg, Mn, Pb and Na, giving rise to contamination during processing [9]. In this work, lead was chosen by reason of its detrimental effects on human health which include fatigue, irritability, anemia, dizziness, headache, sensory disorders, memory loss, muscle tremors and reduced neurophysiological functions [10].

The detection and determination of trace elements in honey essentially require the application of appropriate analytical methodologies. This determination of inorganic constituents in honey is, clearly, not a trivial task given the high level of carbohydrates present in this complex matrix and the low concentration of these analytes. Several techniques have been developed and improved for a better investigation of these compounds in honey and in food products in general. Some of these techniques that merit mentioning include: anodic redissolution voltammetry [11,12]; high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry [13]; electrothermal evaporation coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry [14]; electrothermal atomic absorption spectrometry [15]; inductively coupled plasma optical emission spectrometry [16]; atomic absorption spectroscopy [5]; atomic absorption spectrometry with graphite furnace [17]; and X-ray fluorescence spectrometry by total reflection [18].

Concentrations of different heavy metals in honey produced in different locations and in different flowering have already been determined in some countries, such as Croatia [1], Poland [19], Turkey [20], Italy [21], Slovenia [22] and Brazil [23]. Spectrophotometric techniques are the most widely employed when it comes to the detection and quantification of heavy metals, with atomic absorption spectrometry being the most widely applied.

* Corresponding author.

E-mail address: hrpezza@iq.unesp.br (H.R. Pezza).

For the intended purposes of our investigation, we proposed the application of a colorimetric assay technique for the determination of Pb^{2+} in aqueous solution based on the aggregation of the AgNPs in contact with this metal. In other words, AgNPs were induced to aggregate in the presence of Pb^{2+} through electrostatic interactions and metal-nanoparticles. Besides that, a sensitive, fast and robust method that makes use of silver nanoparticles, free of stabilizers, was developed and optimized for lead detection in honey samples of different flowering.

2. Experimental

2.1. Equipment and Materials

Absorbance measurements were performed using a spectrophotometer (Model HP 8453, Hewlett Packard) equipped with a quartz cuvette ($b = 1$ cm). An analytical balance (AG 204, Mettler Toledo) was used for weighing. A muffle EDG Equipment (Edgcon 3P) and a hot plate were used to promote the mineralization of honey samples. Eppendorfs and micropipettes of 100 to 1000 μ L were also used for the volumes measured in the experiments.

2.2. Reagents and Solutions

All reagents were of analytical grade. The glassware was maintained in 10% (v/v) HNO_3 solution for 24 h and rinsed with deionized water before use. The solutions were prepared with ultrapure water (18 $M\Omega\text{ cm}^{-1}$, Milli-Q system, Millipore). The working solutions were prepared by appropriate dilutions of certified lead stock solution (Sigma Aldrich, 99%) and at the concentration of 1000 $mg\text{ L}^{-1}$. An intermediate working solution of 10 $mg\text{ L}^{-1}$ concentration was also prepared by dilution and by the working standards in the range of 0.3–1.0 $mg\text{ L}^{-1}$. Nitric acid (65%, v/v) was also used for the mineralization process of honey samples. Working solutions of sodium chloride (Merck, Darmstadt, Germany) were obtained by dilution.

The working solutions of $AgNO_3$ ($1.00 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$, 3 mL) and $NaBH_4$ ($2.00 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$, 6 mL) for the synthesis of silver nanoparticles were prepared by diluting their respective stock solutions at the concentration of $1.00 \times 10^{-1}\text{ mol L}^{-1}$.

2.3. Preparation of Silver Nanoparticles

Silver nanoparticles (AgNPs) were synthesized by chemical reduction of silver nitrate using sodium borohydride as a reducing agent in aqueous solution in the absence of organic stabilizers prepared via the method described by Solomon et al. [24], upon some modifications. The sodium borohydride solution was added to a beaker under constant and vigorous stirring and the silver nitrate solution was then slowly and steadily dripped into the borohydride solution until it exhibited a golden yellow color. Five tests were performed with the aim of obtaining the most stable nanoparticle which is at the same time sensitive to the analyte (lead). Table 1 indicates the volumes and the molar ratio used in the synthesis of each nanoparticle.

After the synthesis, the obtained nanoparticles were stored in a refrigerator at 4 ± 2.0 °C and their stability was evaluated for twenty

Table 1
Volumes of $AgNO_3$ and $NaBH_4$ tested for the synthesis of silver nanoparticles and their respective molar ratios.

Test	$AgNO_3$ volume (mL)	$NaBH_4$ volume (mL)	$AgNO_3/NaBH_4$ molar ratio
1	2.0	12.0	1:3.00
2	3.0	12.0	1:2.00
3	3.5	12.0	1:1.71
4	4.0	12.0	1:1.50
5	6.0	12.0	1:1.00

four days, a period regarded sufficiently conducive for the development of all experiments required for the research.

2.4. AgNPs Surface Properties: Possibility of Aggregation Through the Influence of Ionic Strength and pH

Borohydride is found to play a crucial role in the stabilization of silver nanoparticles. This reducing agent when present in large excessive amount increases the total ionic strength of the system besides promoting the aggregation of the nanoparticles [24]. In view of that, the amount of borohydride should be sufficient to enable the stabilization of the nanoparticles without causing the aggregation of the colloidal solution. Nonetheless, aggregation is also likely to be triggered through the addition of electrolytes, such as NaCl [25], which may be present in the complex matrix to be evaluated. Bearing these factors into account, the ionic strength was tested using five different concentrations of NaCl, in $mol\text{ L}^{-1}$ of 1.00; 0.50; 0.10; 0.05; 0.01, aiming at verifying the behavior of the colloidal solution with regard to this electrolyte.

The pH, considered a relevant factor, was likewise tested so as to verify the interference in an eventual possibility of aggregation of the silver nanoparticles obtained. The pH was changed from 9.0 to 2.5 using 0.50 $mol\text{ L}^{-1}$ of HNO_3 . The electrode was calibrated with pH values of 4.01 ± 0.02 and 7.01 ± 0.02 , prior to each measurement.

2.5. Analytical Curve

Upon the optimization of the working nanoparticle, the analytical curve was constructed by adding 200 μ L aliquot of the AgNPs to 200 μ L of standard lead solutions in different concentrations, followed by 800 μ L of deionized water in quintuplet giving rise to the final concentrations of 0.167; 0.150; 0.133; 0.117; 0.100; 0.0830; 0.0670; 0.0500 $mg\text{ L}^{-1}$, respectively. The assays were performed aiming at reading the respective analytical signals, the absorbances, by means of a spectrophotometer at the wavelength of 393 nm.

2.6. Samples of Honey

Six samples of honey, from three different flowering plants (eucalyptus, orange and grapevine), were purchased directly from a beekeeper in the city of Araraquara/SP and were used to evaluate the performance of the proposed method.

2.7. Dry Digestion Procedure of the Samples

Based on the method proposed by Conti and Botrè [5], with some modifications, ten grams of each sample of honey were placed in a porcelain crucible for reduction to ashes in muffle using a temperature gradient of the oven at 30 °C until reaching the final temperature of 550 ± 5 °C. The samples were mineralized for 6 h in order to guarantee the total destruction of all organic matter, until obtaining ash residues in white and/or gray. After 6 h, the residue was cooled to room temperature and dissolved in 2 mL of HNO_3 (65%, v/v). The solution was taken to a heating plate for the slow evaporation of nitric acid to ensure the presence of only inorganic residues in the final product. The solution was finally transferred to a 10 mL volumetric flask and quenched with deionized water. A solution of 0.1 $mol\text{ L}^{-1}$ of NaOH was used in order to operate under the same pH range of the standard lead solutions in contact with silver nanoparticles.

2.8. Study of Interferences

The interferences were evaluated by studying the behavior of the reaction in the presence of some metals commonly found in honey including cadmium, copper, cobalt, chromium, iron, aluminum and nickel. The concentrations, being 10 times greater than that of lead metal, were assessed under the same conditions described for the samples.

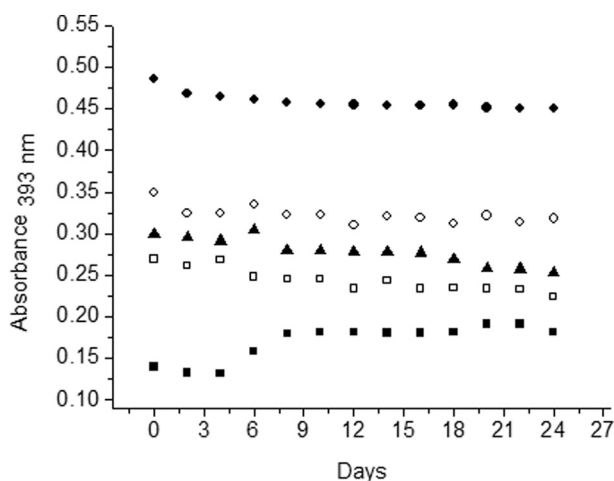


Fig. 1. Stability of the nanoparticles 1 (■), 2 (□), 3 (▲), 4 (○) and 5 (●) synthesized with different molar ratios of the precursor solutions of AgNO_3 and NaBH_4 .

After having defined some of the probable interfering ions, a study aimed at confirming the interference hypothesis was performed using the interference factor (I.F.) for each ion. The interference factor is calculated by the mathematical ratio of the absorption of the lead ion (II) to the interfering ion ($\Delta\text{Abs}(\text{Pb(II)} + \text{interfering ion})$) through the variation of absorbance of the lead ion (II) ($\Delta\text{Abs}(\text{Pb(II)})$). Interference factors below 0.95 and greater than 1.05 are associated with interference effect [26]. As a result of the treatment process of honey samples (high temperature and use of nitric acid), all proteins present in the medium are denatured with the total loss of activity [27], hence, there is no need to perform an interference test on proteins.

2.9. Matrix Effect Study: Pattern Addition and Recovery

The proposed method was validated through standard addition and by investigating the possible effects associated with the matrix under study - honey. The samples were fortified with lead solution at 50, 100, 150% of the maximum concentration allowed by the legislation [28]. They were then analyzed via the proposed and comparative methods. All analyses were performed in five-fold.

2.10. Comparative Method

Flame atomic absorption spectrometry (FAAS) presents a relatively low cost and has excellent analytical performances. It is probably the most widely applied technique for the analysis of a variety of metals in foods. The conventional way to perform such determinations involves a mineralization phase in order to obtain a suitable solution to be introduced into the spectrometer.

Honey samples were analyzed by FAAS as a comparative method [29–31] aiming at confirming the robustness and reliability of the proposed method. A FAAS Varian SpectrAA 50 spectrometer was used in the experiments for lead determination in honey samples. For the measurements, some operational parameters were set including wavelength at 217 nm, slot width of 1 nm and operation carried out under air-acetylene flame.

3. Results and Discussion

Preliminary tests with silver nanoparticles synthesized with different volumes of AgNO_3 and NaBH_4 were performed with the objective of obtaining a stable nanoparticle and improving the sensitivity of the proposed method for lead determination in honey samples.

Following the synthesis of the AgNPs, a stability test was performed. As can be observed in Fig. 1, the nanoparticle number 5 exhibited the highest absorbance and the best stability among all the nanoparticles during the period under analysis.

Based on the stability test, the nanoparticle number 5 was chosen as the working AgNP owing to the fact that it presented the highest stability and the greatest absorbance compared to the other nanoparticles tested. All nanoparticles were synthesized in the absence of stabilizing agents. Bittar et al. [32] concluded that stabilizing agents actually prevent the analyte of interest from reacting with silver nanoparticles, since these stabilizing agents form a coating around the nanoparticles, rendering the nanoparticle-analyte interaction difficult. Fig. 2 shows the absorbance spectrum of AgNP at 393 nm, which is symmetrical and narrow in shape and the transmission electron microscopy images of the silver nanoparticles. These features ensure the presence of mono-disperse nanoparticles.

3.1. Interference of Ionic Strength and pH in the Aggregation of AgNPs

A study of the interference of the electrolyte present in the colloidal medium of the nanoparticles was performed. Fig. 3 depicts the absorbance obtained for the working nanoparticle in the presence of different concentrations of the NaCl electrolyte.

Based on the data obtained, we observed that the stabilization of the AgNPs is less efficient in the presence of high concentrations of the electrolyte. This can be explained by the fact that in the presence of high salt concentration, the sodium borohydride ceases to be a good stabilizing agent, thereby providing a weak steric stabilization of the silver ions [25]. It is possible to consider that in concentrations of NaCl equal to 0.10; 0.05 and 0.01 mol L^{-1} , the nanoparticles are stable, since the addition of concentrations equal to or greater than 0.50 mol L^{-1} causes the destruction of the colloidal solution of nanoparticles and their consequent aggregation as a result of the increase in the ionic strength of the medium.

The pH was evaluated starting from the original AgNP solution, which after synthesis presented pH equal to 9.2. As the pretreatment

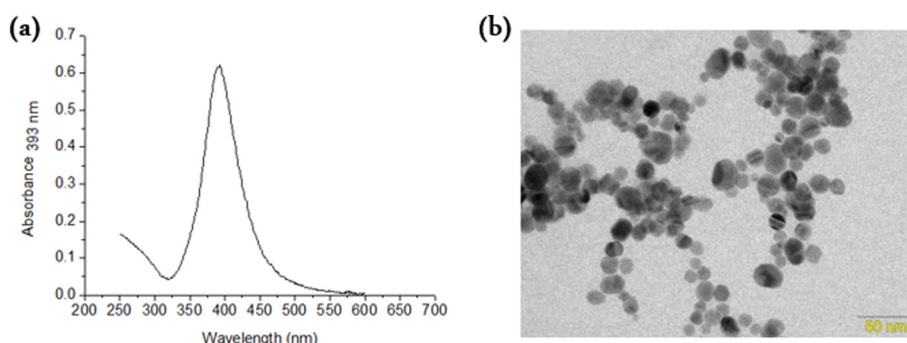


Fig. 2. (a) AgNP spectrum in the absence of lead obtained according to the conditions of experiment 5, Table 1, with $b = 1$ cm and $\lambda = 393$ nm; (b) transmission electron microscopy images of the silver nanoparticles.

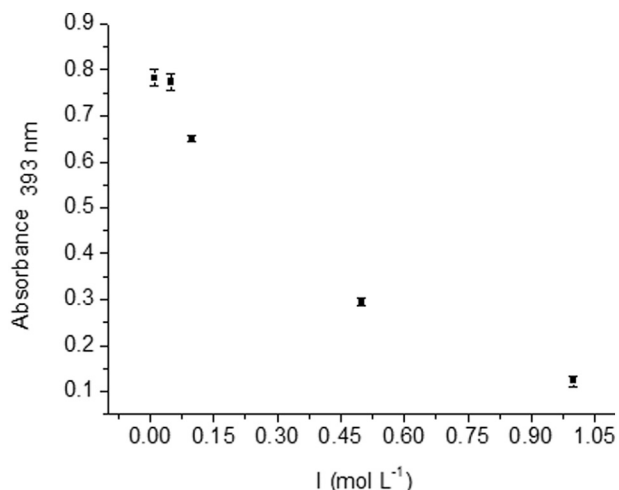


Fig. 3. Absorbance behavior of the working AgNP obtained in the presence of the different concentrations of NaCl: 1.00, 0.50, 0.10, 0.05, and 0.01 mol L⁻¹, respectively.

of the honey samples investigated entailed the addition of concentrated HNO₃ in the mineralization process, an assessment was made relative to the importance of testing the influence of pH on the stability of AgNPs. Fig. 4 shows the relationship between absorbance and pH of the working nanoparticle. The pH was reduced with the aid of a solution of HNO₃ 0.1 mol L⁻¹.

Based on what was observed, we arrived at the conclusion that following the mineralization of the honey samples there was a need to correct the final solution pH to pH 4.2, restoring the pH of the system. Thus, the aggregation of the nanoparticles would be avoided when they are in contact with the samples to be analyzed. To this end, 0.1 mol L⁻¹ of NaOH solution was employed and this led to coherent and reliable results.

3.2. Analytical Figures of Merit

The merit figures of the analytical method included the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), precision, accuracy, and linear range. Under optimized experimental conditions, a linear response was obtained for the final lead concentrations between 0.0500 and 0.167 mg L⁻¹. Repeatability tests using intra-day measurements of standard solutions of 0.050 mg L⁻¹ and 0.100 mg L⁻¹ resulted in relative standard deviations (% RSD) of 1.2 and 4.2% while tests using inter-day measurements of the same solutions resulted in relative

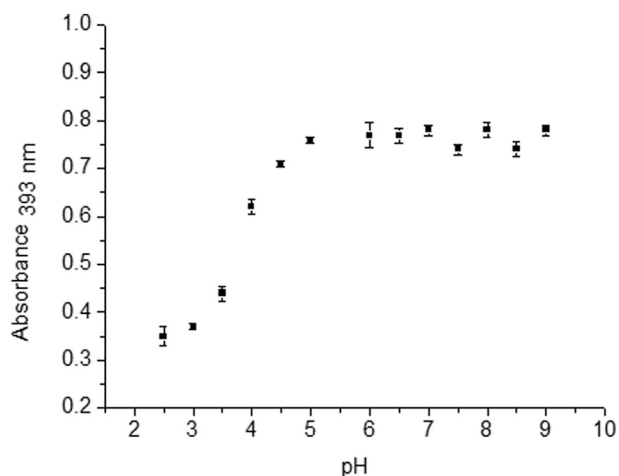


Fig. 4. Relationship between absorbance and pH of silver nanoparticles colloidal solution ($\lambda = 393$ nm).

Table 2

Analytical characteristics of the proposed method for lead analysis.

Parameters	Values
Linear Range	0.0500–0.167 mg L ⁻¹
Correlation coefficient(R)	0.994
Equation	$A = 0.702 - 3.646 \times C_{Pb}$
LOD (mg L ⁻¹)	0.0135
LOQ (mg L ⁻¹)	0.0451
Wavelength (nm)	393

standard deviations (% RSD) of 2.6 and 1.0%, respectively. The analytical curve and its parameters are presented in Table 2.

LOD and LOQ were determined according to IUPAC recommendations [33] using the expressions $3 \times (s/b)$ and $10 \times (s/b)$, respectively, where s is the standard deviation of the points of the curve while b stands for the slope of the linear range. The calculated LOD and LOQ values were 0.0135 and 0.0451 mg L⁻¹, respectively. Fig. 5 shows the analytical curve and the different colorations, in other words, the screening obtained by the system among the silver nanoparticles in the presence of different lead concentrations.

As the studies evolved, new maximum limits were established for contaminants in honey, as established by the normative instruction n^o8 of 2010, of the Ministry of Livestock and Supply [34]. This normative instruction approved the programs for the control of residues and contaminants in meat (bovine, poultry, pork and equine), milk, honey, eggs and fish for fiscal year 2010. In the case of honey, the maximum level of 0.50 mg kg⁻¹ was allowed for As, Cd, Pb and Hg.

In 2011, MERCOSUL established a maximum lead limit of 0.30 mg kg⁻¹ in honey samples. This limit was adopted by Brazil once the country is a member of MERCOSUL. For the development of this work and by virtue of the fact that they present relatively better sensitivity, silver nanoparticles were used for further tests in order to detect the presence or absence of lead contaminant in the analyzed samples.

3.3. Study of Interferences

The study of potential interfering metals was performed considering the typical composition of the honey samples, with evaluation of the

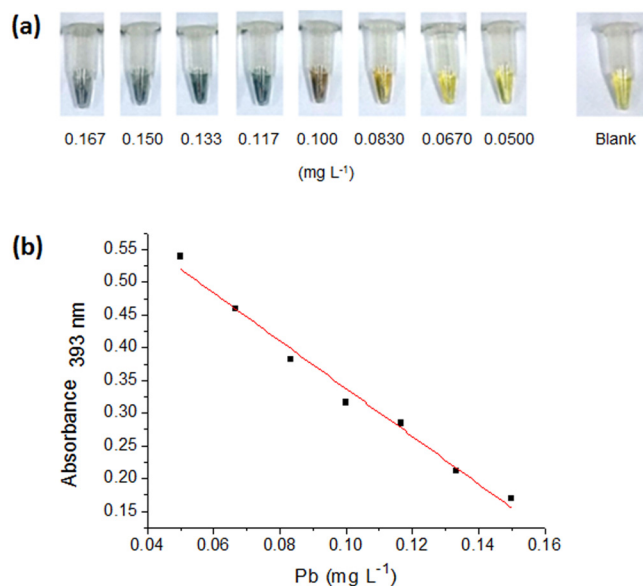


Fig. 5. (a) Colors obtained for different concentrations of lead in the presence of AgNPs and a blank in the absence of the analyte; (b) Calibration curve obtained by the measured absorbance ($\lambda = 393$ nm) of the AgNPs system with final lead concentrations of 0.0500; 0.0670; 0.0830; 0.100; 0.117; 0.133; 0.150; 0.167 mg L⁻¹, respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 3
Interference factors of some metals commonly found in honey.

Metals	Interference factor (I.F.)
Cd	0.957
Cu	0.962
Co	0.972
Cr	0.998
Fe	0.978
Al	0.968
Ni	1.003

effects of seven metals commonly found in this type of matrix. Table 3 was constructed based on the values obtained. As can be noted, no interferences were observed in the proposed method for the interfering concentrations tested.

By observing the values of the interference factors calculated and presented in Table 3 for each ion, one will notice that all of them presented values within the range of 0.95 to 1.05, in other words, with percentages below the tolerable limit (5.0%). Thus, it is possible to observe a negative interference effect, i.e., all the ions tested are not interfering agents.

3.4. Addition and Recovery Tests: Application in Honey Samples of Different Flowering

Preliminary tests for lead quantification in honey samples were performed. It is noteworthy that none of the methods (both proposed and comparative) indicated the presence of heavy metals. As a result, we evaluated the need to perform standard addition tests on the analyzed samples.

The accuracy of the proposed method was assessed by fortification tests performed on the complex honey matrix of three different flowering plants (a eucalyptus flora, an orange flora and a grapevine flora). Table 4 shows the data obtained for the fortification tests (0.30 mg kg⁻¹). The concentration of Pb was determined by the use of standard solutions of Pb at concentrations 50, 100 and 150% superior to the maximum concentration in honey (0.30 mg kg⁻¹) allowed by law. The mean values were obtained from five replicates performed for each type of honey.

The results obtained by *t*-test, for the average comparison of the repetitions of the proposed and comparative methods proved that there

were no significant differences between them (with a confidence level of 95.0%). This demonstrated that the results obtained by the two methods were comparable. For the purpose of confirming this outcome, the data obtained were statistically analyzed. Table 4 also shows that the application of the paired Student's *t*-test was indispensable, as the calculated *t*-value was less than the tabulated *t*-value. These results reinforce the fact that there was no significant difference between the two methods.

The use of AgNPs for lead detection in complex honey matrix has not yet been described in the literature. Several other methods have already been used for the detection of lead as well as other trace metals in honey samples at extremely low concentrations. For instance, for Italian honeys, the concentration of lead found was between 3.2 and 186 ng g⁻¹ [11,13,14,35]. Uren et al. [36] reported to have obtained concentrations between 32.9 and 55.2 ng g⁻¹ for Turkish samples. Celechovska 'and Vorlova' [37] have also previously found values close to 1000 ng g⁻¹ in Czech honey samples.

In a study by Vanhanen et al. [38], the average levels of heavy metals in New Zealand honey were 1.180, 0.149 and 0.017 mg kg⁻¹ for Zn, Cd and Pb, respectively. These values could be compared to the quantities of heavy metals reported in honey samples from Poland, which were 0.048, 0.015 and 7.76 mg kg⁻¹ of Zn, Cd and Pb, respectively [19]. Based on the data reported for New Zealand honey, it is worth noting that lead metal was not detected in five of the ten types of honey analyzed in the country while the average of this metal found in honey samples from the country was 450 times lower compared to those from Poland [19].

Thus, the results presented in our present work are, in essence, coherent and reliable. They point to the absence of lead metal in the samples analyzed. Furthermore, acceptable values were obtained for the recovery tests conducted. Clearly, the proposed screening method using silver nanoparticles devoid of stabilizers is, indeed, a method that has great potential for application in honey samples.

The proposed method has demonstrated to be an essentially efficient alternative and clearly more advantageous compared to most of the previously reported methods for the analysis of lead in honey. The fact that it is fast, easy to conduct, and allows viewing the detection signal through the naked eyes makes this method analytically worthy of appreciation. While the method exhibited lower sensitivity compared to the other methods described in the literature, it is sufficiently sensitive for the determination of lead in honey in amounts lower than those established by law.

Table 4
Recovery values obtained using the proposed method (AgNP) and the comparative method (FAAS) as well as the values of calculated-*t* (Student's *t*-test) for the two methods.

Samples	Added value (mg kg ⁻¹)	Value found (mg kg ⁻¹) (Proposed method)	Recovery (%)	Value found (mg kg ⁻¹) (Comparative method)	Recovery (%)	Student's <i>t</i> -test: calculated- <i>t</i> value*
Eucalyptus honey ^a	0.45	0.504 ± 0.05	112.02 ± 11.84	0.365 ± 0.03	81.21 ± 7.25	0.967
	0.60	0.565 ± 0.09	94.10 ± 15.52	0.639 ± 0.10	106.57 ± 16.31	
	0.75	0.798 ± 0.05	106.37 ± 6.80	0.651 ± 0.03	86.84 ± 4.35	
Orange honey ^a	0.45	0.591 ± 0.07	119.04 ± 14.40	0.497 ± 0.12	110.33 ± 27.12	1.552
	0.60	0.689 ± 0.07	114.89 ± 11.74	0.663 ± 0.03	110.54 ± 5.44	
	0.75	0.776 ± 0.08	103.40 ± 10.80	0.770 ± 0.03	102.73 ± 4.35	
Grape fruit honey ^a	0.45	0.586 ± 0.04	120.36 ± 9.79	0.425 ± 0.03	94.44 ± 7.25	1.968
	0.60	0.607 ± 0.08	101.13 ± 13.24	0.544 ± 0.03	90.69 ± 5.44	
	0.75	0.779 ± 0.04	103.94 ± 5.86	0.759 ± 0.07	101.14 ± 8.70	
Eucalyptus honey ^b	0.45	0.510 ± 0.06	113.33 ± 14.26	0.377 ± 0.03	83.86 ± 5.92	3.919
	0.60	0.582 ± 0.06	97.06 ± 10.69	0.532 ± 0.04	88.70 ± 5.44	
	0.75	0.774 ± 0.11	103.13 ± 14.66	0.675 ± 0.03	90.02 ± 3.55	
Orange honey ^b	0.45	0.384 ± 0.04	85.34 ± 9.14	0.354 ± 0.03	78.56 ± 7.25	3.626
	0.60	0.560 ± 0.05	93.40 ± 7.61	0.473 ± 0.03	78.77 ± 5.44	
	0.75	0.701 ± 0.06	93.52 ± 5.98	0.616 ± 0.03	82.08 ± 3.55	
Grapefruit honey ^b	0.45	0.505 ± 0.05	112.26 ± 11.72	0.342 ± 0.03	75.91 ± 5.92	3.742
	0.60	0.540 ± 0.06	90.02 ± 9.91	0.461 ± 0.03	76.79 ± 4.44	
	0.75	0.681 ± 0.06	90.74 ± 7.60	0.604 ± 0.03	80.49 ± 4.35	

^a Honey collected in the second half of 2015.

^b Honey collected in the first half of 2016.

* Student's *t*-test: tabulated *t*-value = 4.3027 (95% confidence level).

4. Conclusion

In this work, the proposed methodology for lead determination using stabilizer-free silver nanoparticles has proven to be suitably effective and reliable. With the aid of calibration curve, we were able to obtain an LOQ of around 0.0451 mg L^{-1} (or $0.0451 \text{ mg kg}^{-1}$) which is relatively lower compared to the value allowed by the current legislation. Remarkably, the mineralization of the honey samples for subsequent tests was found to be effective while the interferences of the matrix through the fortification process of the samples were carried out without the need of the presence of organic compounds in the medium. The results obtained clearly demonstrate the method potential for application in the quantification of Pb in honey samples of different flowering.

Acknowledgements

The authors would like to express their sincerest gratitude and indebtedness to the Brazilian research funding agencies - CAPES and CNPq, for the financial support provided during the course of this research.

References

- [1] N. Bilandžić, M. Dokić, M. Sedak, B.S. Kolanović, I. Varenina, A. Koncurat, N. Rudan, Determination of trace elements in Croatian floral honey originating from different regions, *Food Chem.* 128 (2011) 1160–1164.
- [2] B. Fallico, M. Zappala, E. Arena, A. Verzera, Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys, *Food Chem.* 85 (2004) 305–313.
- [3] M. Kućić, S. Kolaylı, S. Karaoglu, E. Ulusoy, C. Baltacı, F. Candan, Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia, *Food Chem.* 100 (2007) 526–534.
- [4] M.R. Martinho, A criação de abelhas, *Publicações Globo Rural*, Rio de Janeiro, 1988.
- [5] M.E. Conti, F. Botrè, Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination, *Environ. Monit. Assess.* 69 (2000) 267–282.
- [6] M. Perugini, M. Manera, L. Grotta, M.C. Abete, R. Tarasco, M. Amorena, Heavy metal (Hg, Cr, Cd and Pb) contamination in urban areas and wildlife reserves: honeybees as bioindicators, *Biol. Trace Elem. Res.* 140 (2011) 170–176.
- [7] C. Porrini, A.G. Sabatini, S. Girotti, S. Ghini, P. Medrzycki, F. Grillenzoni, L. Bortolotti, E. Gattavacchia, G. Celli, Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination, *Apiacta* 38 (2003) 63–70.
- [8] PAN, 2011–2013, Programa Apícola Nacional Triênio de 2011–2013, Ministério da Agricultura, do desenvolvimento rural e das pescas, 2010.
- [9] P. Pohl, Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries, *Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 117–128.
- [10] O.A. Davies, M.E. Allison, H.S. Uyi, Bioaccumulation of heavy metals in water, sediment and periwinkle (*Tympanotonus fuscatus var radula*) from the Elechi Creek, Niger Delta, *Afr. J. Biotechnol.* 5 (2006) 968–973.
- [11] G. Sanna, M.I. Pilo, P.C. Piu, A. Tapparo, R. Seeber, Determination of heavy metals in honey by anodic stripping voltammetry at microelectrodes, *Anal. Chim. Acta* 415 (2000) 165–173.
- [12] A. Hassan, M.A.A. Ghandour, A.M.M. Ali, H.A. Mahran, Evaluation of lead, cadmium and copper concentrations in bee honey and edible molasses, *Am. J. Appl. Sci.* 7 (2010) 315–322.
- [13] S. Caroli, G. Forte, A.L. Iamiceli, B. Galoppi, Determination of essential and potentially toxic trace elements in honey by inductively coupled plasma-based techniques, *Talanta* 50 (1999) 327–336.
- [14] M. Bettinelli, U. Baroni, S. Spezia, C. Terni, Determination of trace elements in honey using ETV-ICP-MS, *At. Spectrosc.* 21 (2000) 195–204.
- [15] J.C.R. García, J. Barciela García, C. Herrero Latorre, S. García Martín, R.M. Peña Crecente, Comparison of palladium–magnesium nitrate and ammonium dihydrogen phosphate modifiers for lead determination in honey by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Food Chem.* 91 (2005) 435–442.
- [16] Z. Leblebici, A. Aksoy, Determination of heavy metals in honey samples from central Anatolia using plasma optical emission Spectrofluorimetry (ICP-OES), *Pol. J. Environ. Stud.* 17 (2008) 549–555.
- [17] Z. Ajtony, L. Bencs, R. Haraszi, J. Szigeti, N. Szoboszlai, Study on the simultaneous determination of some essential and toxic trace elements in honey by multi-element graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Talanta* 71 (2007) 683–690.
- [18] P. Kump, M. Necemer, J. Snajder, Determination of trace elements in bee honey, pollen and tissue by total reflection and radioisotope X-ray fluorescence spectrometry, *Spectrochim. Acta B* 51 (1996) 499–507.
- [19] P. Przybyłowski, A. Wilczyńska, Honey as an environmental marker, *Food Chem.* 74 (2001) 289–291.
- [20] S. Silici, O.D. Uluozlu, M. Tuzen, M. Soylak, Assessment of trace element levels in *Rhododendron* honeys of Black Sea Region, Turkey, *J. Hazard. Mater.* 156 (2008) 612–618.
- [21] A. Pisani, G. Protano, F. Riccobono, Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy), *Food Chem.* 107 (2008) 1553–1560.
- [22] T. Golob, U. Doberšek, P. Kump, M. Necemer, Determination of trace and minor elements in Slovenian honey by total reflection X-ray fluorescence spectroscopy, *Food Chem.* 91 (2005) 593–600.
- [23] R.O.R. Ribeiro, E.T. Mársico, E.F.O. Jesus, C.S. Carneiro, C.A.C. Júnior, E. Almeida, V.F.N. Filho, Determination of trace elements in honey from different regions in Rio de Janeiro State (Brazil) by total reflection X-ray fluorescence, *J. Food Sci.* 79 (2014) 738–742.
- [24] S.D. Solomon, M. Bahadory, A.V. Jeyarajasingam, S.A. Rutkowsky, C. Boritz, L. Mulfinger, Synthesis and study of silver nanoparticles, *J. Chem. Educ.* 2 (2007) 322–325.
- [25] D. Radziuk, A. Skirtach, G. Sukhorukov, D. Shchukin, H. Möhwald, Stabilization of silver nanoparticles by polyelectrolytes and poly(ethylene glycol), *Macromol. Rapid Commun.* 28 (2007) 848–855.
- [26] S.P. Eiras, J.C. Andrade, R.E. Bruns, Catalytic determination of molybdenum-VI in plants using mono-segmented continuous-flow analysis and spectrophotometric detection, *Analyst* 118 (1993) 213–217.
- [27] F. Mallamace, et al., Energy landscape in protein folding and unfolding, *PNAS* 113 (2016) 3159–3163.
- [28] MERCOSUL, Mercado Comum do Sul. GMC/RES n° 012/2011, Regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos, http://www.bvms.saude.gov.br/bvms/saudelegis/anvisa/2013/rdc0042_29_08_2013.html 2011, Accessed date: 2 June 2017.
- [29] V.A. Lemos, G.T. David, An on-line cloud point extraction system for flame atomic absorption spectrometric determination of trace manganese in food samples, *Microchem. J.* 94 (2010) 42–47.
- [30] D. Citak, M. Tuzen, A novel preconcentration procedure using cloud point extraction for determination of lead, cobalt and copper in water and food samples using flame atomic absorption spectrometry, *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 1399–1404.
- [31] S.L.C. Ferreira, M.A. Bezerra, W.N.L. dos Santos, B.B. Neto, Application of Doehlert designs for optimization of an on-line preconcentration system for copper determination by flame atomic absorption spectrometry, *Talanta* 61 (2003) 295–303.
- [32] D.B. Bittar, T.A. Catelani, K. Nigoghossian, H.D.S. Barud, S.J.L. Ribeiro, L. Pezza, H.R. Pezza, Optimized synthesis of silver nanoparticles by factorial design with application for the determination of melamine in milk, *Anal. Lett.* 50 (2017) 829–841.
- [33] G.L. Long, J.D. Winefordner, Limit of detection a closer look at the IUPAC definition, *Anal. Chem.* 55 (1983) 712–724.
- [34] BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aprova o Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado para o exercício de 2010. Instrução Normativa n° 8, de 29 de abril de 2010, Diário Oficial da União, Brasília, 3 de maio de 2010.
- [35] S. Caroli, G. Forte, M. Alessandrelli, R. Cresti, M. Spagnoli, S. D'Illo, J. Pauwels, G.N. Kramer, A pilot study of the production of a certified reference material for trace elements in honey, *Microchem. J.* 67 (2000) 227–233.
- [36] A. Uren, A. Serifoglu, Y. Sarikahya, Distribution of elements in honeys and effect of a thermoelectric power plant on the element contents, *Food Chem.* 61 (1998) 185–190.
- [37] O. Celechovská, L. Vorlová, Groups of honey - physicochemical properties and heavy metals, *Acta Vet. Brno* 70 (2001) 91–95.
- [38] L.P. Vanhanen, A. Emmertz, G.P. Savage, Mineral analysis of mono-floral New Zealand honey, *Food Chem.* 128 (2011) 236–240.

Capítulo IV

Multiplexed analysis combining distinctly-sized CdTe-MPA quantum dots and chemometrics for multiple mutually interfering analyte determination



Multiplexed analysis combining distinctly-sized CdTe-MPA quantum dots and chemometrics for multiple mutually interfering analyte determination

Dayana B. Bittar^a, David S.M. Ribeiro^{b,*}, Ricardo N.M.J. Páscoa^b, José X. Soares^b, S. Sofia M. Rodrigues^b, Rafael C. Castro^b, Leonardo Pezza^a, Helena R. Pezza^a, João L.M. Santos^{b,*}

^a Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, R. Prof. Francisco Degni 55, P.O. Box 355, 14800-900 Araraquara, SP, Brazil

^b LAQV, REQUIMTE, Department of Chemical Sciences, Laboratory of Applied Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira no 228, 4050-313 Porto, Portugal

ARTICLE INFO

Keywords:

CdTe quantum dots
Heavy metals
Multiplexing
Chemometrics
Fluorescence
Multiparametric analysis

ABSTRACT

Semiconductor quantum dots (QDs) have demonstrated a great potential as fluorescent probes for heavy metals monitoring. However, their great reactivity, whose tunability could be difficult to attain, could impair selectivity yielding analytical results with poor accuracy. In this work, the combination in the same analysis of multiple QDs, each with a particular ability to interact with the analyte, assured a multi-point detection that was not only exploited for a more precise analyte discrimination but also for the simultaneous discrimination of multiple mutually interfering species, in the same sample. Three different MPA-CdTe QDs (2.5, 3.0 and 3.8 nm) with a good size distribution, confirmed by the FWHM values of 48.6, 55.4 and 80.8 nm, respectively, were used. Principal component analysis (PCA) and partial least squares regression (PLS) were used for fluorescence data analysis. Mixtures of two MPA-CdTe QDs, emitting at different wavelength namely 549/566, 549/634 and 566/634 nm were assayed. The 549/634 nm emitting QDs mixture provided the best results for the discrimination of distinct ions on binary and ternary mixtures. The obtained RMSECV and R^2 CV values for the binary mixture were good, namely, from 0.01 to 0.08 mg L⁻¹ and from 0.74 to 0.89, respectively. Regarding the ternary mixture the RMSECV and R^2 CV values were good for Hg(II) (0.06 and 0.73 mg L⁻¹, respectively) and Pb(II) (0.08 and 0.87 mg L⁻¹, respectively) and acceptable for Cu(II) (0.02 and 0.51 mg L⁻¹, respectively). In conclusion, the obtained results showed that the developed approach is capable of resolve binary and ternary mixtures of Pb (II), Hg (II) and Cu (II), providing accurate information about lead (II) and mercury (II) concentration and signaling the occurrence of Cu (II).

1. Introduction

One of the most challenging fields of nanotechnology contemplates the development of nanomaterials to be applied as efficient and reliable (bio)chemosensors for a multiplicity of organic and inorganic species in distinct analytical endeavors [1]. Quantum dots (QDs) are a class of nanoparticles that besides the features associated with their small size, such as high surface-to-volume ratio and reactivity, they also exhibit remarkable properties that outshine those of conventional materials. Among these, the high size-tunable photoluminescence (PL) and long-term photostability, broad excitation and narrow emission spectra, and the great operational and instrumental simplicity associated with their utilization with analytical purposes, should be highlighted [2].

On the opposite side, when devoid of specific analyte recognition mechanisms, QDs proneness to participate in a variety of reactional

schemes limits their applicability when the sample matrix is complex and/or interfering species are present. In this context QDs are capable of assuring sensitivity, high sample throughput and broad analytical concentration working ranges, but selectivity is usually severely restrained. Basically, their photoluminescence could be modulated by a variety of factors, including pH, ionic strength, the presence of adsorbates and chelating molecules, the occurrence of oxidizing or reducing agents, heavy metals, etc, not directly related with the specie under analysis. These are capable of interacting with the QDs affecting the measured PL either in terms of intensity, emission maxima or lifetime. QDs selectivity could be more or less amended by using specific capping ligands more likely to interact with the analyte, by adjustment of QDs size, by using dopants or by exploring indirect measurements relying on competing molecules, etc. Nonetheless, the success of these measures is usually limited, in particular in the case of

* Corresponding authors.

E-mail addresses: dsrribeiro@gmail.com (D.S.M. Ribeiro), joalms@ff.up.pt (J.L.M. Santos).

typical QD-based (bio)chemosensors relying on the monitoring of a single interaction between the analyte and the probe.

An expeditious strategy to overcome this limitation involves the simultaneous utilization of multiple QDs, with distinct properties and reactivity and capable of establishing multiple variable magnitude interactions with the analyte. This is achieved by combining, in the same analysis, several QDs with dissimilar composition and size, emitting at distinct wavelength and with varied surface ligands, thus enabling a multi-wavelength detection of all analyte-triggered changes on the QDs photoluminescence. Although all QDs might react with the analyte, the combination of the individual responses gives rise to a multi-point detection which could provide additional and more reliable information concerning the analyte occurrence. Moreover, if the QDs interaction are adequately discriminate, and by using chemometrics for data processing and analysis, it would be possible to simultaneously analyze more than one analyte with the same set of QDs.

In this work we have studied how the combination of QDs with distinct reactivity, which resulted merely from distinct size, could be exploited for multi-analyte monitoring. Cadmium telluride (CdTe) QDs were used due to the great simplicity of preparation by hydrothermal method [3], which allowed the obtaining of nanocrystals with narrow size distribution, narrow and symmetric emission spectra, high quantum yield and long-term water stability. Moreover, in recent years CdTe QDs have been extensively used in chemical analysis confirming to be excellent fluorescent probes for the monitoring of a wide variety of species [4–10]. The CdTe QDs were synthesized by using a short chain thiol molecule, 3-mercaptopropionic acid (MPA), as capping ligand and distinct heating times in order to attain sizes ranging from 2.48 to 3.81 nm.

As target analytes three distinct heavy metals Hg(II), Cu(II) and Pb(II) were assayed. Mercuric ion (Hg^{2+}) is one of the most hazardous heavy metals in the environment. Due to its high bioavailability through biological membranes it could cause serious damage to the central nervous and endocrine systems [11]. Copper is an essential element for many living organisms, but it becomes toxic at high concentrations [12]. Pb^{2+} has received a great attention as a consequence of the adverse environmental and health problems resulting from lead poisoning [13].

Many works have demonstrated that these heavy metals showed a great reactivity towards CdTe QDs, yielding pronounced PL quenching effects, and acting as interfering species among each other in individual assays [14,15]. In this work, distinct combinations of the referred heavy metals at low level concentrations were assayed, in two or three components sets, confirming that the developed approach was capable of satisfactorily discriminate the occurring species and the respective concentration.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

Chemicals used in this work were all of analytical reagent grade without any treatment process. All solutions and standards were prepared using water purified from a Milli-Q system (conductivity $\leq 0.1 \mu\text{S cm}^{-1}$).

The reagents for the synthesis of the CdTe QDs, namely, cadmium chloride hemi(pentahydrate) ($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$, 99%), sodium tellurite (Na_2TeO_3 , 100 mesh, 99%), sodium borohydride (NaBH_4 , 99%), 3-mercaptopropionic acid (MPA, 99%) and sodium citrate tribasic dehydrate ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99%) were all purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and used without further treatment. Sodium hydroxide (NaOH , 98%) was purchased from Panreac (Barcelona, Spain).

To adjust pH a NaOH solution 1.0 mol L^{-1} was used. QDs were used as prepared only by appropriate dilutions of crude solutions without any purification process.

Copper, lead and mercury intermediate solutions of 10 mg L^{-1} were prepared by proper dilutions from their stock standard solutions (Merck®, Darmstadt, Germany) with concentration of 1000 mg L^{-1} .

2.2. Apparatus

The synthesis of quantum dots was performed in a CEM Discover SP® Microwave Synthesizer which was operated by a computer using Synergy™ software (Matthews, NC, US). The microwave was equipped with an integrated infrared (IR) sensor, an automated pressure control/sensing system (ActiVent™) and an active cooling system (PowerMAX™). QDs absorption and emission spectra were obtained by using a Jasco V-660 spectrophotometer and a Jasco FP-6500 spectrofluorometer (Easton, MD, USA), respectively. The quantum yield (QY) at room temperature was measured using a Quantaaurus-QY Absolute PL Quantum Yield Spectrometer C11347-11 (Hamamatsu, Japan) equipped with an integration sphere and a 150 W xenon light source. The pH measurements were made with a pH-meter GLP 22 (CRISON).

2.3. Synthesis of MPA capped CdTe QDs assisted by microwave irradiation

Three different diameters of MPA capped CdTe QDs were synthesized by resorting to the one-pot MW-assisted aqueous synthetic route as proposed by Ribeiro et al. [16]. Briefly, an equimolar quantity of CdCl_2 and MPA ($1.25 \times 10^{-3} \text{ mol}$) was mixed in 125 mL of deionized water. The resultant mixture were then added to a second beaker where $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol}$ of Na_2TeO_3 , $4 \times 10^{-3} \text{ mol}$ of NaBH_4 , and $1.25 \times 10^{-3} \text{ mol}$ of citrate were separately placed. The pH of the final solution was adjusted to 11 with a 1.0 mol L^{-1} NaOH solution. So, the molar ratio of Cd:Te:MPA was fixed at 1.0:0.2:1.0. By fixing the MW irradiation time at 10 min, the size of CdTe QDs was tuned by changing the temperature namely, 95, 105 and $125 \text{ }^\circ\text{C}$.

The QDs were used in the assays as prepared without any purification treatment because the high level dilutions (of the original colloidal solution) that was employed during the analyses were enough to guarantee the minimization of potential interferents.

2.4. Procedure for the fluorometric measurements

The combined CdTe QDs fluorometric probe for the detection of different metals ions consisted in a mixture of two different sized MPA-capped CdTe QDs. Thus, into a 2 mL Eppendorf tube, 1200 μL of a green emitting QDs (549 nm) and 800 μL of a red emitting QDs (634 nm) were mixed originating a fluorometric probe with two well-defined emission peaks.

Subsequently, into different Eppendorf tubes, 10 μL of the fluorometric probe and required amounts of metal ion, individually or in mixture, were sequentially added and the final volume (2 mL) was completed with deionized water. Immediately after mixing, the solution was transferred into a 1 cm quartz cell and the emission spectra (490–740 nm) were recorded with the excitation wavelength fixed at 400 nm. The slit widths of excitation and emission were 5.0 nm.

2.5. Experimental design

The concentration of the mixtures prepared with two and three metal ions (Table 1) was established according to an experimental design. For the mixtures containing two metal ions, six levels plus 3 additional center points were used, in a total of 39 experiments. The used concentration levels were: 0.01, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06 and 0.08 mg L^{-1} for Cu(II); 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.35 and 0.4 mg L^{-1} for Hg(II); 0.05, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 and 0.6 mg L^{-1} for Pb(II). Regarding the mixture containing three metal ions, four levels plus 3 additional center points were used, making a total of 67 experiments. Consequently, two

Table 1
Concentrations of the metal ions used in the mixtures.

	Concentrations (mg L ⁻¹)		
	Mixture of two metal ions	Mixture of three metal ions	Center points
Cu(II)	0.01; 0.03; 0.04; 0.05; 0.06; 0.08	0.01; 0.03; 0.05; 0.08	0.045
Hg(II)	0.1; 0.15; 0.2; 0.3; 0.35; 0.4	0.1; 0.2; 0.3; 0.4	0.25
Pb(II)	0.05; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6	0.05; 0.2; 0.4; 0.6	0.325

concentration levels of each metal ion were not prepared. The solutions containing 0.04, 0.06 mg L⁻¹ of Cu(II), 0.15, 0.35 mg L⁻¹ of Hg(II) and 0.3, 0.5 mg L⁻¹ of Pb(II) were not used. The center points used for Cu(II), Hg(II) and Pb(II) were 0.045, 0.25 and 0.325 mg L⁻¹.

2.6. Data analysis

The fluorescence data were analyzed through principal component analysis (PCA) [17] and partial least squares regression (PLS) [18]. The PCA was used for outlier's detection through the analysis of Hotelling's T2 and squared residuals statistics [17]. PLS-1 algorithm was used to obtain a multivariate calibration for each analyte Pb(II), Hg(II), Cu(II), individually [18]. All the PLS models were optimized in terms of the best number of latent variables, by using the leave-one-out procedure cross validation method, to prevent model over-fitting and to ensure robustness. The best number of latent variables was chosen through a commitment between the lowest root mean square error of cross-validation (RMSECV) and the lowest number of latent variables (LV). The root mean square error of calibration and cross-validation (RMSEC and RMSECV, respectively) were calculated according to the following equation:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - y_i)^2}{N}} \quad (1)$$

In Eq. (1), N is the number of samples, y_i is the experimental result for sample i and \hat{y}_i is the value obtained for the calibration set (RMSEC) and the cross-validation (RMSECV). The Pearson's correlation coefficient was also calculated to compare experimental values with the estimations for the prediction set.

To assess the models predictive capacity the RMSEC and the coefficient of determination of cross-validation (R_{CV}^2) were used.

All calculations were carried out using Matlab version R2009b (MathWorks, Natick, MA, USA) and the PLS Toolbox version 5.5.1 (Eigenvector Research, Inc., WA, USA).

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the as-prepared CdTe QDs capped with MPA

The characterization of the different sized MPA-capped CdTe QDs in terms of optical properties was performed by absorption and fluorescent spectroscopy (Fig. 1). The obtained results are presented in Table 2 and include the wavelengths of maximum absorbance corresponding to the first excitonic transition, wavelengths of maximum emission, Full Width at Half Maximum values of the emission peak (FWHM) and the corresponding sizes and molar concentrations.

The size of the nanoparticles (D) was determined taking into account the obtained wavelengths of maximum absorption (λ) using the equation proposed by Yu et al. [19]:

$$D = (9.8127 \cdot 10.7)\lambda^3 - (1.7147 \cdot 10.3)\lambda^2 + (1.0064)\lambda - 194.84.$$

Based on the value of D, the molar absorptivity (ϵ) was determined through the equation $\epsilon = 3450 \times \Delta E \times (D)^{2.4}$, where ΔE represents the transition energy corresponding to the first absorption peak expressed

in eV. The molar concentration (C) expressed in mol L⁻¹ is then calculated using the Lambert–Beer law [19].

The three different sized QDs exhibited wide absorption bands with well-defined absorption maxima for the first excitonic transition and narrow and symmetric emission bands, evidencing adequate nanoparticles monodispersity and homogeneity. However, it is important to mention that the FWHM increases with increasing MW synthesis temperatures and consequently the size uniformity decreases. The excessive temperatures can lead to a broad size distribution which impairs the QDs spectral properties.

Additionally, according to the results shown in Table 2, by raising the temperature from 95 to 125, the wavelength of maximum absorbance corresponding to the first excitonic transition, the wavelength of maximum emission and the corresponding nanoparticles sizes also increased. The obtained results are in agreement with those obtained by Ribeiro et al. [16] thus confirming that by fixing the time of synthesis, the temperature increment promotes an increasing growth rate. Additionally, the quantum yields (QY) of the nanoparticles synthesized at 95, 105 and 125 °C were 13.3%, 27.2% and 63.6%, respectively. This QY enhancement is attributed to the improvement of QDs crystallinity and surface passivation.

In this work two different sized MPA-capped CdTe QDs were conjugated in a nanohybrid 549/634 nm MPA-capped CdTe QDs system to be used as fluorometric probe for the detection and differentiation of distinct ions. The green and red emitting MPA-CdTe QDs were mixed in a proportion of 60:40, respectively, originating a combined CdTe QDs fluorometric probe with two well-defined emission peaks as shown in Fig. 2. The two wavelengths of maximum emission were 549 and 634 nm and the QY of the resultant fluorometric probe was about 60%.

3.2. Preliminary assays

The PL properties of MPA-CdTe QDs with different sizes (2.48, 3.03 and 3.81 nm) were assessed upon the interaction with three different metal ions, Cu (II), Pb (II) and Hg (II), at different concentration ranges. For each size of QDs, these concentration ranges were of 0–0.7, 0–2.0 and 0–1.5 mg L⁻¹ for Cu (II), Pb (II) and Hg (II), respectively. The QDs concentrations used in these assays were 1.5×10^{-2} , 3.5×10^{-3} , 1.8×10^{-3} $\mu\text{mol L}^{-1}$ for nanoparticle size of 2.48, 3.03 and 3.81 nm, respectively. Using these conditions, the fluorescence intensity of each QDs size in the absence of the metal ion was similar.

The obtained results demonstrated that for all the synthesized QDs sizes the fluorescence intensity decreased by adding increasing concentrations of each of the assessed metal ions. Along with the PL quenching both Pb (II) and Hg (II) ions caused a redshift of the wavelength of maximum emission in all QDs sizes, a phenomenon that not occurred in the case of the QDs interaction with Cu (II) ions.

According to the literature [10], the PL quenching of CdTe QDs upon the interaction with Pb(II), Hg(II) and Cu(II) is ascribed to effective electron transfer between donor and acceptor sites of the fluorophore/quencher system which induce the disruption of radiative electron-hole recombination. The observed red-shift caused by Pb(II) and Hg(II) was also reported in literature [20], and was attributed to the formation of new radiative centers.

Under an analytical perspective, the detection, quantification and discrimination of Hg(II), Pb(II) and Cu(II) ions in the same sample, based simply on their quenching effect on a single quantum dot PL is impracticable, due to the occurrence of interfering effects among each other. Nevertheless, each metal ion/QDs interaction has a specific magnitude that depends on many aspects, namely on the ion concentration and QDs size. Consequently, if any of the referred heavy metals is made to react with a mixture of MPA-CdTe QDs of different sizes, and emitting at complementary wavelengths, it would yield a distinctive emission spectrum profile that would combine all QDs responses. If the different emission spectra profiles are processed by multivariate

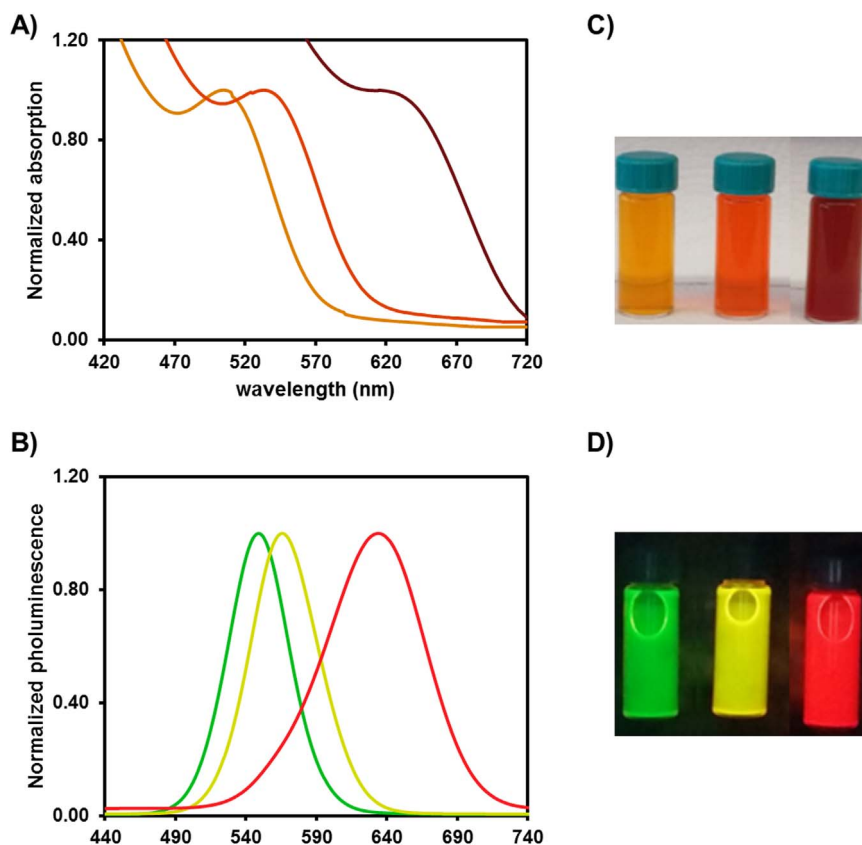


Fig. 1. Normalized absorption (A) photoluminescence (B) spectra of the different sized MPA-CdTe- QDs. Photograph of the QDs solutions under ambient light (C) and irradiated with UV light at 365 nm (D).

Table 2
CdTe-MPA QDs characterization.

Temperature	95 °C	105 °C	125 °C
λ Absorption (nm)	505	533	615
λ Emission (nm)	549	566	634
FWHM	48.56	55.39	80.82
D (nm)	2.48	3.03	3.81
C (mol L ⁻¹)	5.11×10^{-6}	1.38×10^{-6}	8.90×10^{-7}

chemometrics methods, they could provide both the discrimination of each individual metal ion and of the whole mixtures of ions.

Mixtures of two MPA-CdTe QDs, with different λ_{em} , namely 549/566, 549/634 and 566/634 nm were prepared and tested as fluorometric probes for Hg(II), Pb(II) and Cu(II) determination. Among the studied combinations the 549/634 nm arrangement demonstrated to be the most effective for the evaluated metal ions. In effect, along with the high sensitivity demonstrated for each of the ions, the emission spectrum of the 549/634 nm mixture presented two well-defined bands which allowed improved resolution in the discrimination of the occurring ions.

The stability of the PL intensity of the 549/634 nm MPA-CdTe QDs was evaluated every day by approximately forty days. The obtained results revealed that PL intensity remains constant for approximately 1 month demonstrating the high stability of the 549/634 nm system as fluorometric probe.

3.3. Interaction between the 549/634 nm MPA-CdTe QDs fluorometric probe and Hg(II), Pb(II) and Cu(II), individually

The PL response of the 549/634 nm probe was evaluated upon interaction with Cu (II), Pb (II) and Hg (II) at a concentration range of

0–0.7, 0–2.0 and 0–1.5 mg L⁻¹, respectively. The emission spectra of all solutions were recorded from 490 to 740 nm (λ_{ex} = 400 nm). The obtained results depicted in Fig. 3 showed that, although all metals caused a PL quenching, the reactivity of the probe towards Cu(II), Pb(II) and Hg(II) ions is very distinctive. In the case of Hg(II) (Fig. 3C)), a more pronounced PL inhibition was observed at the 549 nm band for concentrations up to 0.6 mg L⁻¹, which was also accompanied by a red-shift of 10 nm (from 549 to 559 nm). For higher concentrations it was also observed a PL quenching at the 634 nm band accompanied by a red-shift of 29 nm (from 634 to 663 nm). With this QDs combination the Hg(II) ions revealed a higher affinity for the smaller QDs relatively to the bigger ones.

Concerning the interaction with Pb(II) ions (Fig. 3B)), a higher affinity for the smaller QDs was also verified but this was much less pronounced than the one noticed with Hg(II). It was as well observed a red-shift of 5 nm of the 549 nm maximum, for Pb(II) concentration up to 0.800 mg L⁻¹. The 634 nm emission band exhibited a red shift of 32 nm (to 666 nm).

These results confirmed that the size of QDs can modulate the electron transfer efficiency, as described by Zhong et al. [20]. The highest affinity of the metal ions towards the smaller QDs was attributed to the fact that the quencher can reach the nanoparticle core whilst for the larger ones the interaction with the excitons is restrained at the surface.

Finally, concerning the interaction of the fluorometric probe with Cu(II) ions (Fig. 3A)), the PL inhibition observed for both 549 and 634 nm emission bands was similar indicating that the affinity of Cu(II) in relation to the two different sized QDs was analogous, in contrast to what was verified with Pb and Hg ions. In addition, no significant shift of the wavelength of maximum emission was observed in both 549 and 634 nm bands.

As the fluorometric probe consisted in a mixture of two different

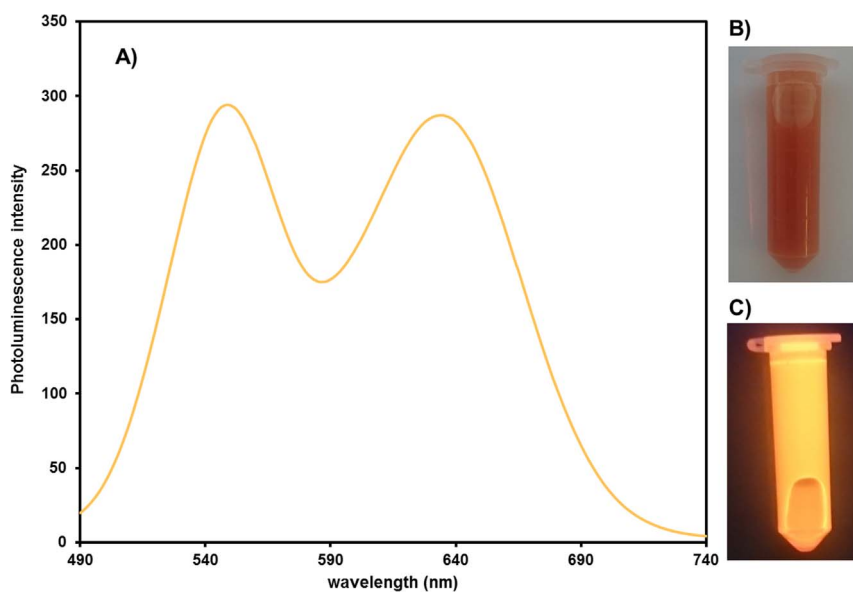


Fig. 2. Normalized photoluminescence (A) spectrum of the nanohybrid 549/634 nm MPA-capped CdTe QDs system. Photograph of the fluorometric probe solutions under ambient light (B) and irradiated with UV light at 365 nm (C).

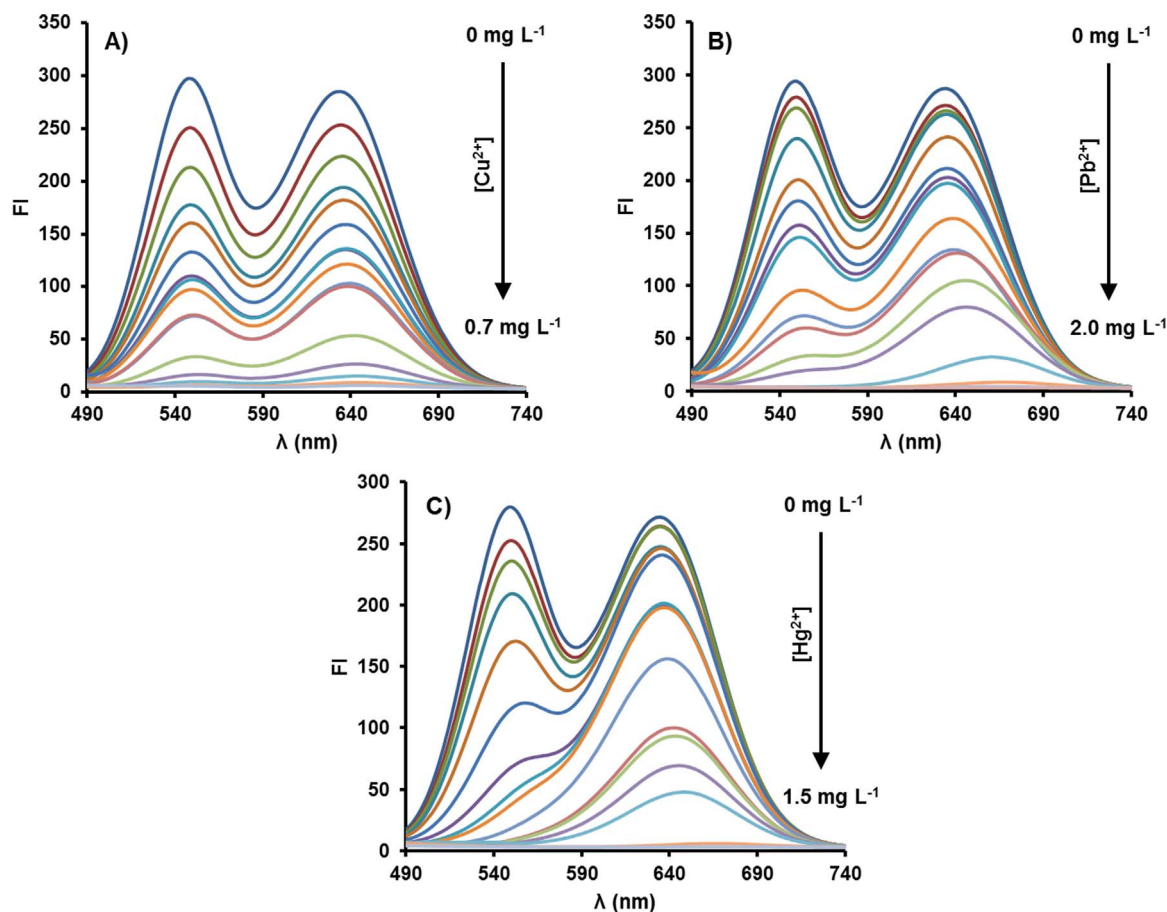


Fig. 3. Photoluminescence emission spectra of 549/634 nm MPA-CdTe QDs fluorometric probe in the presence of A) Cu(II), B) Pb(II) and C) Hg(II) at different concentrations.

sized QDs, the fluorometric response was based on the PL inhibition of both 549 and 634 nm emission bands. Therefore, the application of the Stern-Volmer equation to describe the PL quenching at both wavelengths was not adequate. For this reason, a chemometric approach consisting on a PLS-1 algorithm allowing the correlation between the obtained fluorometric response (X data) and the quencher concentration (Y data) using the whole emission spectra, was developed and

assessed for each of the individual metal ions. The obtained results confirmed that it was possible to establish a linear relationship between the quencher concentrations and the fluorometric response of the nanohybrid system, which are depicted in Table 3 and Fig. 4. For Cu(II) concentrations up to 0.15 mg L^{-1} , a linear response was obtained with a R_{CV}^2 and a RMSECV of 0.98 and 0.006 mg L^{-1} , respectively. In the case of Pb(II) and Hg(II) ions, a linear response was observed for

Table 3
PLS model results for each analyte.

	Cu (II)	Pb (II)	Hg (II)
Range (mg L ⁻¹)	0–0.15	0–1.25	0–1.0
LV	2	2	2
RMSECV (mg L ⁻¹)	0.006	0.05	0.05
R _{CV} ²	0.98	0.98	0.97

concentrations of up to 1.25 and 1.0 mg L⁻¹, respectively. The obtained R_{CV}² and a RMSECV values were 0.98 and 0.05 mg L⁻¹, for Pb(II) and 0.97 and 0.05 mg L⁻¹, for the Hg(II) ions.

The possibility of detecting and quantifying Cu(II), Pb(II) and Hg(II) ions in binary and/or ternary mixtures relies in the specific features of the fluorometric response of each analyte. Additionally, the obtained results allowed setting the concentration ranges of each of the analytes for the following assays involving the interaction of the nanohybrid probe with a mixture of two and three of the ions under study.

3.4. Interaction between the 549/634 nm MPA-CdTe QDs fluorometric probe and a mixture of two metal ions namely, Hg(II)-Pb(II), Hg(II)-Cu(II) and Pb(II)-Cu(II)

Since the previous results showed that different metals ions could produce distinct patterns on the PL quenching of the nanohybrid probe, the subsequent assays were aimed at investigating the possibility of discriminating distinct ions in a binary mixture by using the fluorometric response in combination with chemometrics methods. Thus, a mixture experimental design was used to obtain 39 samples for the calibration set at 6 concentration levels of each ion in a binary mixture. The concentration ranges used in the experimental design

Table 4
PLS model results for each analyte in the three mixtures containing two analytes.

	Hg (II)-Pb (II)	Hg (II)-Cu (II)	Pb (II)-Cu (II)
Range (mg L ⁻¹)	0.1–0.4 Hg(II) 0.05–0.6 Pb(II)	0.1–0.4 Hg(II) 0.01–0.08 Cu(II)	0.05–0.6 Pb(II) 0.01–0.08 Cu(II)
Pre-processing	log 10 mncn Hg(II) mncn for Pb(II)	mncn for Hg(II) mncn for Cu(II)	mncn for Pb(II) mncn for Cu(II)
LV	5 for Hg(II) 4 for Pb(II)	2 for Hg(II) 2 for Cu(II)	4 for Pb(II) 4 for Cu(II)
RMSECV (mg L ⁻¹)	0.08 for Pb(II) 0.06 for Hg(II)	0.04 for Hg(II) 0.01 for Cu(II)	0.06 for Pb(II) 0.01 for Cu(II)
R _{CV} ²	0.81 for Pb(II) 0.74 for Hg(II)	0.86 for Hg(II) 0.81 for Cu(II)	0.89 for Pb(II) 0.76 for Cu(II)

(Table 1) were as follows: 0.01–0.08, 0.1–0.4 and 0.05–0.6 mg L⁻¹ for Cu(II), Hg(II) and Pb(II), respectively. As abovementioned, a PLS model was developed for each metal ion in each binary mixture, therefore a total of six PLS models were obtained. The obtained results (Table 4) revealed that it is possible to determine the concentration of each analyte in a binary mixture, since a good R_{CV}² was obtained for each ion. Moreover, the results pointed out that Pb(II) is the analyte that better correlates with the fluorometric response, followed by Hg(II) and Cu(II), respectively.

With the objective of understanding which regions in the fluorometric data (Supplementary material S1) are more important for the developed PLS models, the square of the regression coefficient vectors were depicted (Fig. 5). All these figures revealed that most of the fluorometric data were used in the PLS models. From Fig. 5(A) it can be seen that the most important regions for modelling the Cu(II) and Hg(II) concentrations were around 630 and 545 nm, respectively. In other words, the obtained fluorometric response of the smallest QDs was more important for the Hg(II) PLS model while the largest

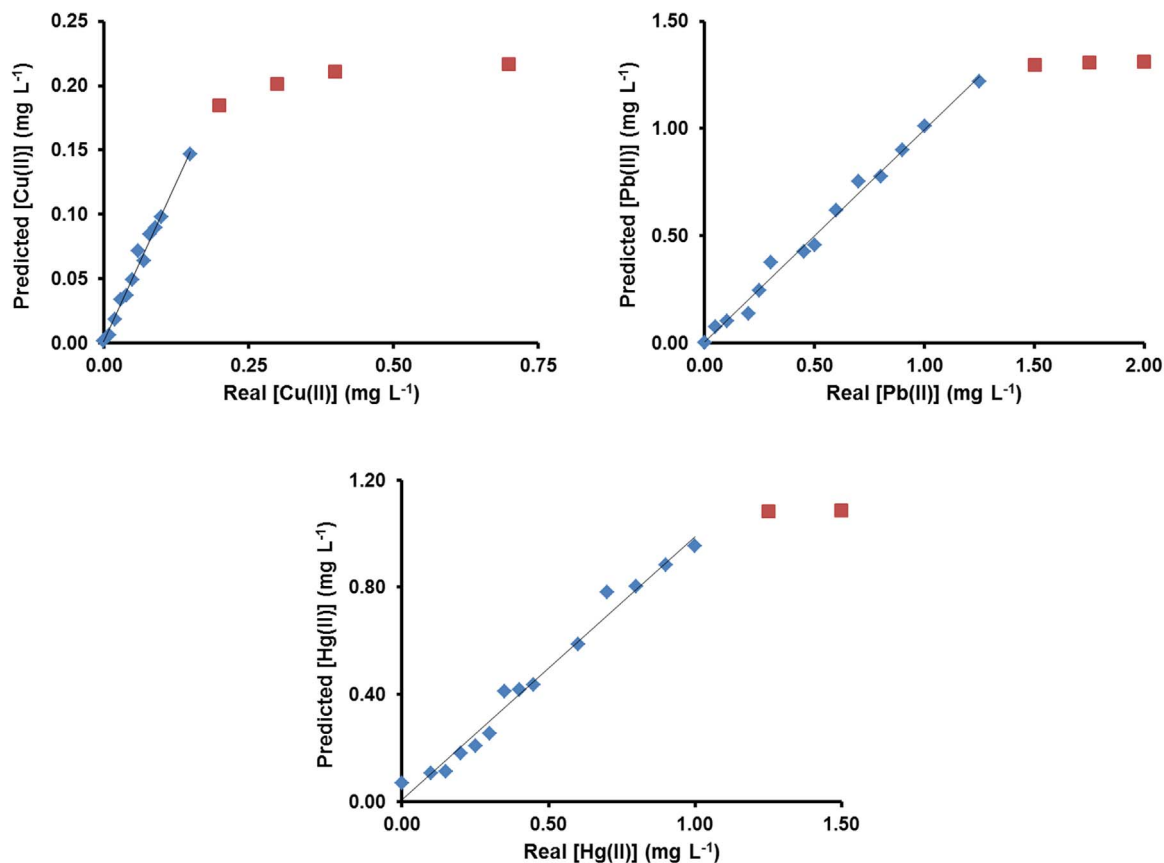


Fig. 4. Linear regression model by projecting the predicted and the real ion concentrations using the PLS 1 algorithm.

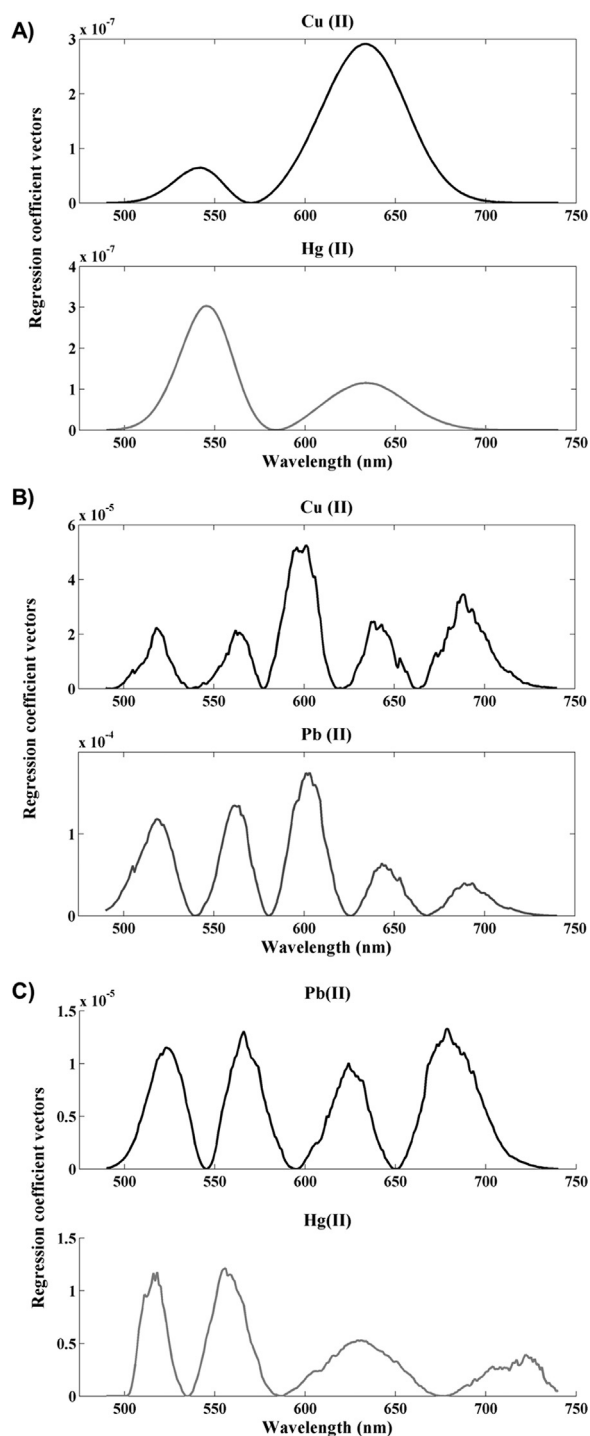


Fig. 5. Regression coefficient vectors of the PLS models built with (A) Cu(II)-Hg(II); (B) Cu(II)-Pb(II) and (C) Pb(II)-Hg(II) mixtures fluorometric responses.

quantum dot fluorometric response was more important for the Cu(II) PLS model. This may justify why the R_{CV}^2 is good for both models. These results are in accordance with those obtained upon the interaction of the nanohybrid system probe with Cu(II) and Hg(II), individually. As can be seen in Fig. 3(C), Hg(II) ions showed a higher reactivity for the smaller QDs since a more noticeable PL quenching effect was observed on the 549 nm emission band for lower Hg(II) concentrations levels. On the other hand, the reactivity of Cu(II) ion with both sized QDs were similar (Fig. 3(A)).

Regarding Fig. 5(B), the regions around 520, 565, 600, 640 and 690 nm were the most important for modelling both Cu(II) and Pb(II).

There are no specific regions for each of these metal ions. The regression coefficient vectors obtained for the Pb(II) and Hg(II) PLS models (Fig. 5(C)) revealed that the most important regions were located around 525, 565, 625, 680 and 515, 555, 630, 725 nm. Thus, the fluorometric data included in each PLS models were slightly different.

These assays allowed concluding that the combination of the multiple responses in a unique multi-QDs analytical signal can be useful to discriminate distinct analytes in a particular sample composition which affords enhanced selectivity in chemical analysis.

3.5. Interaction between the 549/634 nm MPA-CdTe QDs fluorometric probe and a mixture of three metal ions Hg(II)-Pb(II)-Cu(II)

Having proved the suitability of the developed approach for the discrimination of two distinct ions in a binary mixture, the following assays were intended to evaluate if three different ions could be discriminated and simultaneously determined in a ternary mixture. Therefore, a mixture experimental design involving a set of 67 calibration samples for 4 concentration levels of Hg(II), Pb(II) and Cu(II) was used to obtain the regression models. The concentration ranges were similar to those tested in the mixtures containing two analytes but using only four different values (Table 1). A total of three PLS models, one for each metal ion, were obtained. The obtained results are shown in Table 5. A very good correlation was obtained for Pb(II) with a R_{CV}^2 of 0.87 and a good correlation for Hg(II) (R_{CV}^2 0.73). In the case of Cu(II), the PLS model results revealed that this analyte can be detected in a mixture, however its quantification with accuracy is not feasible (R_{CV}^2 of 0.51). An interesting possibility to solve this problem and guarantee the accurate discrimination of all metals could contemplate the inclusion on the fluorometric probe of a third QDs, with a dissimilar size and emitting at an alternative and complementary wavelength. This way, and assuming that this third QDs would have its specific reactivity towards the three metal ions, it would be possible to gather additional information that would facilitate sample resolution.

The square of the regression coefficient vectors obtained for each PLS model in this mixture were plotted (Fig. 6) with the objective of obtaining a better perspective on which wavelengths have a higher contribution. The wavelengths with the higher contribution for each PLS model were: 500, 515 and 590 for Cu(II), 510, 540 and 610 for Hg(II) and 595, 620 and 660 for Pb(II). With the exception of the last wavelength region used for the Pb(II) PLS model, the other wavelengths regions with important contributions for each PLS model are very similar between them. This may justify why the obtained R_{CV}^2 values were lower for this three ions mixture than in the two ions mixtures. This multivariate approach showed some difficulties to separate the fluorometric response (Supplementary material S2) of each metal ion in the mixture, namely for Cu(II). However, the obtained results revealed that it is possible to build predictive models to estimate the concentrations of Pb(II) and Hg(II) with an acceptable accuracy in a ternary mixture.

The interaction of Pb(II) and Hg(II) with the nanohybrid system

Table 5
PLS model results for each analyte in the mixture containing three analytes.

	Hg (II)-Pb (II)-Cu (II)		
	Hg (II)	Pb (II)	Cu (II)
Range (mg L ⁻¹)	0.1–0.4	0.05–0.6	0.01–0.08
Pre-processing	Log 10 and mncn	Mean center	Log 10 and mncn
LV	4	6	4
RMSECV	0.06 mg L ⁻¹	0.08 mg L ⁻¹	0.02 mg L ⁻¹
R_{CV}^2	0.73	0.87	0.51

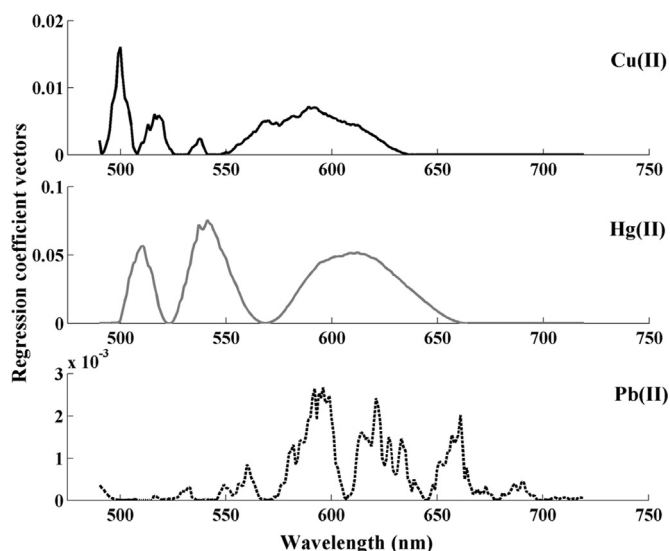


Fig. 6. Regression coefficient vectors of the PLS models built with the Hg(II)-Pb(II)-Cu(II) mixture fluorometric response.

revealed some specificity in the fluorometric response which was not observed in the interaction with Cu(II) ions. Namely, both Pb(II) and Hg(II) showed a higher reactivity with the smaller QDs wherein a more pronounced PL inhibition was observed in the 549 nm emission band. Moreover, a marked red shift of the 634 nm emission band was verified. This specificity in the fluorometric response can justify the achievement of better PLS models. For example, the regression coefficient vectors of Pb(II) revealed a higher contribution in the 660 nm region which may be connected with the observed red shift of the 634 nm emission band. This could justify the better PLS model results obtained for Pb(II), and consequently its quantification with a higher accuracy. Concerning Hg(II), some particularities can be highlighted as well. The regression coefficient vector of Hg(II) demonstrated a relevant contribution in the region around 540 nm which can be ascribed to the higher reactivity of these metal ion to the smaller QD in the nanohybrid system probe. This specific feature can explain the good PLS model results obtained for Hg(II). Regarding Cu(II), as there was no relevant feature observed in the respective emission spectra and the most important wavelength regions were very similar to those of the other two metal ions, this could justify why the PLS model results for Cu(II) were not so good.

4. Conclusion

This work demonstrated that the combination of the multiple responses of a fluorometric probe comprising two different sized MPA-CdTe QDs can be useful to pattern-based discrimination of different metal ions in a given mixture. Indeed, the application of multivariate calibration methods for the detection and quantification of distinct metal ions in a binary mixture based on the whole fluorescence response of a nanohybrid system was successfully achieved. In the case of the ternary mixtures, Pb(II) and Hg(II) can be detected and quantified with a good accuracy while Cu(II) ions can only be detected in the ternary mixture being its quantification unfeasible.

Although the results were extremely encouraging, they were not fully satisfactory in particular with regard to the accurate quantification of all three distinct metal ions in ternary mixtures. However, it could be reasonably anticipated that a combination of three QDs of different size and reactivity could provide the additional data required to fulfill this task.

It is important to refer that this study was not intended to replace any analytical methods already proposed to determine these analytes. However, the obtained results provide new insights on the potential

application of QDs as fluorometric probes and on the strategies that could be implemented to circumvent the problems of selectivity associated with their use in chemical analysis.

Further studies are needed to better understand the interaction of more metal ions and other quantum dot systems, if possible using more complex QDs mixtures.

Acknowledgments

Dayana B. Bittar is grateful to CAPES for the scholarship (PDSE no. 99999.000651/2015-00). David S.M. Ribeiro and Ricardo N.M.J. Pascoa thank FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia) and POPH (Programa Operacional Potencial Humano) for the Post-Doc grants ref. SFRH/BPD/104638/2014 and SFRH/BPD/81384/2011, respectively. S. Sofia M. Rodrigues thanks the financial support from Operação NORTE-01-0145-FEDER-000011 – Qualidade e Segurança Alimentar—uma abordagem (nano) tecnológica. José X. Soares thanks FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia) and POPH (Programa Operacional Potencial Humano) for his Ph.D. Grant Ref. SFRH/BD/98105/2013, and also the Biotech Health Programme (Doctoral Programme on Cellular and Molecular Biotechnology Applied to Health Sciences), Reference PD/00016/2012. This work received financial support from the European Union (FEDER funds POCI/01/0145/ FEDER/007265) and National Funds (FCT/MEC, Fundação para a Ciência e Tecnologia and Ministério da Educação e Ciência) under the Partnership Agreement PT2020UID/QUI/50006/2013.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.talanta.2017.06.071.

References

- [1] W.R. Algar, A.J. Tavares, U.J. Krull, Beyond labels: a review of the application of quantum dots as integrated components of assays, bioprobes, and biosensors utilizing optical transduction, *Anal. Chim. Acta* 673 (2010) 1–25.
- [2] C. Frigerio, D.S.M. Ribeiro, S.S.M. Rodrigues, V.L.R.G. Abreu, J.A.C. Barbosa, J.A.V. Prior, K.L. Marques, J.L.M. Santos, Application of quantum dots as analytical tools in automated chemical analysis: a review, *Anal. Chim. Acta* 735 (2012) 9–22.
- [3] N. Gaponik, D.V. Talapin, A.L. Rogach, K. Hoppe, E.V. Shevchenko, A. Kornowski, A. Eychmüller, H. Weller, Thiol-capping of CdTe nanocrystals: an alternative to organometallic synthetic routes, *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 7177–7185.
- [4] C. Frigerio, V.L.R.G. Abreu, J.L.M. Santos, Evaluation of acetylcysteine promoting effect on CdTe nanocrystals photoluminescence by using a multipumping flow system, *Talanta* 96 (2012) 55–61.
- [5] A.S. Lima, S.S.M. Rodrigues, M.G.A. Korn, D.S.M. Ribeiro, J.L.M. Santos, L.S.G. Teixeira, Determination of copper in biodiesel samples using CdTe-GSH quantum dots as photoluminescence probes, *Microchem. J.* 117 (2014) 144–148.
- [6] S.S.M. Rodrigues, A.S. Lima, L.S.G. Teixeira, M.G.A. Korn, J.L.M. Santos, Determination of iron in biodiesel based on fluorescence quenching of CdTe quantum dots, *Fuel* 117 (2014) 520–527.
- [7] S.S.M. Rodrigues, Z. Oleksiak, D.S.M. Ribeiro, E. Pobozy, M. Trojanowicz, J.A.V. Prior, J.L.M. Santos, Selective determination of sulphide based on photoluminescence quenching of MPA-capped CdTe nanocrystals by exploiting a gas-diffusion multi-pumping flow method, *Anal. Methods* 6 (2014) 7956–7966.
- [8] S.S.M. Rodrigues, D.S.M. Ribeiro, L. Molina-García, A. Ruiz Medina, J.A.V. Prior, J.L.M. Santos, Fluorescence enhancement of CdTe MPA-capped quantum dots by glutathione for hydrogen peroxide determination, *Talanta* 122 (2014) 157–165.
- [9] S.S.M. Rodrigues, D.R. Prieto, D.S.M. Ribeiro, E. Barrado, J.A.V. Prior, J.L.M. Santos, Competitive metal–ligand binding between CdTe quantum dots and EDTA for free Ca²⁺ determination, *Talanta* 134 (2015) 173–182.
- [10] S.S.M. Rodrigues, D.S.M. Ribeiro, J.X. Soares, M.L.C. Passos, M.L.M.F.S. Saraiva, J.L.M. Santos, Application of nanocrystalline CdTe quantum dots in chemical analysis: implementation of chemo-sensing schemes based on analyte-triggered photoluminescence modulation, *Coord. Chem. Rev.* 330 (2017) 127–143.
- [11] E.M. Nolan, S.J. Lippard, Tools and tactics for the optical detection of mercuric ion, *Chem. Rev.* 108 (2008) 3443–3480.
- [12] G.-X. Liang, H.-Y. Liu, J.-R. Zhang, J.-J. Zhu, Ultrasensitive Cu²⁺ sensing by near-infrared-emitting CdSeTe alloyed quantum dots, *Talanta* 80 (2010) 2172–2176.
- [13] X. Wang, X. Guo, Ultrasensitive Pb²⁺ detection based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) between quantum dots and gold nanoparticles, *Analyst* 134 (2009) 1348–1354.
- [14] I. Costas-Mora, V. Romero, I. Lavilla, C. Bendicho, An overview of recent advances

- in the application of quantum dots as luminescent probes to inorganic-trace analysis, *Trends Anal. Chem.* 57 (2014) 64–72.
- [15] P. Wu, T. Zhao, S. Wang, X. Hou, Semiconductor quantum dots-based metal ion probes, *Nanoscale* 6 (2014) 43–64.
- [16] D.S.M. Ribeiro, G.C.S. de Souza, A. Melo, J.X. Soares, S.S.M. Rodrigues, A.N. Araújo, M.C.B.S.M. Montenegro, J.L.M. Santos, Synthesis of distinctly thiol-capped CdTe quantum dots under microwave heating: multivariate optimization and characterization, *J. Mater. Sci.* 52 (2017) 3208–3224.
- [17] T. Naes, T. Isaksson, T. Fearn, T. Davies, Interpreting PCR and PLS solutions, in: A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification, NIR Publications, Chichester, UK, 2004.
- [18] P. Geladi, B.R. Kowalski, Partial least-squares regression: a tutorial, *Anal. Chim. Acta* 185 (1986) 1–17.
- [19] W.W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng, Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals, *Chem. Mater.* 15 (2003) 2854–2860.
- [20] W. Zhong, C. Zhang, Q. Gao, H. Li, Highly sensitive detection of lead(II) ion using multicolor CdTe quantum dots, *Microchim. Acta* 176 (2012) 101–107.

Multiplexed analysis combining distinctly-sized CdTe-MPA quantum dots and chemometrics for multiple mutually interfering analyte determination

Dayana B. Bittar^a, David S. M. Ribeiro^b, Ricardo N. M. J. Pascoa^b, Jose. F.X. Soares^b, S. Sofia. M. Rodrigues^b, Rafael C. Castro^b, Leonardo Pezza^a, Helena R. Pezza^a and João L.M. Santos^{b,*}

^a *Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, R. Prof. Francisco Degni 55, P.O. Box 355, 14800-900, Araraquara, SP, Brazil.*

^b *LAQV, REQUIMTE, Department of Chemical Sciences, Laboratory of Applied Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira nº 228, 4050-313 Porto, Portugal.*

Supplementary material

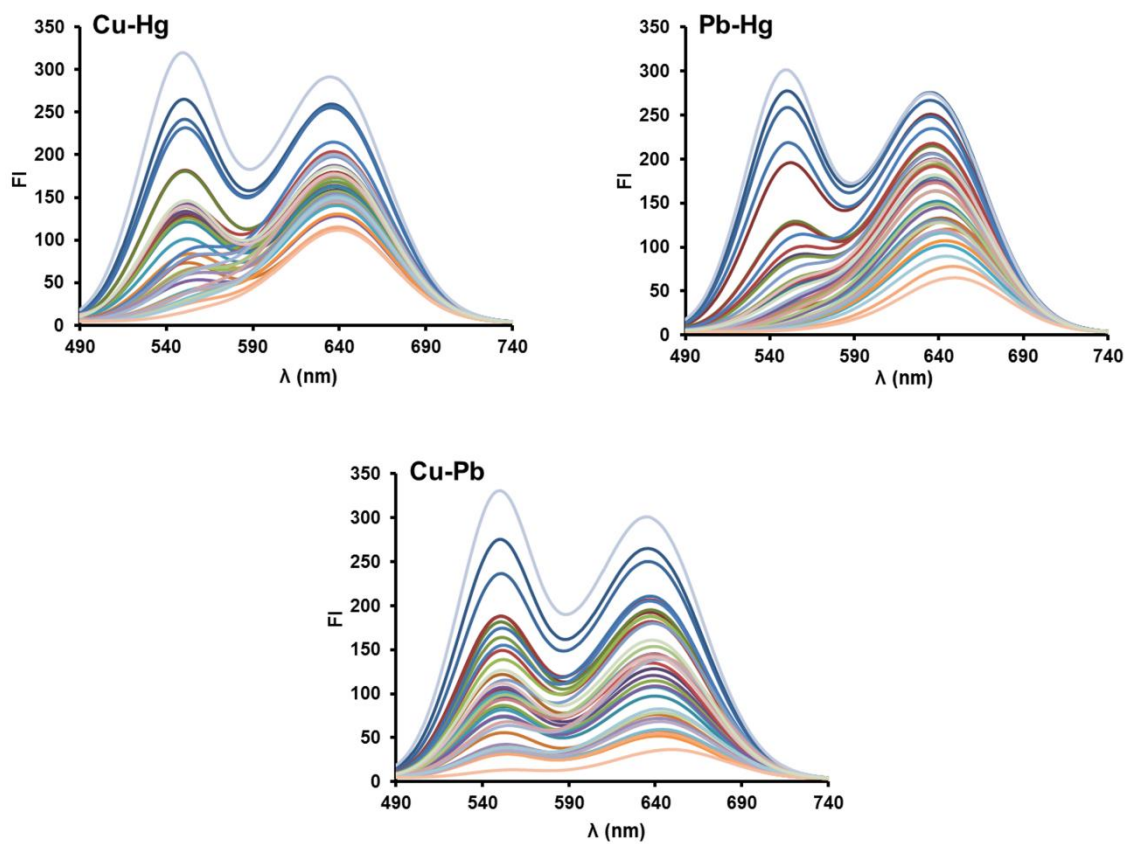


Fig. S1 – Photoluminescence emission spectra of 549/634 nm MPA-CdTe QDs fluorometric probe in the presence of a binary mixture of metal ions at different concentrations.

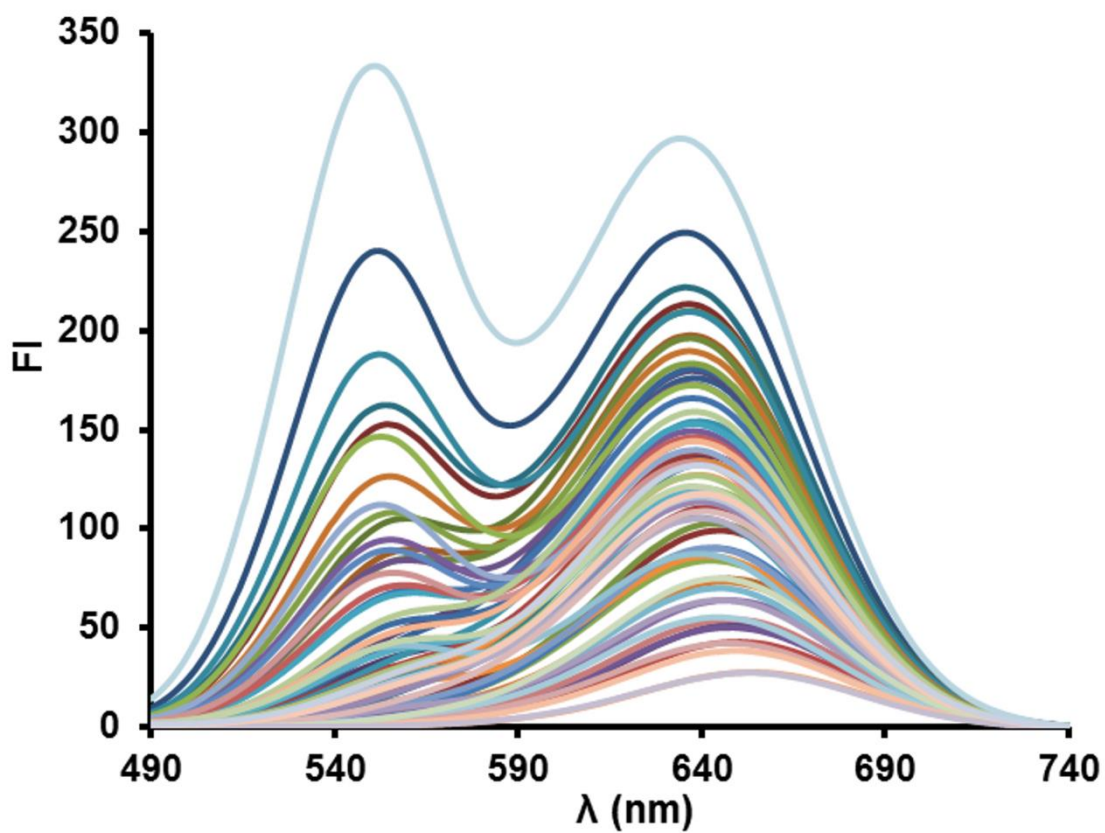


Fig. S2 – Photoluminescence emission spectra of 549/634 nm MPA-CdTe QDs fluorometric probe in the presence of a tertiary mixture of metal ions (Hg(II), Pb(II) and Cu(II)) at different concentrations.

Capítulo V

Detecção rápida e sensível de melamina por imagem digital no sistema RGB utilizando nanopartículas de ouro não modificadas

Introdução

Largamente estudada por vários autores, a melamina (1,3,5-triazina-2,4,6-triamina) foi adicionada, com o propósito de adulteração, em matrizes lácteas (leite líquido e leite em pó, principalmente), bem como em outros produtos, elevando falsamente o teor de proteínas.

Em quantidades elevadas, significativamente acima do limite máximo permitido (2,5 mg L⁻¹ nos Estados Unidos e União Europeia; 1,0 mg L⁻¹ para fórmulas infantis na China), a melamina foi adicionada em lotes de leite líquido e em pó, em 2008 na China, o que causou o aparecimento de cálculos renais em bebês e crianças que ingeriram esses produtos. Além dessa grave consequência, outros efeitos como insuficiência renal, sangue na urina, febre, pressão sanguínea elevada e até mesmo câncer, podem ser observados no organismo após a contaminação por melamina (Guan et al., 2009; Hau et al., 2009). Após esse episódio, a melamina tornou-se uma preocupação declarada quando o assunto era segurança alimentar.

Vários trabalhos foram desenvolvidos no sentido de detectar e quantificar rapidamente esse adulterante em leite. Atualmente, cromatografia gasosa (GC) ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplado com espectrometria de massas (MS) (Squadrone et al., 2010; Tyan et al., 2009), ELISA (Zhou et al., 2012), espectroscopia de infravermelho (Mauer et al., 2009), bem como outros métodos analíticos como espectrofotometria (Li et al., 2013), fluorescência (Rima et al., 2013; Cao et al., 2014) e método eletroquímico (Araújo et al., 2014; Xu et al., 2014) representam as principais técnicas de detecção de melamina.

No entanto, juntamente com essas técnicas existe o elevado custo de operação e manutenção dos sistemas cromatográficos acoplados à espectrometria de massas, além de longos procedimentos de preparação das amostras, limitando o uso e análises de rotina desses equipamentos.

Por outro lado, métodos colorimétricos, menos dispendiosos, que fazem uso de nanopartículas, principalmente as nanopartículas de ouro, também já foram propostos para a detecção de melamina em leite. Esses trabalhos baseiam seus resultados na mudança de cores dessas nanopartículas, em

contato com a melamina, devido à agregação que as nanopartículas sofrem (Kumar et al., 2014; Ai et al., 2009; Li et al., 2010; Chen et al., 2012, Chi et al., 2010) ou em contato com outros analitos, como proteínas e íons metálicos (Sha et al., 2011). Porém, mesmo essas metodologias colorimétricas, utilizam espectrofotômetros que ainda assim não são tão versáteis e práticos quando o assunto é análise *in loco* ou análise em curto espaço de tempo. É válido ressaltar que o suporte da nanotecnologia, com o auxílio de nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas na ausência de estabilizantes, também é um método, já reportado na literatura, que garante a detecção e quantificação de melamina em amostras de leite (Bittar et al., 2017) com limites de quantificação bem inferiores àqueles encontrados em trabalhos já reportados na literatura.

Nesse sentido, o presente trabalho vem propor o uso de imagem digital no sistema RGB para a captura do sinal analítico de ensaios que envolvam o contaminante melamina e nanopartículas de ouro não modificadas e, posteriormente, o tratamento adequado desses sinais para a obtenção de respostas desejadas, satisfatórias e fidedignas, quanto à quantificação ou não desse adulterante em leite.

O uso de imagens digitais em química analítica, bem como em outras áreas, tem se mostrado bastante promissor tanto no desenvolvimento de procedimentos analíticos quanto para a obtenção de resultados a serem utilizados para as mais variadas aplicações.

Uma imagem digital é a representação de uma imagem contínua (ou cena) por meio de um conjunto de elementos discretos e de tamanhos finitos, chamados de pixels, colocados em um arranjo bidimensional. A cada pixel é associado um valor (no caso de imagens de tons de cinza) ou um conjunto de três valores (**R** - red, **G** - green, **B** - blue) para se representar uma cor (Lima et al., 2014).

Ao se utilizar um dispositivo baseado no sistema RGB para aquisição das imagens, cada pixel resulta da combinação das cores vermelho (R), verde (G) e azul (B) em diferentes proporções e intensidades e o conceito fundamental de que todas as demais cores são baseadas nas várias combinações destas. Este modelo é chamado aditivo porque utiliza a luz transmitida para exibir as cores (Yam e Papadakis, 2004). Pode formar qualquer cor, variando do preto na

ausência de qualquer radiação ao branco quando se tem a contribuição máxima das intensidades de R, G e B (Lima et al., 2013).

Os diferentes tipos de câmeras digitais, webcams, celulares, scanners, dentre outros dispositivos, são capazes de converter o aspecto visual de uma matriz alimentar ou não em uma série de dados, ou seja, a imagem digital vermelha, verde e azul (RGB). Os métodos baseados em imagens digitais têm sido frequentemente utilizados como uma alternativa para determinações quantitativas em ciências analíticas (Lopez-Molinero et al., 2010; Maleki, Safavi, e Sedaghatpour, 2004), métodos esses capazes de extrair das imagens informações úteis e empregá-las para calibração, classificação, quantificação, rastreamento, etc (Foca et al., 2011).

Modelos matemáticos para imagens digitais e dados RGB também são utilizados para construir curvas analíticas em determinações quantitativas (Gaião et al., 2006).

Assim, levando em consideração a praticidade, a versatilidade e o baixo custo dessa metodologia, o presente trabalho fez uso de imagens digitais obtidas durante os ensaios entre soluções com diferentes concentrações de melamina e nanopartículas de ouro, as quais foram tratadas com o software GIMP 2.8, software esse de domínio público, disponibilizado gratuitamente para download na internet para o tratamento de imagens e uma ferramenta de fácil manipulação para o mais diversificado público.

Experimental

Equipamentos e materiais

Um smartphone, sistema operacional android, modelo SM-G530BT equipado com câmera de 8 megapixels que permite tirar fotos com uma resolução de 3264 x 2448 pixels foi utilizado para a obtenção das imagens, posteriormente tratadas com software GIMP 2.8. As medidas de absorbância foram obtidas através de um espectrofotômetro (Modelo HP 8453, Hewlett Packard), equipado com uma cubeta de quartzo ($b = 1$ cm). Uma balança analítica (AG 204, Mettler Toledo) foi utilizada para pesagem e para a

centrifugação das amostras testadas utilizou-se uma centrífuga refrigerada (Universal 320 R, Hettich). Utilizou-se um banho de ultrassom (Modelo T14, Thornton) para auxiliar na solubilização das soluções de melamina. Micropipetas Eppendorf (100-1000 μL) foram utilizadas para a obtenção dos volumes utilizados durante todos os experimentos. Uma placa de toque foi utilizada na adição das soluções de reagentes e processamento da reação.

Reagentes e soluções

Todos os reagentes foram de grau analítico. As soluções foram preparadas com água ultrapura (18 M Ω cm, sistema Milli-Q, Millipore). Preparou-se uma solução estoque de melamina (Sigma Aldrich, 99%), a uma concentração de 1000 mg L⁻¹, por solubilização de 100 mg de melamina em água deionizada em balão volumétrico até o volume final de 100 mL, em banho de ultrassom durante 10 minutos. Preparou-se uma concentração intermediária de 100 mg L⁻¹ de melamina por diluição adequada e, finalmente, soluções padrão de trabalho foram preparadas em concentrações na faixa de 0,20 - 0,55 mg L⁻¹.

Foram preparadas soluções de trabalho de citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇.2H₂O) na concentração de 0,1 mol L⁻¹ e cloreto de ouro (AuCl₃.3H₂O) na concentração de 1,00 x 10⁻³ mol L⁻¹, onde a solução de AuCl₃.3H₂O foi preparada por adequada diluição da correspondente solução estoque de concentração 1,00 x 10⁻² mol L⁻¹.

Utilizou-se solução de ácido tricloroacético (3,0 x 10⁻² g L⁻¹) para precipitar as proteínas presentes nas amostras de leite.

Preparo das nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato de sódio

Todos recipientes/frascos de vidro utilizados para a preparação das nanopartículas de ouro foram mergulhados em água régia (HNO₃/HCl, 1:3) e lavados cuidadosamente com água deionizada para assegurar a remoção de qualquer contaminante ou influenciar na síntese das nanopartículas de ouro.

As nanopartículas de ouro sintetizadas foram reduzidas e estabilizadas com citrato de sódio di-hidratado seguindo o método proposto por Turkevich et al. (1951), com algumas modificações. A solução de citrato de sódio dihidratado

($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 0,5 mL) foi rapidamente adicionada na solução de $\text{AuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, 50,0 mL) a qual se apresentava em ebulição e sob agitação vigorosa e constante. A solução mudou de coloração amarelo pálido para púrpura e finalmente para vinho-avermelhado. Depois de ferver continuamente durante 15 minutos adicionais, a fonte de calor e a agitação foram removidas e a solução foi resfriada até à temperatura ambiente. O comprimento de onda de máxima absorção da solução de nanopartícula de ouro preparada foi de 527 nm. A solução coloidal de nanopartículas sintetizada foi armazenada à temperatura de $4,0 \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Estudo de estabilidade das nanopartículas de ouro

Para estudar o efeito do armazenamento da solução coloidal de nanopartículas de ouro preparadas neste trabalho, as nanopartículas foram armazenadas em geladeira na ausência de luz a $4,0 \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$, em frascos de polipropileno cobertos com folha de alumínio. As medidas de absorbância ($\lambda = 527 \text{ nm}$) das soluções de nanopartículas de ouro foram realizadas, diariamente, durante 30 dias.

Preparo das amostras de leite

Foram utilizadas quatro amostras de leite (1-4) para avaliar o desempenho do método proposto. As amostras foram compradas de um mercado local, na cidade de Araraquara (São Paulo, Brasil).

Sendo o leite uma matriz bastante complexa, as amostras foram pré-tratadas utilizando o método descrito por Ni et al. (2014), com algumas modificações. Inicialmente, 5 mL de leite foram colocados em um tubo de centrífuga, seguido da adição de 1,5 mL de solução de ácido tricloroacético ($3,0 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$). Após 1 minuto de agitação manual, o tubo contendo a mistura foi ultrassonicado durante 10 min e depois centrifugado a $9,0 \times 10^3$ rotações por minuto durante 10 minutos. O sobrenadante foi aquecido até ao seu ponto de ebulição para precipitar as proteínas do soro (Fox e Mcsweeney 1998; Vasbinder et al., 2003). Por fim, o sobrenadante foi recolhido e filtrado em papel de filtro, e o pH foi ajustado para 7,0 com a adição da solução de NaOH 10 mol L^{-1} . A

solução resultante foi filtrada através de um filtro (MILLEX, PVDF) de 0,22 μm e diluída 25 vezes antes da análise.

Procedimento e curva analítica

Após a síntese da nanopartícula de trabalho, a curva analítica foi construída adicionando-se uma alíquota de 200 μL de nanopartículas a 200 μL das soluções padrão de melamina, em uma placa de toque, em diferentes concentrações, originando concentrações finais de 0,100; 0,125; 0,150; 0,175; 0,200; 0,250; 0,275 mg L^{-1} de melamina, respectivamente.

Para a aquisição dos valores de RGB, importou-se várias imagens e uma região apropriada foi delimitada (50 x 50 pixels). As coordenadas que delimitam a área de seleção de cada imagem foi automaticamente alocada e usadas em todas as outras imagens analisadas.

As intensidades efetivas (I_E) foram obtidas após o tratamento das imagens das soluções que construíram a curva de calibração, assumindo uma relação linear entre a resposta analítica e a concentração do analito. As fotografias foram analisadas utilizando o software GIMP 2.8 e os valores das intensidades relativas foram obtidos para cada canal RGB.

Adição de padrão e recuperação

A adição de solução padrão de melamina, em sextuplicata e em diferentes concentrações, foram utilizadas para avaliar possíveis interferências de matriz. Foram utilizadas quatro amostras líquidas de leite, fortificadas com solução-estoque de melamina com concentrações finais de 0,13, 0,19 e 0,25 mg L^{-1} . As amostras fortificadas foram pré-tratadas como descrito na seção de preparo das amostras, e as fotografias foram analisadas por tratamento da imagem digital no sistema RGB com auxílio do software GIMP 2.8.

Resultados e discussão

Foram realizados ensaios entre as nanopartículas de ouro e melamina em soluções padrão e em amostras de leite. No método proposto, as nanopartículas

de ouro foram sintetizadas na ausência de outros agentes estabilizantes (excetuando-se o citrato), o que resultou em um aumento significativo da sensibilidade e detectabilidade devido à não existência de barreiras (*capping*), ao redor das nanopartículas, proporcionando uma intensa atração entre as nanopartículas de ouro e a melamina. Vale ressaltar que o citrato de sódio dihidratado utilizado na síntese das nanopartículas de ouro age como agente redutor estabilizante.

Estudo da estabilidade das nanopartículas de ouro

As nanopartículas de prata podem ser estabilizadas em solução aquosa revestindo-as com íons citrato carregados negativamente (Pinto et al., 2010). Da mesma forma, as nanopartículas de ouro também podem ser estabilizadas em solução aquosa pelos íons citrato, que fornecem uma carga de superfície envolvendo a nanopartícula e garantindo a ela estabilidade suficiente para a realização de experimentos posteriores.

Os resultados apresentados na Figura 1 comparam as alterações na absorvância, em função do tempo (dias), para as nanopartículas de ouro sintetizadas. Essas nanopartículas apresentaram boa estabilidade e sinal de absorvância estável no período considerável de 20 dias, indicando sua adequação para uso no desenvolvimento do método colorimétrico proposto para a quantificação da melamina por imagem digital.

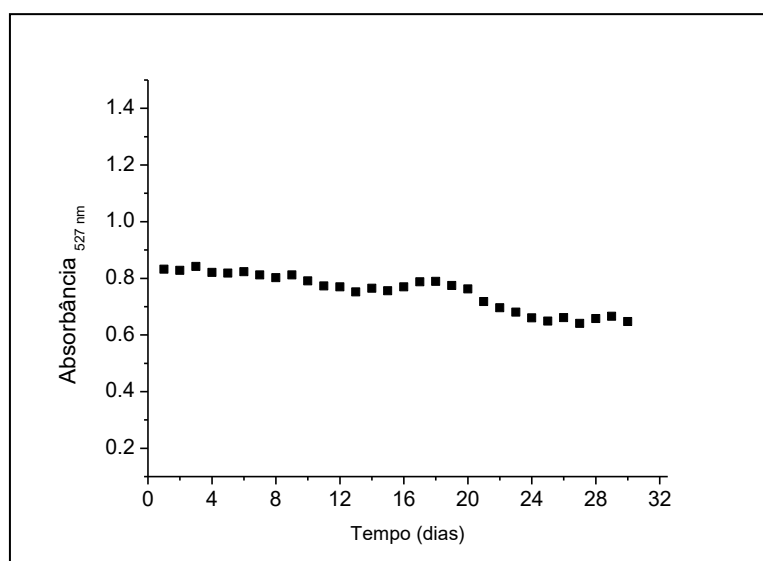


Figura 1: Alterações da absorbância em função do tempo de armazenamento para as nanopartículas de ouro sintetizadas, $\lambda = 527$ nm; $b = 1$ cm.

Espectro de absorção UV-Vis e imagens de microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de ouro

É bem conhecido que as nanopartículas de ouro exibem uma cor vinho-avermelhada em solução aquosa devido à excitação de uma banda de ressonância de *plasmon* de superfície na região do UV-Vis (Hussain et al., 2011). O espectro de absorção das nanopartículas de ouro estáveis apresentou um pico de máxima absorbância típico em 527 nm (Figura 2), indicando partículas monodispersas.

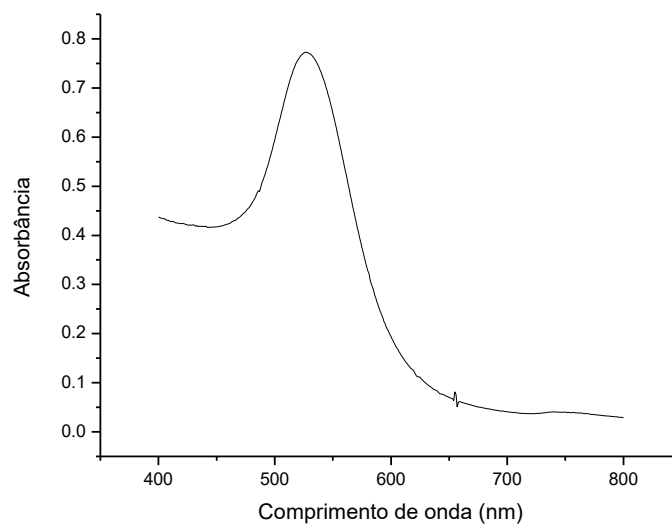


Figura 2: Espectro de absorção da solução coloidal das nanopartículas de ouro na ausência de melamina obtido a 527 nm.

Após a adição de melamina à solução, a solução coloidal de nanopartículas de ouro foram adicionadas rapidamente e a alteração na cor da solução foi observada. A solução coloidal de nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato de sódio são de cor vinho-avermelhada na ausência de melamina, enquanto que na presença de melamina elas mudam para azul, pois a presença de melamina provoca a agregação de nanopartículas (Kumar et al., 2014).

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de ouro na ausência (Figura 3a) e na presença de melamina (Figura 3b) a uma concentração de $0,50 \text{ mg L}^{-1}$, mostraram clara evidência de agregação das nanopartículas. Após a aquisição das imagens de microscopia eletrônica de transmissão, o tamanho médio das nanopartículas de ouro foi determinado usando o software Image J. Foram utilizadas sessenta nanopartículas para o cálculo do tamanho médio, o qual foi equivalente a $23,0 \pm 2,2 \text{ nm}$.

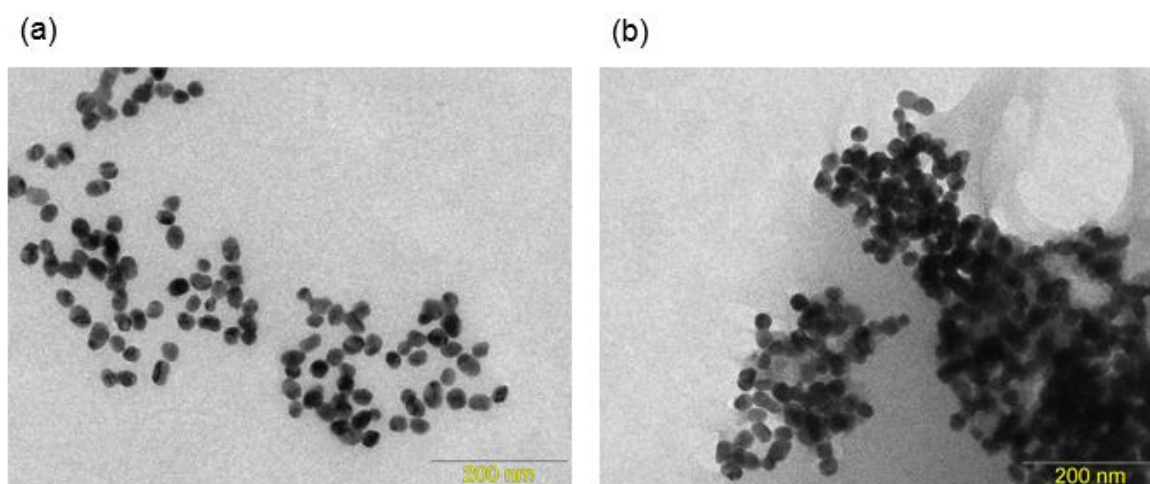


Figura 3: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de ouro na ausência (a) e na presença (b) de melamina a $0,50 \text{ mg L}^{-1}$.

Figuras de mérito

As figuras de mérito do método analítico incluíram os parâmetros limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão, exatidão e faixa linear.

A fim de se obter esses parâmetros, a imagem digital obtida para a construção da curva analítica foi tratada pelo software GIMP 2.8 e valores de intensidade efetiva nos três canais – red, green e blue – foram adquiridos com o propósito de visualizar qual canal proporcionaria os melhores resultados.

Assim, foi possível verificar que de acordo com a Figura 4, o canal azul demonstrou melhor linearidade e, conseqüentemente, foi o canal utilizado na obtenção de valores de intensidade efetiva das análises posteriores.

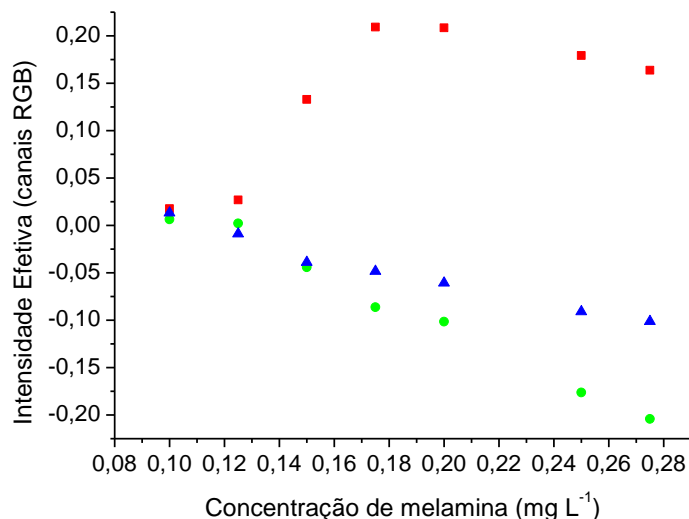


Figura 4: Valores de Intensidade efetiva obtidos pelos canais R (■), G (●), B (▲) para as concentrações de melamina 0,100; 0,125; 0,150; 0,175; 0,200; 0,250; 0,275 mg L⁻¹, respectivamente.

Nas condições experimentais otimizadas, obteve-se uma resposta linear para concentrações de melamina entre 0,100 e 0,275 mg L⁻¹. A equação linear obtida foi: Intensidade Efetiva = - 0,0428 - 0,505 x C_{melamina} (R = 0,998). Os experimentos de repetibilidade utilizando medições intra dia de soluções padrão de concentração 0,125, 0,175 e 0,200 mg L⁻¹ resultaram em desvios-padrão relativos (% RSD) iguais a 0,45, 1,00 e 3,58, enquanto para experimentos inter dia os desvios-padrão relativos (% RSD) referentes às mesmas concentrações utilizadas nos experimentos intra dia foram de 2,55; 0 e 3,86, respectivamente. Os limites de detecção e quantificação foram determinados de acordo com as recomendações da IUPAC (Long e Winefordner 1983), utilizando as expressões $3 \times (s / b)$ e $10 \times (s / b)$, respectivamente, onde s é o desvio padrão dos pontos da curva e b é a inclinação da faixa linear.

Os limites de detecção e quantificação calculados foram de 0,013 e 0,043 mg L⁻¹, respectivamente. A Figura 5 mostra a curva analítica e as diferentes cores das nanopartículas de ouro na presença de melamina em diferentes concentrações. Todas as medições foram realizadas utilizando o canal azul.

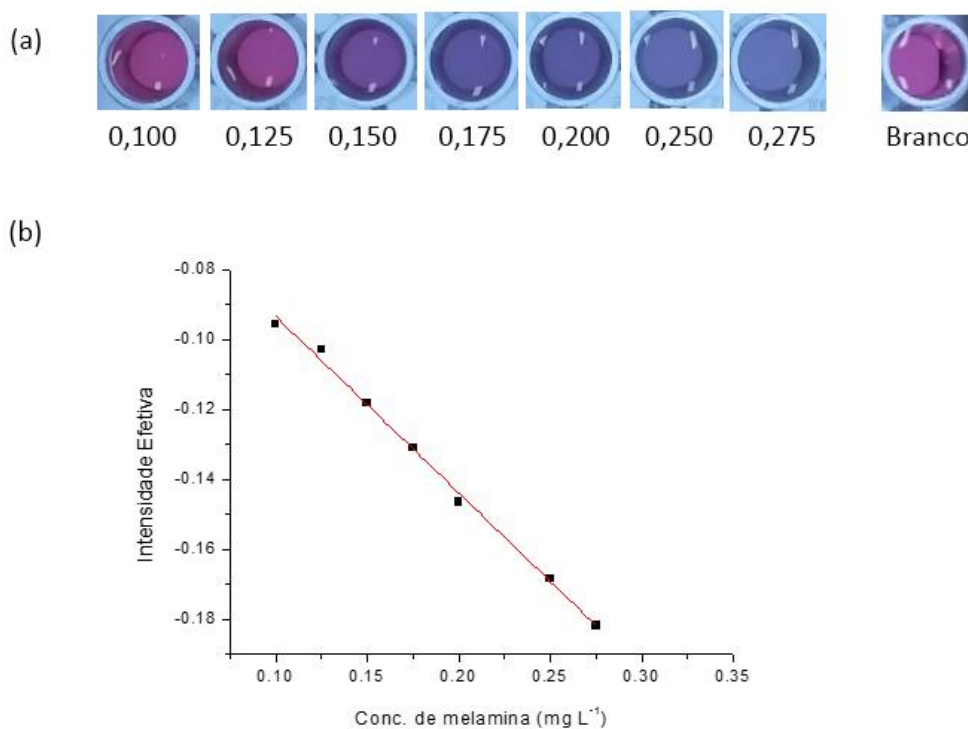


Figura 5: (a) Diferentes cores obtidas pelas nanopartículas de ouro na presença de diferentes concentrações de melamina e (b) curva de calibração de melamina obtida a partir das concentrações 0,100; 0,125; 0,150; 0,175; 0,200; 0,225 e 0,275 mg L⁻¹.

Aplicação em amostras de leite: análise e recuperação

A eficácia do método proposto foi avaliada pela análise de melamina em amostras de leite. Os ensaios de recuperação foram realizados para determinar a exatidão do método e detectar possíveis interferências da matriz. Amostras com melamina (Tabela 1) apresentaram recuperações na faixa de 73,7 – 101,8 %, indicando boa exatidão e ausência de efeito significativo de matriz no método desenvolvido, considerando-se a complexidade da matriz.

Tabela 1. Teste de recuperação de melamina adicionada às amostras de leite.

Amostra	Valor adicionado (mg L ⁻¹)	Valor encontrado (mg L ⁻¹)	Recuperação (%) ^a
1	0,13	0,10 ± 0,01	79,16 ± 6,90
	0,19	0,15 ± 0,01	78,03 ± 6,55
	0,25	0,26 ± 0,01	101,84 ± 5,07
2	0,13	0,12 ± 0,01	91,77 ± 9,53
	0,19	0,17 ± 0,02	90,61 ± 8,54
	0,25	0,26 ± 0,02	101,80 ± 7,58
3	0,13	0,10 ± 0,01	76,93 ± 5,22
	0,19	0,14 ± 0,02	73,73 ± 8,33
	0,25	0,19 ± 0,01	76,03 ± 4,92
4	0,13	0,11 ± 0,01	87,02 ± 7,13
	0,19	0,16 ± 0,02	83,01 ± 8,35
	0,25	0,25 ± 0,03	97,87 ± 9,63

^a Média ± desvio padrão (n = 6).

Comparado com os métodos previamente relatados para a determinação de melamina usando nanopartículas de ouro, o método proposto apresenta limite de detecção menor, como apresentado na Tabela 2. O aumento da sensibilidade na ausência de agentes estabilizantes (nanopartículas de ouro não modificadas), sugere maior interação entre as nanopartículas de ouro e os grupos amino da melamina, em comparação com outros métodos. A utilização de agentes estabilizantes possivelmente proporciona barreiras que se estendem ao redor das nanopartículas. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que este tipo de revestimento protetor pode impedir que as nanopartículas reajam com a melamina, dificultando sua detecção.

Vantagens adicionais do novo método são que a preparação da amostra envolve uma diluição direta, e que a quantificação subsequente do analito poderia ser realizada com equipamento portátil, permitindo a análise *in situ*.

Tabela 2: Comparação do desempenho analítico da técnica proposta e alguns métodos previamente relatados na literatura para a determinação de melamina utilizando nanopartículas de ouro.

Método	Faixa Linear (mg L⁻¹)	Limite de detecção (mg L⁻¹)	Referência
SERS / nanosubstrato de ouro	2,5 - 100,0	1,100	Cheng e Dong (2011)
Colorimétrico / Nanopartículas de ouro modificadas com cisteína	1 – 200	0,600	Liang et al. (2011)
Colorimétrico / Nanopartículas de ouro	-	0,400	Li et al. (2010)
SERS / nanopartículas de ouro	0,31 - 5,0	0,170	Giovanazzi et al. (2014)
Método colorimétrico / AuNPs	0 – 328	0,150	Guoa et al. (2010)
Método colorimétrico / AuNP- citrato	0 - 2,0	0,050	Kumar et al. (2014)
Colorimétrico / AuNPs - Imagens digitais	0,100 – 0,275	0,013	Presente trabalho

Conclusões

Um método colorimétrico simples, rápido e sensível para a detecção de melamina no leite foi desenvolvido utilizando sua adsorção nas superfícies de nanopartículas de ouro por meio dos grupos amino. Uma síntese simples de nanopartículas de ouro coloidal foi feita e as nanopartículas de ouro mostraram-se estáveis durante por pelo menos 20 dias de armazenamento em geladeira a uma temperatura de $4,0 \pm 2,0$ °C. A síntese de nanopartículas de ouro não modificadas, provavelmente resultou em maior interação entre as nanopartículas e os grupos amino da melamina, aumentando, assim, a sensibilidade do método proposto. A eficácia da técnica do uso de imagens digitais para a detecção de melamina em amostras comerciais de leite também foi demonstrada, tratando-

se de um método simples e rápido, que não requer equipamentos sofisticados para a obtenção dos resultados. Portanto, oferece uma alternativa vantajosa aos métodos já existentes na literatura.

Referências

AI, K. L., LIU, Y. L., LU, L. H. Hydrogen-Bonding Recognition-Induced Color Change of Gold Nanoparticles for Visual Detection of Melamine in Raw Milk and Infant Formula **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, p. 9496-9497, 2009.

ARAUJO, W. R. DE, PAIXAO, T. R. L. C. Use of copper electrode for melamine quantification in milk. **Electrochimica Acta**, v. 117, p. 379–384, 2014.

BITTAR, D. B.; CATELANI, T. A.; NIGOGHOSSIAN, K.; BARUD, H. D. S.; RIBEIRO, S. J. L.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Optimized synthesis of silver nanoparticles by factorial design with application for the determination of melamine in milk. **Analytical Letters**, v. 50, p. 829-841, 2017.

CAO, X. Y., SHEN, F., ZHANG, M. W., GUO, J. J., LUO, Y. L., XU, J. Y., LI, Y., SUN, C. Y. Highly sensitive detection of melamine based on fluorescence resonance energy transfer between rhodamine B and gold nanoparticles. **Dyes and Pigments**, v. 111 p. 99-107, 2014.

CHEN, W., DENG, H. H., HONG, L., WU, Z. Q., WANG, S., LIU, A. L., LIN, X. H., XIA, X. H. Bare gold nanoparticles as facile and sensitive colorimetric probe for melamine detection. **Analyst**, v. 137, p. 5382-5386, 2012.

CHENG, Y., DONG, Y. Screening melamine contaminant in eggs with portable surface-enhanced Raman Spectroscopy based on gold nanosubstrate. **Food Control**, v. 22, p. 685-689, 2011.

CHI, H., LIU, B., GUAN, G., ZHANG, Z., HAN, M. M. A simple, reliable and sensitive colorimetric visualization of melamine in milk by unmodified gold nanoparticles. **Analyst**, v. 135, p. 1070-1075, 2010.

FOCA, G., MASINO, F., ANTONELLI, A., ULRICI, A. Prediction of compositional and sensory characteristics using RGB digital images and multivariate calibration techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 706, p. 238-245, 2011.

GAIÃO, E. N., MARTINS, V. L., LYRA, W. S., ALMEIDA, L. F., SILVA, E. C., ARAÚJO, M. C. U. Digital image-based titrations. **Analytica Chimica Acta**, v. 570, p. 283-290, 2006.

GIOVANNOZZI, A. M., ROLLE, F., SEGA, M., ABETE, M. C., MARCHIS, D., ROSSI, A. M. Rapid and sensitive detection of melamine in milk with gold nanoparticles by Surface Enhanced Raman Scattering. **Food Chemistry**, v. 159, p. 250–256, 2014.

GUAN, N., FAN, Q., DING, J., LU, J., AI, Y., XU, G., ZHU, S., YAO, C., JIANG, L., MIAO, J., ZHANG, H., ZHAO, D., LIU, X., YAO, Y. Melamine-Contaminated Powdered Formula and Urolithiasis in Young Children. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 11, p. 1067-1074, 2009.

GUOA, L., ZHONGA, J., WUA, J., FUA, F., CHENA, G., ZHENGX, X., LIN, S. Visual detection of melamine in milk products by label-free gold nanoparticles. **Talanta**, v. 82, p. 1654–1658, 2010.

HAU, A. K., KWAN, T. H., LI, P.K. Melamine Toxicity and the Kidney. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, p. 245-250, 2009.

KUMAR, N., SETH, R., KUMAR, H., Colorimetric detection of melamine in milk by citrate-stabilized gold nanoparticles. **Analytical Biochemistry**, v. 456, p. 43-49, 2014.

LI, C., LI, Y., LIANG, B., LI, N., LI, Z. A simple and sensitive method for the determination of melamine in milk by first derivative UV spectrophotometry coupled with the H-point standard addition method. **Analytical Methods**, v. 5, p. 5760-5766, 2013.

LI, L., LI, B. X., CHENG, D., MAO, L. H. Visual detection of melamine in raw milk using gold nanoparticles as colorimetric probe. **Food Chemistry**, v. 122, p. 895–900, 2010.

LIANG, X., WEI, H., CUI, Z., DENG, J., ZHANG, Z., YOU, X., ZHANG, X. Colorimetric detection of melamine in complex matrices based on cysteamine-modified gold nanoparticles. **Analyst**, v. 136, p. 179-183, 2011.

LIMA, M. B., ANDRADE, S. I. E., BARRETO, I. S., ALMEIDA, L. F., ARAÚJO, M. C. U., A digital image-based micro-flow-batch analyzer. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 238-243, 2013.

LIMA, M. B., ANDRADE, S. I. E., NETA, M. S. S., BARRETO, I. S., ALMEIDA, L. F., ARAÚJO, M. C. U., A micro-flow-batch analyzer using webcam for spectrophotometric determination of *ortho*-phosphate and aluminium(III) in tap water. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 5, p. 898-906, 2014.

LOPEZ-MOLINERO, A., LIÑAN, D., SIPIERA, D., FALCON, R. Chemometric interpretation of digital image colorimetry. Application for titanium determination in plastics. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 380-385, 2010.

MALEKI, N., SAFAVI, A., SEDAGHATPOUR, F. Single-step calibration, prediction and real samples data acquisition for artificial neural network using a CCD camera. **Talanta**, v. 64, p. 830-835, 2004.

MAUER, L. J., CHERNYSHOVA, A. A., HIATT, A., DEERING, A., DAVIS, R. Melamine detection in infant formula powder using near- and mid-infrared

spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n.10, p. 3974–3980, 2009.

PACIORNIK, S., YALLOUZ, A. V., CAMPOS R. C., GANNERMAND, D. Scanner Image Analysis in the Quantification of Mercury using Spot-Tests. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 1, p. 156-161, 2006.

RIMA, J., ASSAKER, K., OMAR, F. EL, KARIM, C. B. A sensitive spectrofluorimetric method for the quantification of melamine residue in milk powder using the Mannich reaction in aqueous solutions, **Talanta**, v. 116, p. 277-282, 2013.

SHA, H., DINGBIN, L., ZHUO, W., KAIYONG, C., XINGYU, J. Utilization of unmodified gold nanoparticles in colorimetric detection. **Science China: Physics, Mechanics & Astronomy**, v. 54, p. 1757-1765, 2011.

SQUADRONE, S., FERRO, G. L., MARCHIS, D., MAURO, C., PALMEGIANO, P., AMATO, G., GENIN, E. P., ABETE, M. C. Determination of melamine in feed: Validation of a gas chromatography-mass spectrometry method according to 2004/882/CE regulation. **Food Control**, v. 21, n. 5, p. 714–718, 2010.

TYAN, Y. -C., YANG, M. -H., JONG, S. -B., WANG, C. -K., SHIEA, J. Melamine contamination. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 3, p. 729-735, 2009.

XU, G. L., ZHANG, H. L., ZHONG, M., ZHANG, T. T., LU, X. J., KAN, X. W. Imprinted sol–gel electrochemical sensor for melamine direct recognition and detection. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 713, p. 112-118, 2014.

YAM, K. L., PAPADAKIS, S. E. A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. **Journal of Food Engineering**, v. 61, n. 1, 137-142, 2004.

ZHOU, Y., LI, C. -Y., LI, Y. -S., REN, H. -L., LU, S. -Y., TIAN, X. -L., HAO, Y. -M., ZHANG, Y. -Y., SHEN, Q. -F., LIU, Z. -S., MENG, X. -M., ZHANG, J.-H.
Monoclonal antibody based inhibition ELISA as a new tool for the analysis of melamine in milk and pet food samples. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2681-2686, 2012.

Capítulo VI

Conclusões

Neste trabalho, os resultados obtidos pelos métodos otimizados para a detecção de melamina em leite com o auxílio tanto de nanopartículas de ouro quanto com nanopartículas de prata, bem como o uso de nanopartículas de prata isentas de estabilizantes para a detecção de chumbo na matriz mel e a determinação de metais tóxicos mutuamente interferentes por uso de combinações de sondas fluorescentes de CdTe-MPA, mostraram um bom desempenho na aplicação das técnicas utilizadas, tornando-as técnicas alternativas vantajosas em comparação com outras metodologias descritas na literatura.

Os métodos otimizados propostos mostraram-se mais eficientes frente aos demais métodos sugeridos em outros trabalhos. É válido destacar que não houve necessidade de várias e complexas etapas de pré-tratamento das amostras, ou quando eram necessárias, limitavam-se apenas a simples passos de filtração, aquecimento, centrifugação. Para a metodologia de colorimetria com auxílio de nanopartículas de metais nobres, e análise por espectrofotometria ou por imagem digital, empregadas nas determinações de chumbo em amostras de mel e melamina em amostras de leite, pode-se concluir que ambas as metodologias podem ser empregadas com bons resultados nas determinações e quantificações.

O uso de quantum dots de CdTe passivados com MPA na quarta metodologia, permitiu a aplicação de métodos de calibração multivariada para a detecção e quantificação de distintos íons metálicos em uma mistura binária com base na resposta de fluorescência total de um sistema nano-híbrido foi conseguida com êxito. No caso das misturas ternárias, Pb (II) e Hg (II) podem ser detectados e quantificados com uma boa exatidão, enquanto os íons de Cu (II) só podem ser detectados na mistura ternária, sendo sua quantificação inviável.

Com relação aos resíduos finais, todas as quatro técnicas abordadas e utilizadas no decorrer do trabalho apresentaram valores insignificantes de formação de resíduos, pois utilizaram volumes muito baixos de solução de reagentes e amostras, tornando-se métodos ambientalmente corretos, os quais seguem os princípios propostos pela Química Verde.

REFERÊNCIAS

- AI, K.; LIU, Y.; LU, L. Hydrogen-bonding recognition-induced color change of gold nanoparticles for visual detection of melamine in raw milk and infant formula. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, p. 9496-9497, 2009.
- ALIVISATOS, A. P. Nanocrystals: building blocks for modern materials design. **Endeavour**, v. 21, p. 56-60, 1997.
- ALIVISATOS, A. P. Perspective on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals. **Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 31, p. 13226-13239, 1996.
- ALMEIDA, J. B. S. **Um método quimiluminescente baseado em imagens digitais para determinação de Cr(VI) em águas usando um sistema fluxo batelada**. 2012. 81f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Exatas e de Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.
- ANDREESCU, D.; KUMAR, T.; GOIA, D. V. Stabilizer-free nanosized gold sols. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 298, p. 742-751, 2006.
- BAER, D. R.; BURRWS, P. E.; EL-ZAEB, A. A. Enhancing coating functionality using nanoscience and nanotechnology. **Progress in Organic Coatings**, v. 47, p. 342-356, 2003.
- BERTELLI, D.; LOLLI, M.; PAPOTTI, G.; BORTOLOTTI, G. S.; PLESSI, J. Detection of honey adulteration by sugar syrups using one-dimensional and two dimensional high-resolution nuclear magnetic resonance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 8495-8501, 2010.
- BOGDANOV, S. Contaminants of bee products. **Apidologie**, v. 37, p. 1-18, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 dez. 2011. Seção 1, p. 1.
- BRASIL. Câmara do Deputados. Consultoria Legislativa. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal - RIISPOA**. Brasília, DF, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 17, de 29 de maio de 2013**. Brasília, DF, 2013. 14 p. Nota técnica.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Mercúrio**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/mercurio>>. Acesso em: 02 mar 2017.
- BRUS, L. E. Electron-electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: the size dependence of the lowest excited electronic state. **Journal of Chemical Physics**, v. 80, n. 9, p. 4403-4409, 1984.

CARBÓ-ARGIBAY, E.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, B.; PACIFICO, J.; PASTORIZA-SANTOS, I.; PÉREZ-JUSTE, J.; LIZ-MARZÁN, L. M. Chemical sharpening of gold nanorods: the rod-to-octahedron transition. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, p. 8983-8987, 2007.

CARD, J. W.; JONAITIS, T. S.; TAFAZOLI, S.; MAGNUSON, B. An appraisal of the published literature on the safety and toxicity of food-related nanomaterials. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 41, p. 22-49, 2011.

CASANOVA, M. C. R. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

COCKBURN, A.; BRADFORD, R.; BUCK, N.; CONSTABLE, A.; EDWARDS, G.; HABER, B.; HEPBURN, P.; HOWLETT, J.; KAMPERS, F.; KLEIN, C.; RADOMSKI, M.; STAMM, H.; WIJNHOFEN, S.; WILDEMANN, T. Approaches to the safety assessment of engineered nanomaterials (ENM) in food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2224-2242, 2012.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Revised codex standard for honey**. Rome, 2001. Codex STAN 12-1981, Rev. 1, 1987, Rev. 2.

CORBETT, J.; McKEOWN, P. A.; PEGGS, G. N.; WHATMORE, R. Nanotechnology: international developments and emerging products. **CIRP Annals: Manufacturing Technology**, v. 49, n. 2, p. 523-545, 2000.

DREXLER, E. **Engines of creation: the coming era of nanotechnology**. New York: Anchor Books, 1986.

EUROPEAN COMMISSION. Recommendation on the definition of a nanomaterial. **Official Journal of the European Union**, L275/38, Oct. 2011. Disponível em: <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm>. Acesso em 13 mar. 2017.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. EFSA panel on contaminants in food chain (CONTAM); Scientific opinion on lead in food. **EFSA Journal**, v. 8, n. 4, 2010. doi:10.2903/j.efsa.2010.1570.

FENDLER, J. H. Self-assembled nanostructured materials. **Chemistry of Materials**, v. 8, p. 1616-1624, 1996.

FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860-1870, 2009.

FIERASCU, R. C.; ION, R. M.; DUMITRIU, I. Plasmonic materials for biomedical applications. In: WORKSHOP ON EUROPEAN SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL COLLABORATION, 6th, Bucharest, 2008. Disponível em: <<http://www.incdmtm.ro/docs/conferinta/19.%20Plasmonic%20Materials%20For%20Biomedical%20Applications.pdf>>. Acesso em: 18 abr. 2017.

FILIGENZI, M. S.; TOR, E. R.; POPPENGA, R. H.; ASTON, L. A.; PUSCHNER, B. The determination of melamine in muscle tissue by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 4027-4032, 2007.

FLORY, F.; ESCOUBAS, L.; BERGINC, G. Optical properties of nanostructured materials: a review. **Journal of Nanophotonics**, v. 5, p. 1-21, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.

Monitoring progress since the world food summit: ending hunger must be a priority for all. Rome, 1996. Disponível em:

<http://www.fao.org/monitoringprogress/index_en.html>. Acesso em: 01 maio 2017.

FRANCHINI, R. A. A.; MATOS, R. C. Determinação da origem geográfica de méis comerciais brasileiros usando eletroforese capilar de zona. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30, 2007, Águas de Lindóia. **Resumos...** São Paulo: SBQ, 2007. Disponível em:

<<http://sec.s bq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T0210-2.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2014.

FRIGERIO, C.; RIBEIRO, D. S. M.; RODRIGUES, S. S. M.; ABREU, V. L. R. G.; BARBOSA, J. A. C.; PRIOR, J. A. V.; MARQUES, K. L.; SANTOS, J. L. M. Application of quantum dots as analytical tools in automated chemical analysis: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 735, p. 9-22, 2012.

GUO, S.; WANG, E. Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. **Analytica Chimica Acta**, v. 598, n. 2, p. 181-192, 2007.

GÚZMAN, M. G.; DILLE, J.; GODET, S. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. **International Journal of Chemical Biomolecular Engineering**, v. 2, n. 3, p. 105-111, 2009.

HUTTER, E.; FENDLER, J. H. Exploitation of localized surface plasmon resonance. **Advanced Materials**, v.16, n. 19, p. 1685-1706, 2004.

JAN, A. T.; AZAM, M.; SIDDIQUI, K.; ALI, A.; CHOI, I.; HAG, Q. M. R. Heavy metals and human health: mechanistic insight into toxicity and counter defense system of antioxidants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 29592-29630, 2015.

JORTNER, J.; RAO, C. N. R. Nanostructured advanced materials. Perspectives and directions. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 9, p. 1491-1506, 2002.

KABATA-PENDIA, A., PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3rd ed. London: CRC Press, 2000.

KAROUI, R.; BAERDEMAEKER, J. de. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. **Food Chemistry**, v. 102, p. 621-640, 2007.

KHANDUAL, A.; BACIU, G.; ROUT, N. Colorimetric processing of digital colour image! **International Journal of Advanced Research in Computer Science and Software Engineering**, v. 3, p. 103-107, 2013.

KIM, B.; PERKINS, L. B.; BUSHWAY, R. J.; NESBIT, S.; FAN, T.; SHERIDAN, R.; GREENE, V. Determination of melamine in pet food by enzyme immunoassay, high-performance liquid chromatography with diode array detection and ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 91, p. 408-413, 2008.

KÖHLER, A.; WILSON, J. S.; FRIEND, R. H. Fluorescence and phosphorescence in organic materials. **Advanced Engineering Materials**, n. 7, p. 453-459, 2002.

KUANG, H.; ZHAO, Y.; MA, W.; XU, L.; WANG, L.; XU, C. Recent developments in analytical applications of quantum dots. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1620-1636, 2011.

LEBLEBICI, Z.; AKSOY, A. Determination of heavy metals in honey samples from Central Anatolia using plasma optical emission spectrofotometry (ICP-OES). **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 17, n. 4, p. 549-555, 2008.

LEMOS, G. S.; SANTOS, J. S.; SANTOS, M. L. P. Validação de método para a determinação de 5-hidroximetilfurfural em mel por cromatografia líquida e sua influência na qualidade do produto. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1682-1685, 2010.

LIU, Y.; YU, J. Selective synthesis of CdTe and high luminescence CdTe/CdS quantum dots: the effect of ligands. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 333, p. 690-698, 2009.

LIZ-MARZÁN, L. M. Nanometals: formation and color. **Materials Today**, v. 7, p. 26-31, 2004.

MACHADO, A. W.; SOUKI, B. Q. Simplificando a obtenção e a utilização de imagens digitais – scanners e câmeras digitais. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 9, n. 4, p. 133-156, 2004.

MAGALHÃES, M. S. **Mel e pólen de abelhas *Apis mellifera* como bioindicadores de poluição ambiental por metais pesados**. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado Ecologia de Biomas Tropicais) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2010.

MALHEIROS, P. S.; DAROIT, D. J.; SILVEIRA, N. P. da; BRANDELLI, A. Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. **Food Microbiology**, v. 27, p. 175-178, 2010.

MAUER, L. J.; CHERNYSHOVA, A. A.; HIATT, A.; DEERING, A.; DAVIS, R. Melamine detection in infant formula powder using near- and mid-infrared spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 3974-3980, 2009.

MELO, C. P.; PIMENTA, M. Nanociências e nanotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, v. 9, n. 18, p. 9-22, 2004.

MICARONI, R. C. C. M.; BUENO, M. I. M. S.; JARDIM, W. F. Compostos de mercúrio: revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 487-495, 2000.

MICHALET, X.; PINAUD, F. F.; BENTOLILA, L. A.; TSAY, J. M.; DOOSE, S.; LI, J. J.; SUNDARESAN, G.; WU, A. M.; GAMBHIR, S. S.; WEISS, S. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. **Science**, v. 307, p. 538-544, 2005.

MIRASOLI, M.; BURAGINA A.; DOLCI, L. S.; GUARDIGLI, M.; SIMONI, P.; MONTOYA, A.; MAIOLINI, E.; GIROTTI, S.; RODA, A. Development of a chemiluminescence-based quantitative lateral flow immunoassay for on-field detection of 2,4,6-trinitrotoluene. **Analytical Chimica Acta**, v. 721, p. 167-172, 2012.

MIZUTA, H.; ODA, S. Bottom-up approach to silicon nanoelectronics. **Microelectronics Journal**, v. 39, p. 171-176, 2008.

MONTEIRO, D. R.; GORUP, L. F.; TAKAMIYA, A. S.; RUVOLLO FILHO, A. C.; CAMARGO, E. R. de; BARBOSA, D. B. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 2, p. 103-110, 2009.

MURRAY, C. B.; NORRIS, D. J.; BAWENDI, M. G. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, p. 8706-8715, 1993.

MURUGADOSS, A.; CHATTOPADHYAY, A. A 'green' chitosan-silver nanoparticle composite as a heterogeneous as well as micro-heterogeneous catalyst. **Nanotechnology**, v. 19, 2008. doi:10.1088/0957-4484/19/015603.

NEVES, A. M. G. S. **Manual de boas práticas na produção de mel**: princípios gerais de aplicação. Lisboa: Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, 2006.

OLIVEIRA, M. M. **Nanopartículas de prata e seus nanocompósitos com polianilina**: síntese, caracterização e propriedades. 2005. 174 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

OZIN, G. A. Nanochemistry: synthesis in diminishing dimensions. **Advanced Materials**, v. 4, n. 10, p. 612-649, 1992.

PANIGRAHI, S.; KUNDU, S.; GHOSH, S. K.; NATH, S.; PAL, T. Deposition kinetics of nanocolloidal gold particles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 264, p. 133-138, 2005.

PINTO, V. V.; FERREIRA, M. J.; SILVA, R.; SANTOS, H. A.; SILVA, F.; PERREIRA, F. Long time effect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium: Effect of the synthesis and storage conditions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 364, p. 19-25, 2010.

POHL, P. Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, p. 117-128, 2009.

RAD, A. G.; ABBASI, H.; AFZALI, M. H. Gold nanoparticles: synthesising, characterizing and reviewing novel application in recent years. **Physics Procedia**, v. 22, p. 203-208, 2011.

REDIGOLO, M. L.; ARELLANO, W. A.; BARBOSA, L. C.; BRITO-CRUZ, C. H.; CÉSAR, C. L.; PAULA, A. M. Temperature dependence of the absorption spectra in CdTe-doped-glasses. **Semiconductor Science and Technology**, v. 14, p. 58-63, 1999.

REISS, P.; PROTIERE, M.; LI, L. Core/Shell semiconductor nanocrystals. **Small**, v. 5, n. 2, p. 154-168, 2009.

ROCHA, T. C. R. da. **Nanopartículas metálicas anisotrópicas: mecanismos de formação e aplicações ópticas**. 2008. 172 f. Tese (Doutorado em Física) - Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

ROONEY, J. P. K. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. **Toxicology**, v. 234, p. 145-156, 2007.

ROYAL SOCIETY; ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. **Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties**. London, 2014. Disponível em: <<http://www.nanotec.or.uk/final/Report.htm>>. Acesso em: 21 fev. 2017.

RUMAYOR, V. G.; IGLESIAS, E. G.; GALAN, O. R.; CABEZAS, L. G. **Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria**. Madri: Elece Industria Grafica, 2005.

RUOFF, K.; BOGDANOV, S. Authenticity of honey and other bee products. **Apiacta**, v. 38, p. 317-327, 2004.

SÁEZ-PLAZA, P.; MICHAŁOWSKI, T.; NAVAS, M. J.; ASUERO, A. G.; WYBRANIEC, S. An overview of the Kjeldahl method of nitrogen determination. Part I. Early history, chemistry of the procedure, and titrimetric finish. **Journal Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 178-223, 2013.

SANCHO, J. V.; IBANEZ, M.; GRIMALT, S.; POZO, O. J.; HERNADE, Z. F. Residue determination of cyromazine and its metabolite melamine in chard samples by ion-pair liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 530, p. 237-243, 2005.

SANGUANSRI, P.; AUGUSTIN, M. A. Nanoscale materials development – a food industry perspective. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 547-556, 2006.

SHI, X.; SHEN, M.; MÖHWALD, H. Polyelectrolyte multilayer nanoreactors toward the synthesis of diverse nanostructured materials. **Progress in Polymer Science**, v. 29, p. 987-1019, 2004.

SILVA, F. O.; VIOL, L. C. S.; FERREIRA, D. L.; ALVES, J. L. A.; SCHIAVON, M. A. O estado da arte da síntese de semicondutores nanocristalinos coloidais. **Química Nova**, v. 33, p. 1933-1939, 2010.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Thomson Learning, 2006.

SORIANO, M. L.; ZOUGAGH, M.; VALCÁRCEL, M.; RIOS, Á. Analytical Nanoscience and Nanotechnology: Where we are and where we heading. **Talanta**, 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.012>.

SUN, F.; MA, W.; XU, L.; ZHU, Y.; LIU, L.; PENG, C.; WANG, L.; KUANG, H.; XU, C. Analytical methods and recent developments in the detection of melamine. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1239-1249, 2010.

TOMA, H. E. Ética e humanismo em nanotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, v. 9, n. 18, p. 87-98, 2004.

VALCÁRCEL, M.; LÓPEZ-LORENTE, Á. I. **Gold nanoparticles in analytical chemistry**. Amsterdam: Elsevier, c2014. (Comprehensive analytical chemistry, v. 66).

VERMA, M. S.; ROGOWSKI, J. L.; JONES, L.; GU, F. X. Colorimetric biosensing of pathogens using gold nanoparticles. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 666-680, 2015.

WEISS, B. Lead, manganese, and methylmercury as risk factors for neurobehavioral impairment in advanced age. **International Journal of Alzheimers Diseases**, v. 2011, 2011. doi:10.4061/2011/607543.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Copper in drinking-water**: background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. 2004. Disponível em:

<http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/copper.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Toxicological and health aspects of melamine and cyanuric acid**: report of a WHO expert meeting in collaboration with FAO, supported by Health Canada. Geneva: World Health Organization, 2009. 66 p.

YIN, H.; YAMAMOTO, T.; WADA, Y.; YANAGIDA, S. Large-scale and size-controlled synthesis of silver nanoparticles under microwave irradiation. **Materials Chemistry and Physics**, v. 83, p. 66-70, 2004.

ZARBIN, A. J. G. Química de (nano)materiais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469-1479, 2007.

ZHANG, J. Z.; NOGUEZ, C. Plasmonic optical properties and applications of metal nanostructures. **Plasmonics**, v. 3, p. 127-150, 2008.

ZHOU, M.; GLOSH, I. Quantum dots and peptides: a bright future together. **Biopolymers**: Peptide Science, v. 22, p. 325-339, 2006.

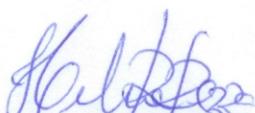
ZHU, L.; GAMEZ, G.; CHEN, H.; CHINGIN, K.; ZENOBI, R. Rapid detection of melamine in untreated milk and wheat gluten by ultrasound-assisted extractive electrospray ionization mass spectrometry (EESI-MS). **Chemical Communication**, v. 5, p. 559-261, 2009.

DAYANA BORGES BITTAR

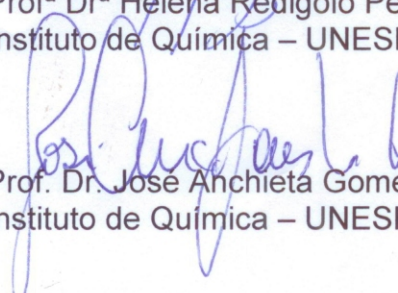
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.

Araraquara, 03 de outubro de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Helena Redigolo Pezza (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara – SP



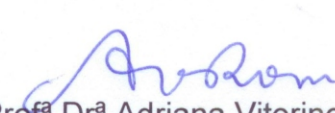
Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto
Instituto de Química – UNESP, Araraquara – SP



Profª Drª Ehy Maria Vieira
Instituto de Química – USP, São Carlos – SP



Drª Luciana Polese
Centro de Estudos Ambientais – UNESP, Rio Claro – SP



Profª Drª Adriana Vitorino Rossi
Instituto de Química – UNICAMP, Campinas – SP