

1 Introdução

1.1. Flavonóides

Flavonóides (estrutura base dos flavonóides mostrada na Figura 1) são metabólitos secundários biossintetizados a partir da fenilalanina e do ácido acético, (Huber e Rodriguez-Amaya, 2008) sendo o ácido chiquímico o precursor da fenilalanina (Karam *et al.*, 2013). Os anéis aromáticos dos flavonóides são formados a partir desta via biossintética mista, onde através de reações de condensação, auxiliadas por enzimas, três moléculas de malonil coenzima A (CoA) derivadas da via do acetato são condensadas juntamente com uma molécula de 4-hidroxicoumaril-CoA, que é derivada da via do chiquimato. As unidades provenientes da via do acetato dão origem ao anel A da estrutura básica do flavonóide enquanto a unidade proveniente da via do chiquimato dá origem ao anel B e aos três átomos de carbono que interligam os anéis A e B. A ciclização que resulta na formação do anel A produz a chalcona que se equilibra com a flavanona correspondente. Os outros tipos de flavonóides são formados por subsequentes etapas de oxirredução deste intermediário comum (da Silva, 2011; Andersen *et al.*, 2006). Os flavonóides são compostos polifenólicos e estão presentes em diversas plantas, sendo encontrados, principalmente, em sementes, frutos, cascas, raízes, folhas e flores (Feldman, 2001). A sua distribuição nos vegetais depende principalmente do tipo de família, gênero e da espécie, por exemplo, os flavonóides encontrados nas folhas podem apresentar diferenças estruturais daqueles presentes nas flores, nos galhos, raízes e frutos. Assim, em uma mesma planta um único flavonóide pode ser encontrado em diferentes quantidades dependendo do órgão vegetal (Machado *et al.*, 2008). Fatores abióticos naturais como a radiação solar, raios UV, períodos de seca ou chuva, nutrientes e estações do ano também influenciam no metabolismo e na produção dos mais diversos flavonóides (Machado, 2005).

A estrutura básica dos flavonóides é formada por um núcleo fundamental, com 15 átomos de carbono (C15) arranjados em três anéis (C6-C3-C6), sendo dois anéis fenólicos substituídos (os já mencionados anéis A e B) e um anel C (Dornas *et al.*, 2007).

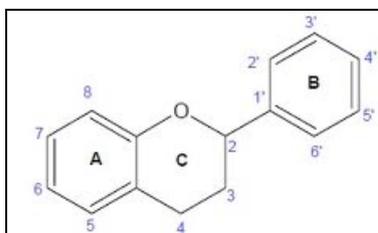


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura base de um flavonóide.

As variações no anel C originam as diversas classes dos flavonóides. Este anel pode ser do tipo pirânico, como no caso das catequinas e antocianidinas, ou do tipo pirona, como nos flavonóis, flavonas, isoflavonas e flavanonas, esses quatro últimos possuindo um grupo carbonila na posição C4 do anel C. Os esqueletos estruturais de cada classe de flavonóides são mostrados na Figura 2.

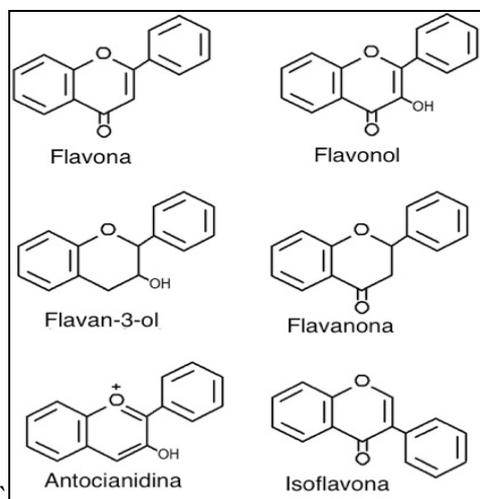


Figura 2 - Estruturas das principais subclasses dos flavonóides, adaptado de Hui *et al.*, 2013.

Dentro de uma mesma classe, os flavonóides diferem nos padrões de substituição nos anéis A e B, como exemplo pode-se citar canferol que possui somente um grupo hidroxila no anel B e a quercetina que possui dois grupos hidroxila no anel B em posição *orto*. As classes e subclasses de alguns dos

principais flavonóides, bem como as suas diferenças estruturais e principais fontes naturais são descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Principais subclasses dos flavonoides e fontes naturais.

Classe	Subclasse	Estrutura	Fonte alimentar
Flavan-3-ol	Catequina, Epicatequina	OH na posição 3	maça, chá, cerveja
Antocianidina	Cianidina	OH na posição 3 e ligações duplas conjugadas no anel C.	frutas e flores
Flavona	Apigenina, Luteolina, Diosmetina	C=O na posição 4 e dupla ligação entre C2 e C3	flores, cereais, frutas, vegetais
Flavonol	Quercetina, Miricetina, Canferol e Rutina	C=O na posição 4, OH na posição 3 e dupla ligação entre C2 e C3	cebola, maça, chá, tomate, vinho tinto, trigo sarraceno
Isoflavona	Genisteína, Diazzeína	C=O na posição 4 e anel B ligado ao anel C em C3 e ligação dupla entre C2 e C3.	legumes e derivados de soja
Flavanona	Hesperidina, Naringenina	C=O na posição 4 e ligação simples entre C2 e C3.	frutas cítricas

Os flavonóides (exceto as catequinas) são encontrados em plantas, principalmente na forma glicosilada, ou seja, com moléculas de açúcares ligadas às suas estruturas, sendo D-glicose e L-ramnose os açúcares mais comuns. Pelo menos oito monossacarídeos diferentes, ou uma combinação destes, podem ligar-se às diferentes hidroxilas dos flavonóides resultando em uma diversidade de glicosídeos conhecidos (Huber e Rodriguez-Amaya, 2008). O efeito da glicosilação proporciona ao flavonóide uma maior solubilidade em água e uma menor reatividade. Embora todos os grupos hidroxilas possam ser glicosilados, há maior probabilidade das ligações ocorrerem em hidroxilas substituídas nas posições 3, 5 e 7, por serem as mais ácidas. Quando as estruturas dos flavonóides não apresentam açúcares, estes são denominadas flavonóides agliconas (Huber e Rodriguez-Amaya, 2008).

1.1.1. Biodisponibilidade e metabolismo dos flavonóides

Os flavonóides são amplamente distribuídos na natureza, constituindo o grupo fenólico mais diversificado dentre os produtos de origem natural. Eles estão presentes em diversos alimentos que comumente são incorporados na dieta humana, sendo as principais fontes, os frutos (uvas, cerejas, maçã, groselha, frutas cítricas, entre outros) e hortaliças (pimentas, tomates, espinafre, cebola, brócolis, dentre outras) (Barnes *et al.*, 2001). Estes alimentos são ditos funcionais, ou seja, são alimentos que contribuem para manutenção da saúde e na prevenção de doenças, que em parte se devem aos flavonóides. Eles contribuem com várias propriedades benéficas à saúde, dentre elas, a propriedade antioxidante é uma das mais importantes. Em pesquisas recentes feitas por Arabbi *et al.* (2004) foi possível estimar a quantidade de flavonóides ingerido pela população brasileira. Os resultados indicaram a ingestão entre 60 e 106 mg dia⁻¹. Estes valores foram superiores aos estimados para populações de países europeus, como Finlândia (55 mg dia⁻¹) e Dinamarca (28 mg dia⁻¹) (Hassimotto, 2005). No entanto, uma estimativa precisa da média de consumo de flavonóides presentes em diversos alimentos é difícil em função da grande variedade e diversidade dos flavonóides disponíveis (Becho *et al.*, 2009).

A velocidade de absorção destes compostos varia consideravelmente em relação às modificações que podem existir nos esqueletos básicos destes compostos em função da glicosilação, da esterificação, da amidação, da hidroxilação, entre outras alterações que modulam a polaridade, a toxicidade e o direcionamento intracelular destes compostos (Huber e Rodriguez-Amaya, 2008). Essa diversidade estrutural influencia na absorção dos diferentes flavonóides pelo intestino, e conseqüentemente na sua biodisponibilidade (Bohets *et al.*, 2001). No entanto, é fato que o resíduo de açúcar ligado à molécula do flavonóide é provavelmente o fator determinante de sua absorção pelo organismo (Araújo, 2012).

Os flavonóides na sua forma não glicosilada, ou seja, na forma aglicona, podem ser absorvidos diretamente pelo intestino delgado. Entretanto, a maioria dos flavonóides que estão presentes na dieta humana encontra-se na forma glicosilada. Até pouco tempo atrás, aceitava-se que os flavonóides glicosídicos

alcançavam o cólon, onde ocorre a remoção do açúcar catalisada por enzimas da microflora intestinal (glicosidasas), sem que sofressem modificações nas suas estruturas. No entanto, estudos indicaram que o sítio primário de absorção de alguns flavonóides glicosídicos encontra-se no intestino delgado. Já os flavonóides ramnosídicos necessitam ser hidrolisados pelas ramnosidasas da microflora colônica, uma vez que as glicosidasas presentes no intestino delgado não atuam sobre os ramnoglicosídeos. Se a absorção dos flavonóides de estruturas glicosiladas não ocorrer no intestino delgado, estes são sujeitos ao metabolismo microbiano e à extensiva degradação no cólon, o que resulta em uma menor biodisponibilidade (Hassimotto, 2005). A absorção no cólon é mais lenta e com menor intensidade quando comparada à do intestino delgado, provavelmente devido a sua menor área de exposição e à baixa atividade dos transportadores de membrana (Araujo, 2012)

Após a absorção, os flavonóides são conjugados no intestino delgado e no fígado pela glicuronidação, sulfatação ou metilação ou então são metabolizados a pequenos compostos fenólicos. Ao sofrerem estas modificações, os flavonóides podem tornar-se metabólitos mais ativos ou serem eliminados do organismo mais facilmente por tornarem-se mais polares, assim, muitos desses metabólitos podem ser detectados na urina e nas fezes (Walle *et al.*, 2003). Altas taxas de excreção dos metabólitos nas fezes indicam baixa absorção dos flavonóides pelo organismo (Manach *et al.*, 2005). Baixos valores de excreção urinária de metabólitos podem ser indicativos de excreção pronunciada pela bile, ou ainda de metabolismo intenso (Araújo, 2012).

1.1.2. Atividades biológicas dos flavonóides

Os flavonóides têm despertado um grande interesse da comunidade científica devido aos benefícios associados à ingestão de tais compostos. Diversas funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas. Além da pigmentação em frutas, flores, sementes e folhas, também têm importantes funções na sinalização entre plantas e micróbios, na fertilidade de algumas espécies (Huber e Rodriguez-Amaya, 2008), na proteção contra a incidência de raios UV, na proteção contra micro-organismos patogênicos, além de ação

antioxidante e alopática e inibição enzimática (Machado *et al.*, 2008). Nos mamíferos, os flavonoides apresentam uma notável série de ações bioquímicas e farmacológicas que podem influenciar nas funções de vários sistemas celulares (Middleton *et al.*, 2000), destacando-se as atividades antioxidante, antiinflamatória, antitumoral e antialérgica, efeitos vasodilatadores, bem como ações antimicrobianas e antivirais (Lin *et al.*, 1997).

A maior parte dos efeitos benéficos à saúde atribuídos aos flavonóides está relacionada à sua capacidade antioxidante e quelante, com atuação no sequestro de radicais livres (Prior e Cao, 2000) e quelação de metais capazes de catalisar a peroxidação de lipídeos. A atividade antioxidante desses compostos é consequência das suas propriedades oxirredutoras (Degáspari e Waszczyński, 2004). Dessa forma, eles mostram grande eficiência na neutralização de vários tipos de moléculas oxidantes que estão envolvidos em danos ao DNA e formação de tumores (Marchand, 2002).

1.2. Quercetina

Diversos estudos realizados com o flavonóide quercetina confirmaram a sua potencial atividade antioxidante, sendo este um dos flavonóides com maior capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio ((Huber e Rodriguez-Amaya, 2008; Heijnem *et al.*, 2002; Numata e Tanata, 2011; Gordon e Roedig-Penman, 1998)

A quercetina (3,5,7,3'-4'- pentahidroxi flavona) é um flavonol encontrado em uma ampla variedade de plantas, alimentos e produtos como sucos, chás e vinhos (Silva, 2011). Frequentemente ela pode ser encontrada em alimentos como cebola, maçã, frutas cítricas, bem como em pequenas quantidades nas folhas verdes e feijões. Geralmente a quercetina está presente nos alimentos sob a forma glicosilada, ligada covalentemente à uma molécula de açúcar, como mostrado na Figura 3 (substâncias A, B e C). A característica que distingue uma forma glicosídica da outra é o tipo de grupamento glicosídico presente na estrutura, por exemplo, a isoquercetina também chamada de quercetina-3-glicosídeo (mostrada na Figura 3 estrutura C) possui uma molécula de glicose ligada à posição 3 (carbono 3 do anel C) enquanto que a quercetina-3-

rutinosídeo também chamada de rutina, possui um grupamento rutinose (dissacarídeo) ligado à posição 3 (Figura 3 estrutura A). Por outro lado a quercetina-4'-glicosídeo apresenta uma molécula de glicose ligada à posição 4' do anel B. Já a quercetina na forma aglicona representada pela estrutura D da Figura 3, não possui substituinte glicosídico na sua estrutura. A presença do grupamento glicosídico promove o aumento da solubilidade das substâncias descritas em meio aquoso, desse modo, se pode concluir que a solubilidade em água das quercetina aglicona seja menor que a das demais (Chen *et al.*, 2010).

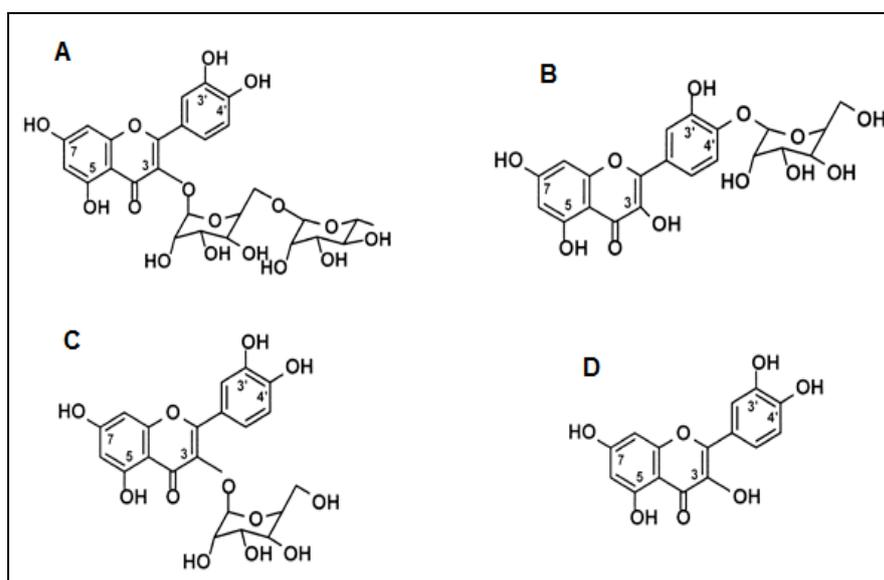


Figura 3 - Estruturas de quercetinas glicosiladas: (A) quercetina-3-rutinosídeo, (B) quercetina-4'-glicosídeo e (C) quercetina-3-glicosídeo e (D) quercetina aglicona.

As propriedades farmacológicas da quercetina podem ser potencializadas na presença de vitamina C. Estudos comprovaram que ocorre a manutenção da resistência e da integridade da parede de capilares sanguíneos quando essas duas substâncias foram utilizadas associadamente. Subseqüentemente, diversos relatos atribuíram as atividades anti-hipertensiva, antiarritimica, hipocolesterolêmica, anticarcinogênica (Formica e Regelson, 1995), antiviral, antiulcerogênica, antitrombótica, anti-isquêmica, anti-inflamatória, antialérgica (Inal e Karaman, 2000) e antioxidante (Formica e Regelson, 1995) à quercetina (Alves *et al.*, 2010). As atividades farmacológicas da quercetina estão relacionadas com a elevada atividade antioxidante que depende, principalmente, de três sítios importantes: (I) presença de um grupo catecol (*o*-dihidroxi) no anel B, que

proporciona a formação de radicais fenoxil mais estáveis após a doação do átomo de hidrogênio; (II) dupla ligação entre os átomos de carbono C2-C3 que proporciona a extensão da conjugação entre os anéis, permitindo a deslocalização eletrônica de um elétron do radical fenoxil formado no anel B para o anel C favorecida por híbridos de ressonância; (III) a presença da hidroxila na posição 3 do anel C (Pietta *et al.*, 2001; Bonina *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 2002; Sugihara *et al.*, 1999).

1.2.1.

Biodisponibilidade e metabolismos das quercetinas

A administração da quercetina como suplemento por via oral é decorrente da baixa disponibilidade quando esta se encontra no organismo (Silva, 2011), portanto com a suplementação adequada é possível disponibilizar maior quantidade de quercetina para o organismo. A quercetina-3-glicosídeo e a quercetina-4'-glicosídeo apresentam maior biodisponibilidade quando comparadas com a quercetina-3-rutinosídeo. As quercetinas que apresentam apenas uma unidade de monossacarídeo são absorvidas mais rapidamente pelos humanos, independentemente da posição da glicose, e da conversão da quercetina-3-rutinosídeo em quercetina-3-glicosídeo. Isto representa uma estratégia importante, desempenhada pelo organismo, para aumentar a biodisponibilidade da quercetina menos disponível (Olthof *et al.*, 2000; Behling *et al.*, 2004). A quercetina-3-rutinosídeo pode ser transformada em quercetina-3-glicosídeo através da quebra do grupamento ramnose.

A quercetina aglicona e suas formas glicosiladas são extensivamente metabolizadas por hidrólise enzimática, ação microbiana e reações de conjugação. Os produtos provenientes da metabolização no intestino delgado encontram-se na forma de glicoronídeo e sulfato. No intestino grosso, por ação da microflora colônica, pode-se formar hidroxifenilacetato. No fígado ocorre formação de quercetina *o*-metilada e de quercetina glicoronizada *o*-metilada além de outros produtos de degradação. Observou-se que tanto em ratos quanto em seres humanos, a quercetina é completamente convertida em conjugados metilados no plasma após sua administração (Manach *et al.*, 1998; Sesink *et al.*, 2001). A quercetina é absorvida na microflora intestinal e excretada na bile e na

urina como glucoronidato e sulfato conjugado em 48 h. Posteriormente, este flavonóide é degradado, por bactérias intestinais, em ácido fenólico, ácido 3-hidroxifenilacético e ácido 3,4-dihidroxifenilacético.

Medicamentos contendo quercetina em sua composição encontram-se disponíveis para o consumidor. Alguns exemplos são o suplemento dietético Quercetin (500 mg) cuja dose diária recomendada é de 1 comprimido. Outro exemplo é o suplemento dietético contendo 250 mg de quercetina e 200 mg de ácido ascórbico (composição referente à duas cápsulas), com dose diária recomendada de duas cápsulas. Outro suplemento à base de quercetina é o complexo Quercetin com composição de 500 mg quercetina, 500 mg vitamina C e 10 mg rutina presente (composição referente à duas cápsulas) sendo esta a dose diária recomendada.

1.3. Rutina

A rutina, também conhecida como vitamina P, e seus derivados representam cerca de 95% do total dos flavonóides ingeridos a partir dos alimentos, estando presentes em quantidades apreciáveis em cebola, maçã, brócolis, vinho, chá, em cascas de frutas cítricas (laranjas, toranja, limão e lima) (Araújo, 2012), feijão vermelho e tomate. Entre os vegetais, destacam-se os frutos do faveiro, trigo sarraceno e a árvore japonesa pagoda (Huber e Rodriguez-Amaya, 2008).

A rutina apresenta um largo espectro de atividades biológicas e farmacológicas características dos flavonóides (incluindo atividade antioxidante, antiviral, antitumoral, anti-inflamatória, antialérgica (Franzoi *et al.*, 2008), citoprotetora, vasoprotetora, antiproliferativa, antitrombótica e cardioprotetora (Araújo, 2012). Nas últimas décadas, as atividades farmacológicas da rutina têm sido intensamente pesquisadas por indústrias farmacêuticas (Pedriali, 2005) visando a sua associação com outros medicamentos com a finalidade de aumentar as propriedades antioxidantes e vasoprotetoras de algumas formulações, promovendo o alívio dos sintomas de insuficiência venosa e linfática além da redução da fragilidade capilar (Calabro *et al.*, 2005; Blasco *et al.*, 2004). A administração de rutina em pacientes com histórico de insuficiência

venosa e fragilidade capilar impulsiona a melhora dos sintomas de dor, queimação, sensação de peso e cansaço nas pernas por promover a normalização da resistência e permeabilidade da parede dos vasos, que podem estar associados com algumas doenças hemorrágicas ou hipertensão (Pathak *et al.*, 1991; Raso *et al.*, 2009). Conforme mencionado, existe a limitação da baixa solubilidade dos flavonóides em água (Pedriali *et al.*, 2005), que reduz a biodisponibilidade da rutina quando esta se encontra no organismo humano.

1.3.1. Absorção, biodisponibilidade de rutina

A absorção da rutina no intestino delgado é dificultada devido à presença da molécula dissacarídica presente na sua estrutura. Os flavonóides ramnosídicos são hidrolisados por ramnosidases da microflora do cólon. Como a absorção no cólon é mais lenta e com menor intensidade quando comparada à do intestino delgado (Hassimoto, 2005), estes são sujeitos ao metabolismo microbiano e à extensiva degradação no cólon. O resultado é uma menor biodisponibilidade desses flavonóides (Oliveira, 2012). Embora a rutina seja um importante precursor que pode dar origem a quercetina, sua biodisponibilidade no organismo humano é de apenas 20% quando comparada com a quercetina-4'-glicosídeo (Behling *et al.*, 2004). A rutina pode ser transformada em quercetina 3-glicosídeo pela hidrólise da molécula de ramnose, uma vez que as quercetinas 3-glicosídeo e 4-glicosídeo apresentam maior biodisponibilidade. No entanto, a sua baixa concentração em alimentos e a escassez de fontes naturais da quercetina 3-glicosídeo faz com que a separação deste composto da matriz natural não seja muito eficaz (Oliveira, 2012).

Medicamentos contendo rutina em sua composição encontram-se disponíveis em farmácias e drogarias de todo país. Alguns desses medicamentos existentes são: Venocur Triplex, com dosagem de 300 mg por cápsula e uma dose diária de ingestão recomendada de uma a duas drágeas. Outro medicamento à base de rutina é o gerovital, um polivitamínico e energético à base de ginseng e vitaminas, contendo 10 mg de rutina, sendo a dose de ingestão recomendada de 1 drágea 3 vezes ao dia. Outro medicamento contendo a rutina é o suplemento

vitamínico-mineral Nativit-mineral, contendo 10 mg de rutina, com uma dose diária recomendada de 1 drágea.

1.4.

Métodos analíticos para determinação de flavonóides, com foco na quercetina e rutina

Muitos estudos têm sido realizados com o intuito de quantificar os flavonóides, a fim de se descobrir as principais fontes alimentares e os níveis destes flavonóides ingeridos na dieta humana. Deste modo, para dar mais consistência aos estudos dos efeitos químicos e biológicos destes compostos se faz necessário o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis e seletivos. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem sido vastamente utilizada em quantificações de quercetina e rutina em alimentos, (Careri *et al.*, 2000; Hollman *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1998) apesar de apresentar algumas desvantagens clássicas como o elevado gasto de solventes e longos tempos de análises (problemas minimizados hoje em função das técnicas de ultraeficiência) e o custo necessário para aquisição e manutenção do instrumento. No entanto, vantagens como a capacidade de separação e determinação de múltiplos analitos e o amadurecimento da técnica como ferramenta analítica fazem da cromatografia líquida a técnica mais empregada. Para exemplificar a aplicação dessa técnica, pode-se citar o trabalho realizado em 2003 por Wang *et al.*, que desenvolveram um método cromatográfico com fase reversa para determinação de quercetina e canferol em urina após a ingestão de cápsulas de ginkgo biloba, utilizando uma coluna de C18 e fotometria de absorção. A fase móvel utilizada foi constituída por uma mistura de diferentes volumes de tampão fosfato (pH 2,0), tetrahidrofurano, metanol e isopropanol (70/15/10/20). O LD para a quercetina foi de $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ e o tempo de retenção da quercetina foi de aproximadamente 13 min. Em 2004, Dongri *et al.*, desenvolveram um método cromatográfico para determinação de quercetina em amostras de plasma humano de voluntários que previamente ingeriram chás verdes. A fase estacionária usada foi uma coluna octadecilsilica (ODS) e a fase móvel utilizada uma mistura de água e metanol (40/60 v/v) contendo 0,5% de ácido fosfórico. O limite de detecção (LD) absoluto alcançado foi 0,3 pg com detecção eletroquímica utilizando um eletrodo de trabalho de carbono vítreo. O tempo de retenção da

quercetina foi elevado, aproximadamente 30 min. (Dongri *et al.*, 2004). Em 2008, Zielinska *et al.*, quantificaram a quercetina e seus derivados glicosídeos em amostras de extratos de cebola por HPLC com detecção amperométrica, obtendo LD de $8,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para quercetina. Em 2009, Tang *et al.* quantificaram oito flavonóides, dentre eles, rutina e quercetina em extratos de ginko biloba por HPLC, utilizando detector do tipo DAD, coluna C18 e eluição por gradiente utilizando como fase móvel uma mistura de metanol e 0,1% de ácido fórmico. Os valores de LD para rutina e quercetina foram 0,01 e 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, e os tempos de retenção da rutina e quercetina foram aproximadamente 20 e 35 min., respectivamente. Mais recentemente, em 2013, a quercetina foi quantificada em chás verdes utilizando um sistema de cromatografia líquida de ultra-eficiência (UPLC) com detector de fotometria de absorção do tipo arranjo de diodos (DAD). A fase móvel utilizada foi metanol e a fase estacionária utilizada foi uma coluna C18. O limite de detecção (LD) obtido foi de 1,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o tempo de retenção da quercetina de aproximadamente 2 min (Savic *et al.*, 2013).

Outra técnica bastante utilizada é a voltametria. Em 1996, Zoulis e Efstathiou desenvolveram um método voltamétrico de redissolução para determinação de seis flavonas, dentre elas a rutina e a quercetina, utilizando eletrodo de pasta de carbono. Os valores de LD encontrados tanto para rutina quanto para a quercetina foram da ordem de $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Em 2006, Zheng *et al.* quantificaram rutina em comprimidos e em ervas flos sophorae, utilizando eletrodo de ouro modificado com nanotubos de carbono. No estudo de interferência, observou-se que a hemoglobina diminui a corrente de pico da rutina em uma maneira linear, podendo o método ser usado para determinação indireta da hemoglobina. O LD obtido foi de $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Em 2008, Franzoi *et al.* usaram a voltametria de varredura linear e a voltametria cíclica, e um eletrodo de pasta de carbono modificado com PVP (poli(vinilpirrolidona)) na tentativa de melhorar a seletividade para a rutina, pois essa é melhor adsorvida na superfície deste eletrodo devido a interação entre o grupo hidroxila do flavonóide e o grupo imida do PVP. No entanto, os estudos de interferência mostraram que outros flavonóides também podem ser fortemente adsorvidos na superfície do eletrodo. O LD foi de $1,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (Franzoi *et al.*, 2008).

A eletroforese capilar com detecção eletroquímica foi o método escolhido por Gang *et al.* (2000) para a determinação de daidzeína, quercetina e rutina em plantas. Os tempos de migração para rutina e quercetina foram aproximadamente 6 e 9 min., respectivamente e os limites de detecção para rutina e quercetina foram $4,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O eletrodo de trabalho foi um disco de carbono vítreo. O eletrólito de corrida foi o tampão borato (pH 9,0; $100,0 \text{ mmol L}^{-1}$). Em 2004, Pejic *et al.* desenvolveram um método espectrofotométrico direto para quantificação de quercetina na presença de ácido ascórbico, com LD de $0,76 \mu\text{g mL}^{-1}$. A espectroscopia Raman foi a técnica escolhida por Numata e Tanaka (2011) para análise quantitativa de quercetina em cascas de cebola, obtendo o valor de LD limitado de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

1.5. A nanotecnologia e os pontos quânticos

O estudo de materiais cujos tamanhos das partículas que os constituem encontram-se na faixa de nanômetros ganhou importância significativa no final do século XX, levando ao aparecimento e consolidação de toda uma área do conhecimento, hoje reconhecida como "Nanociência e Nanotecnologia" (Zarbin, 2007). Materiais de dimensões nanométricas e que tem propriedades diferenciadas quando comparadas aos materiais de escalas maiores de tamanho fazem parte do que se chama de nanomateriais com interesse tecnológico. A nanotecnologia tem como foco de estudo tais materiais que tem atraído grande interesse em diversos setores devido ao seu desempenho diferenciado em uma variedade de aplicações na medicina, na eletrônica, na cosmetologia, na indústria farmacêutica, entre outros. Dentre os nanomateriais com propriedades diferenciadas existem os semicondutores nanocristalinos coloidais também chamados pontos quânticos ou, em língua inglesa, os quantum dots (QDs).

As nanopartículas semicondutoras coloidais geralmente apresentam forma esférica (muito embora possam ser sintetizadas em outras formas) e diâmetros que variam entre 1 e 12 nanômetros (nm) aproximadamente (Costa-Fernandez *et al.*, 2006). Por se encontrarem em escala nanométrica, as nanopartículas semicondutoras apresentam um forte confinamento quântico (quanto menor o nanocristal maior o confinamento de elétrons), esse é um fator fundamental que

justifica a luminescência características desses QDs. Os QDs foram descobertos no início da década de 1980 por Ekimov, a partir da utilização de uma matriz vítrea e por Brus a partir de dispersões coloidais (Haranath, 2012). Os QDs mais comuns são aqueles constituídos por átomos dos grupos II-VI, III-V e IV-VI da tabela periódica, sendo os constituídos por átomos dos grupos II-VI os mais comuns, por exemplo, CdS, CdSe, CdTe (sulfeto de cádmio, seleneto de cádmio e telureto de cádmio, respectivamente). Esses nanomateriais apresentam propriedades ópticas e eletrônicas peculiares (Xu *et al.*, 2009). Em termos das características ópticas, os QDs apresentam amplo espectro de excitação e perfil de emissão bem definido e estreito, além de elevado rendimento quântico e fotoestabilidade. Essas características dos QDs variam em função da presença de agentes que revestem a superfície dos QDs, por exemplo, alguns ligantes orgânicos (Fernandez-Arguellez *et al.*, 2006). A Figura 4 representa simulação da estrutura de QDs de CdTe.

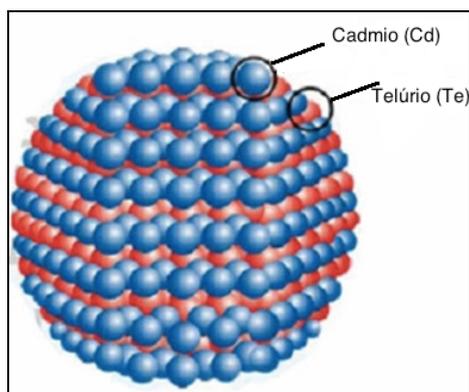


Figura 4 – Simulação da estrutura de QDs de CdTe, adaptado de Olhar Nano.

A faixa de comprimentos de onda de emissão dos QDs pode ser ajustada em função do tamanho das partículas, que por sua vez é ajustado em função das condições de síntese. Nanopartículas semicondutoras com diâmetros maiores apresentam perfil de emissão em comprimentos de onda maiores quando comparadas com nanopartículas de tamanho médio e pequeno (Acar *et al.*, 2009). Partidas de QDs de tamanho homogêneo (homogeneidade dos nanocristais obtidos durante o processo de síntese) geralmente apresentam um perfil de emissão mais estreito que os fluoróforos orgânicos convencionais, como os

pigmentos, a probabilidade de sobreposição de sinal óptico como as de outras substâncias emissoras de um sistema é bem menor.

1.5.1. Fotoluminescência

A fotoluminescência molecular (fluorescência e fosforescência) depende da capacidade da molécula em absorver a energia de fótons (Sotomayor, 2008). Pela absorção de energia, elétrons são transferidos para orbitais de maior energia, fazendo com que a molécula (ou população de moléculas) passe do estado fundamental para o excitado. Na fluorescência, a transição radiante é decorrente do retorno da população de moléculas entre estados de energia de mesma multiplicidade (singleto-singleto). Desse modo, o elétron retorna rapidamente (evento com tempo de vida na ordem de ns) do estado excitado singleto (em geral o S_1) para o estado fundamental (S_0), que em geral é singleto. Na fosforescência, uma inversão na multiplicidade ocorre durante o tempo em que a molécula se encontra no estado excitado num fenômeno denominado cruzamento intersistemas (CIS). Nesse processo, a direção do spin do elétron é invertido, e o estado excitado passa a ser um estado excitado tripleto (por exemplo, T_1). Assim, a fosforescência é a emissão radiante que ocorre quando a população retorna de T_1 para S_0 . A fosforescência é um tipo de transição radiante menos provável por envolver estados de diferentes multiplicidades e possui tempo de vida elevado (acima de μs). A desativação não radiante ocorre por uma série de processos denominados cruzamento interno e relaxamento vibracional. Esses processos podem ser observados no diagrama de Jablonski modificado (Figura 5).

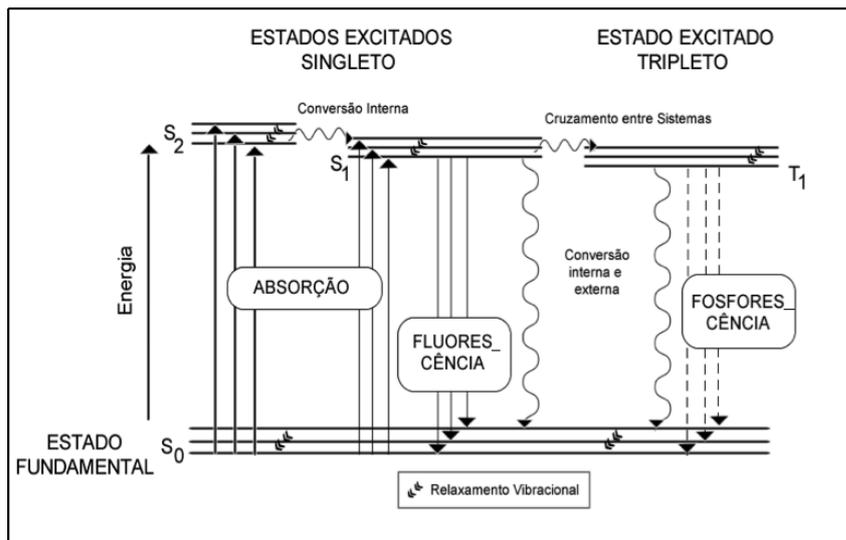


Figura 5 - Diagrama de Jablonski, adaptado de Sotomayor *et al.*, 2008.

1.5.2. Confinamento quântico e fotoluminescência dos QDs

Quando elétrons, excitados por uma energia de magnitude apropriada, são transferidos da banda de valência (BV) para a banda de condução (BC), deixam uma vacância a ser preenchida (o buraco que é a ausência de elétron). Os elétrons, com carga negativa, e os buracos, de carga positiva (deficiência de elétrons), se atraem rapidamente por força eletrostática, formando um sistema que é denominado excitônico. Devido às pequenas dimensões dos QDs, quando o excitônico é criado, as dimensões físicas da partícula o confinam de forma semelhante ao modelo da mecânica quântica da partícula na caixa (Murray *et al.*, 2003; Bowen-Katari *et al.*, 1994). O efeito de confinamento quântico modifica os níveis de energia relativos da BV e da BC do semiconductor. Desse modo, a diferença de energia torna-se quantizada e as BV e BC desdobram-se num conjunto de níveis discretos semelhantes aos níveis de energia atômicos. (Boev *et al.*, 2003). Quanto menor o diâmetro dos QDs, maior o confinamento quântico sofrido pelo sistema, com conseqüente aumento da diferença de energia entre BV e BC (Dias, 2011).

Após a transferência de elétrons para BC (por exemplo, por meio de excitação fotônica), o sistema é elevado para o estado excitado, o processo radiante ocorre com a emissão de fótons com energia específica, correspondente à lacuna de energia entre BV e BC (bandgap). Essa energia do bandgap aumenta

na medida em que o tamanho da nanopartícula semicondutora diminui. Assim, os fótons emitidos pelos semicondutores tendem ao azul (diminuição do comprimento de onda) na medida em que o tamanho da nanopartícula diminui. A relação entre tamanho dos pontos quânticos e a energia da luminescência é ilustrada na Figura 6.

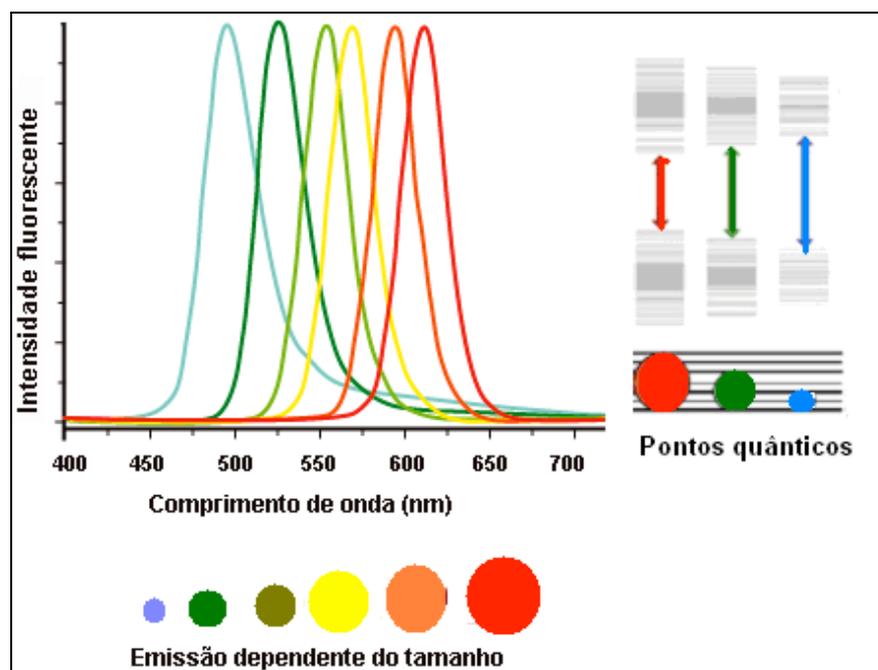


Figura 6 - Tamanho-dependência dos pontos quânticos luminescentes. Maiores QDs têm menores bandgap (vermelho) em relação aos QDs pequenos (azul). Adaptado de Torchynska e Vorobiev (2011).

A distância entre o buraco e o elétron é denominada raio de Bohr e o diâmetro do ponto quântico equivale ao raio de Bohr do excitônico (Samir *et al.*, 2012), que pode ser estimado usando o modelo de Bohr (Equação 1):

$$r = \epsilon h^2 / \pi m_r e^2 \quad (1)$$

Onde r é o raio da esfera que corresponde à separação do par elétron-buraco; ϵ é a constante dielétrica da partícula; m_r é a massa reduzida do par elétron-buraco; h é a constante de Planck, e é a carga do elétron.

A concentração de QDs numa dispersão coloidal pode ser estimada usando a lei de Lambert-Beer, que relaciona o coeficiente de extinção do primeiro

excitônico com a concentração de QDs. A partir do diâmetro médio dos QDs é possível, com equações modeladas para tal, obter o valor do coeficiente de extinção e assim estimar a concentração dos QDs sintetizado.

Yu *et al.* (2003) desenvolveram experimentalmente equações empíricas capazes de estimar o diâmetro dos QDs (D , em nm) utilizando o comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção do primeiro excitônico (λ) obtido através dos espectros de absorção dos QDs. Deste trabalho, a Equação 2 e a Equação 3 foram propostas para os cálculos dos diâmetros das nanopartículas de CdS, e CdTe respectivamente.

$$D = (-6.6521 \times 10^{-8})\lambda^3 + (1.9557 \times 10^{-4})\lambda^2 - (9.2352 \times 10^{-2})\lambda + (13.29) \quad (2)$$

$$D = (9,8127 \times 10^{-7})\lambda^3 - (1,7147 \times 10^{-3})\lambda^2 + (1,0064)\lambda - 194,84 \quad (3)$$

Os coeficientes de extinção estão relacionados com os diâmetros da nanopartículas de CdS e CdTe como pode ser visto na Equação 4 e na Equação 5 respectivamente.

$$\varepsilon = 21536 (D)^{2.12} \quad (4)$$

$$\varepsilon = 10043 (D)^{2.3} \quad (5)$$

Assim, é possível estimar o tamanho médio das nanopartículas e a concentração de QDs em dispersões coloidais.

Nas nanopartículas semicondutoras, a fotoluminescência ocorre quando o par elétron-buraco (excitônico) pode voltar para a situação original por processos radiantes (perda de energia através da emissão de fóton), que envolvem etapas não radiantes (perda de energia por calor ou através de vibrações da rede cristalina). Geralmente, os elétrons, ao retornarem para a BV, desencadeiam uma combinação de ambos os processos. Os elétrons podem se mover rapidamente pelos níveis de energia da BC através de pequenos decaimentos não radiantes e a transição final, através do bandgap é via decaimento radiante. Os processos não

radiantes ocorrem a partir de defeitos presentes na superfície do nanocristal ou na estrutura cristalina, onde neste caso os elétrons e buracos podem recombinar-se nas armadilhas (traps) formadas nestes defeitos (Matos, 2012), diminuindo a eficiência da luminescência. Uma vez que uma parte da energia é perdida através de decaimentos não radiativos, a energia do fóton emitido no decaimento radiativo é menor que a da energia dos fótons incidentes, com consequente diferença nos comprimentos de onda de excitação e de emissão (deslocamento de Stokes). (Gullapalli *et al.*, 2013).

1.5.3. Síntese dos pontos quânticos

A síntese dos QDs pode ser realizada pelo método *top-down* (*de cima para baixo*) ou pelo método *bottom-up* (*de baixo para cima*). Na técnica *top-down* os nanocristais são obtidos por litografia¹, ou seja, as nanopartículas são esculpidas litograficamente a partir de um substrato semiconductor (Castro, 2010). Nesta abordagem é possível produzir uma grande quantidade de material, (Park *et al.*, 2007, Silva *et al.*, 2010) uma vez que se reduz as dimensões do material de partida, em geral em grande quantidade. No entanto, a obtenção de nanocristais com tamanhos uniformes, ou seja, com uma distribuição estreita de diâmetros, torna-se comprometida uma vez que neste método utiliza-se procedimentos físicos (por exemplo, o calor), com limitado controle na formação dos nanocristais. Já o método *bottom-up* baseia-se na utilização do meio coloidal. Durante a síntese, o material é estimulado a crescer a partir de seus precursores, dissolvidos em algum meio e agregando de forma controlada formando as nanoestruturas. Neste método, é possível obter nanocristais com tamanhos relativamente uniformes, uma vez que existe uma melhor distribuição do material no meio reacional e pelo controle do processo através do tempo e da temperatura de síntese, porém, com essa abordagem, é possível produzir apenas pequenas quantidades de nanocristais. (Silva *et al.*, 2010).

Os QDs podem ser obtidos em meio coloidal através de uma variedade de técnicas experimentais. Diversas rotas sintéticas têm sido propostas a fim de

¹ Litografia é a arte de reproduzir, pela impressão, desenhos num corpo moldável

aperfeiçoar e simplificar os métodos já existentes tornando possível a obtenção de nanocristais com uniformidade de tamanho, alta cristalinidade e poucos defeitos de superfície (Silva *et al.*, 2010). O primeiro método de síntese para obtenção de pontos quânticos de CdTe e CdSe, surgiu na década de 1980, e se baseava na imersão tanto dos precursores metálicos (de Cd no caso) quanto do telureto ou o seleneto em um material vítreo (Ekimov e Onuschenko, 1982) como exemplo, matriz vítrea de silicato fundido (Banyai e Koch, 2005). Esta abordagem tende a produzir nanocristais de baixa relação massa-volume, e não possibilita um controle efetivo do tamanho dos mesmos. Posteriormente o crescimento destes materiais foi realizado em matrizes sintetizadas pelo processo sol-gel. Os reagentes eram difundidos e precipitados dentro de poros umidecidos com géis, sendo o tamanho e a distribuição dos nanocristais controlados pelo tamanho dos poros (Ari *et al.*, 1989). Em 1996, meios organizados com surfactantes foram utilizados como moldes ou nanorreatores para controlar o tamanho dos nanocristais. Apesar de ainda ser bastante utilizada, esta técnica apresenta o inconveniente de produzir nanopartículas com baixa cristalinidade, uma vez que as reações não são realizadas em altas temperaturas, produzindo materiais com baixos valores para seus rendimentos quânticos luminescentes (Silva *et al.*, 2010; Ingert, 2001). O método de síntese proposto por Murray *et al.* (1993) representou um avanço importante uma vez que foi possível produzir nanopartículas cristalinas com distribuição estreita de tamanho e com rendimento quântico luminescente de até 80% e estáveis quimicamente. A qualidade dos nanocristais formados a partir deste método é decorrente da rápida injeção dos precursores organometálicos, como o dimetilcádmio aos solventes coordenantes, como óxido de trioctilfosfina (TOPO) e o agente estabilizante trioctilfosfina (TOP), em alta temperatura (Silva *et al.*, 2010; Donegá *et al.*, 2005), o que resulta num processo de nucleação instantânea, reduzindo a concentração de reagentes e limitando a probabilidade de ocorrência de novas etapas de nucleação. Os solventes coordenantes utilizados envolvem as superfícies dos nanocristais, estabilizando-as devido à formação de uma camada hidrofóbica que atua como uma barreira à agregação demasiada e irreversível das nanopartícula (Martins *et al.*, 2012), mantendo-os numa escala nanométrica. No entanto, no método proposto por Murray os QDs formados são praticamente insolúveis em meio aquoso, sendo por isso, incompatíveis com sistemas biológicos, o que

limita seu uso em aplicações biomédicas. Além disso, este método de síntese com rota organometálica requer precursores extremamente tóxicos, pirofóricos, solventes orgânicos e temperaturas de reação muito elevadas (Silva *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 1993). A modificação da superfície desses pontos quânticos é uma saída para que os mesmos se tornem solúveis em meio aquoso (Silva *et al.*, 2010). Trocas de precursor, de agente passivante e substituição do solvente coordenante são alternativas que também têm sido usadas para minimizar as desvantagens dessa abordagem.

Mais recentemente, atenção tem sido dada aos procedimentos de síntese de semicondutores nanocristalinos em meio aquoso. Essa abordagem apresenta boa reprodutibilidade de síntese, menor custo, utiliza menor quantidade de insumos tóxicos e produz materiais facilmente dispersos em água. O primeiro método de síntese de QDs em meio aquoso foi desenvolvido por Rogash *et al.* (1996). A síntese é baseada na injeção de precursor calcogeneto em uma solução aquosa, contendo o precursor metálico, seguido por refluxo a cerca de 100 °C. Nesses sistemas, grupos funcionais, como tióis, polifosfatos ou aminas de cadeia curta, têm sido utilizados como ligantes, ou agentes estabilizantes, para diminuir os defeitos de superfície dos nanocristais e estabilizar as nanopartículas formadas (Matos, 2012). A partir de então, uma série de rotas de síntese de nanopartículas em meio aquoso têm sido descritas (Gaponik *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003a; Shavel e Gaponik, 2004) observando-se grandes progressos na obtenção de QDs solúveis em água com excelentes propriedades luminescentes. Os procedimentos de síntese em meio aquoso apresentam boa reprodutibilidade sintética, menor custo, são menos tóxicos e são capazes de produzir QDs solúveis em meio aquoso, facilitando a sua aplicação em sistemas biológicos (Viol *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2010). Apesar de apresentar inúmeras vantagens, o método de síntese coloidal em meio aquoso apresenta o inconveniente de produzir nanocristais mais polidispersos que os obtidos na síntese organometálica, além de materiais com rendimentos quânticos luminescentes relativamente baixos (na faixa de 38-67%) (Li *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2003b). Algumas técnicas têm sido propostas para amenizar o problema da polidispersão de tamanhos dos nanocristais obtidos pelo método coloidal em meio aquoso. As estratégias utilizadas são a dopagem dos nanocristais, e a utilização de processos de pós-preparo, como o tratamento fotoquímico (Li *et al.*, 2007), e a precipitação seletiva de tamanhos (Zhang *et al.*,

2003b). A precipitação seletiva se baseia na desestabilização e precipitação das partículas maiores em relação às menores dispersas no meio aquoso. Na medida em que as nanopartículas se agregam por forças de Van der Waals, elas crescem. Esse crescimento não é regular e as que atingem um tamanho maior podem ser precipitadas por centrifugação. A dopagem de semicondutores nanocristalinos consiste na introdução de pequenas impurezas na rede cristalina dos QDs (Silva, 2010). Como exemplo, tem-se a dopagem de semicondutores dos grupos II-VI da tabela periódica com íons Mn^{2+} , produzindo estabilidade e conferindo propriedades magnéticas aos QDs (Furdyna, 1988; Silva *et al.*, 2010). No processo de dopagem de QDs é necessário que os íons adicionados apresentem a mesma valência e possuam raios iônicos semelhantes ao íon hospedeiro para que o dopante não migre para a superfície do nanomaterial (Silva, 2010). Um exemplo de síntese de nanocristais com tratamento fotoquímico foi descrito por Lan *et al.* (2007). Neste trabalho foram sintetizadas nanopartículas de ZnSe, que foram irradiadas com luz UV. A irradiação do ZnSe capeada com tiol em solução aquosa aerada leva à formação de ZnSe(S), que possui maior rendimento quântico de fotoluminescência e perfil de banda de emissão mais estreito. Estratégias de síntese de nanocristais com estruturas do tipo caroço/casca (core/shell) também são utilizadas a fim de evitar a polidispersão dos nanocristais formados e aumentar a eficiência quântica luminescente como será discutido na seção seguinte.

1.5.4. Estrutura dos QDs e passivação da superfície

A razão entre a área superficial e o volume das nanopartículas é muito elevada em comparação aos materiais de escala de grandeza maior. Assim, a superfície da nanopartícula tem fundamental importância nas propriedades peculiares dos nanomateriais. Nos QDs essa relação faz com que os defeitos de superfície ou de cristalinidade exerçam papel fundamental no processo radiante, uma vez que podem criar níveis de energia mais profundos que fazem com que elétrons e/ou buracos fiquem presos temporariamente em “armadilhas” existentes no sólido, diminuindo a eficiência quântica luminescente dos QDs (Almeida, 2008). Portanto, para assegurar que o processo radiante seja eficiente, deve-se

minimizar tais armadilhas na estrutura da nanopartícula. Dos principais defeitos de superfície existentes, os mais comuns são os chamados “dangling bonds”, ou ‘ligações soltas’. Dentro do cristal, cada átomo de calcogênio (Se ou Te, por exemplo) ou de metal (Cd, em geral), mantém quatro coordenações com seus vizinhos. Já na superfície, a ausência de vizinhos faz com que estes átomos não tenham com quem se ligar, e seus elétrons fiquem presos temporariamente nas armadilhas existentes no sólido, diminuindo a eficiência fotoluminescente. O buraco ou o elétron foto-excitado também pode interagir com adsorbatos por meio de transferência de carga do tipo que ocorre em sistemas doador-aceitador (Cohen *et al.*, 1999). Isso produz alterações no tempo de vida da luminescência ou no rendimento quântico luminescente. Assim, pode ocorrer redução ou oxidação das moléculas adsorvidas na superfície do ponto quântico e o par elétron-buraco não se recombina. A passivação da superfície dos QDs é uma forma de diminuir o número dessas ‘ligações soltas’ na superfície dos nanocristais, protegendo o núcleo da estrutura de sofrer oxidação, além de aumentar a fotoestabilidade da nanopartícula e melhorar o seu rendimento quântico (Samir *et al.*, 2012; Alivisatos *et al.*, 2005).

A forma mais comum de passivação consiste em usar um passivante orgânico, que também funciona como estabilizante das nanopartículas na dispersão coloidal (Almeida, 2008). Este processo de passivação orgânica da superfície dos QDs consiste no recobrimento dos átomos da superfície com diferentes adsorbatos que podem ocupar os sítios coordenados livres na superfície dos QDs (Nose *et al.*, 2006). A passivação orgânica possibilita a bioconjugação e a obtenção de suspensões coloidais mais monodispersas. Geralmente os ligantes mais usados são os fosfenos (TOPO) e os mercaptanos (SH-) (da Silva, 2013; Michalet *et al.*, 2005). Um estudo realizado por Acar *et al.* (2009), mostrou que o uso do ácido mercaptopropiônico (2MPA) como ligante de recobrimento dos QDs aumenta a sua fotoestabilidade e a sua intensidade de sinal luminescente por diminuir os defeitos de superfície dos QDs (Carvalho *et al.*, 2013). Os QDs podem ser modificados posteriormente pela adição de diferentes grupos funcionais (Gao *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2003a) nos sítios disponíveis da superfície dos mesmos, gerando novos capeamentos para o nanocristal e adicionando funcionalidade à eles. A presença de diferentes moléculas próximas da superfície dos QDs pode ocasionar mudanças nas suas

propriedades luminescentes, o que possibilita o uso destes com fins analíticos. Para tal, o ligante deve conter um grupo funcional com alta afinidade pela superfície da nanopartícula como exemplo, grupo tiol e outro grupo funcional como carboxilato. Alguns exemplos de ligantes podem ser citados, como L-cisteína e ácido mercaptoacético (Galian e De La Guardia, 2009). Estes ligantes também possuem grupos que interagem com os analitos de interesse, modificando as propriedades luminescentes da nanopartícula. Os dois grupos funcionais do ligante, o que se liga aos QDs e o que interage com o analito de interesse, são separados por uma cadeia alquila. Analitos contendo grupos funcionais nas suas estruturas podem também se ligar diretamente aos sítios disponíveis da superfície do QDs, alterando suas propriedades luminescentes (Ramanery, 2012).

A estrutura do tipo caroço/casca é formada por uma combinação de dois semicondutores diferentes, onde o caroço é recoberto por uma camada externa contendo outro semicondutor (casca) (Silva *et al.*, 2010). Por exemplo, a passivação pode ser obtida com o crescimento de uma camada de material inorgânico (casca) em volta dos QDs cujo bandgap de energia é maior que a dos QDs do caroço (Peng *et al.*, 1997; Nirmal e Brus, 1999). A deposição de uma camada semicondutora de espessura suficientemente grande (por exemplo, de ZnS) na superfície dos QDs (por exemplo de CdTe) faz com que buracos e elétrons fiquem fortemente confinados na região do caroço. Isto ocorre porque o semicondutor da casca separa fisicamente a superfície ativa do semicondutor do caroço do meio reacional, o que provoca uma diminuição dos defeitos de superfície (Silva *et al.*, 2010), assim o decaimento radiante é a única opção para o sistema perder energia (Alivisators *et al.*, 2005). Isto resulta no aumento da luminescência dos QDs devido à supressão da recombinação não-radiante.

1.5.5. Toxicidade dos QDs

A toxicidade dos QDs, em especial daqueles contendo Cd, Pb e As, é provavelmente a mais importante limitação para as aplicações *in vivo*. Como não há muitos estudos toxicológicos, existem várias discrepâncias sobre este tema. (Galian e De La Guardia, 2009). A toxicidade dos QDs depende de diferentes

fatores que vêm de propriedades como tamanho, concentração, estabilidade da nanopartícula, natureza e funcionalidade do ligante capeante. As mesmas características que tornam os QDs atraentes, do ponto de vista de aplicação tecnológica, podem ser indesejáveis quando liberadas no meio ambiente, uma vez que as pequenas dimensões dos nanocristais facilitam a sua difusão e transporte na atmosfera, em águas e em solos, e dificulta sua remoção por técnicas usuais de filtração. Isso pode também facilitar a entrada e o acúmulo de nanopartículas em células vivas (Quina, 2004). Devido a sua alta razão superfície-volume, as nanopartículas são mais propensas a sofrer decomposição parcial e liberar íons. Como são muito pequenos, eles podem ficar na superfície das membranas celulares ou retidas no interior das células, causando efeitos prejudiciais. Os revestimentos superficiais dos pontos quânticos, com uma camada de sílica, por exemplo, são indicados como alternativas para reduzir a toxicidade destes materiais, evitando que se liberte o material tóxico do núcleo (Cachetas, 2013).

1.5.6. Uso dos QDs em detecções analíticas

Conforme descrito, as propriedades dos pontos quânticos podem ser modificadas facilmente pela presença de ligantes de recobrimento (capeamento). Isso significa dizer que até certo ponto é possível ajusta-las de acordo com as necessidades requeridas para uma dada aplicação. A presença de diferentes ligantes na superfície dos QDs pode alterar consideravelmente suas características habilitando o uso dessas nanopartículas semicondutoras em aplicações analíticas diversas (Chen e Rosenzweig, 2002).

Os sensores baseados no uso de QDs como sondas funcionam em função das variações da resposta fotoluminescente das nanopartículas na presença de um determinado analito. A interação analito-QDs pode proporcionar ganho de sinal (aumento na intensidade da fotoluminescente) ou sua supressão (quenching) que diminui a fotoluminescência dos QDs após interação com um analito. A supressão da fotoluminescência dos QDs em função da interação com outra espécie química é a abordagem analítica quantitativa mais comum quando se utiliza QDs como sondas analíticas.

1.6. Processos de supressão de luminescência

Os processos de supressão de luminescência dizem respeito a quaisquer eventos que provocam a diminuição da intensidade da luminescência produzida por um luminóforo. Uma variedade de processos pode resultar na diminuição de sinal emitido por um luminóforo na presença de uma espécie supressora. Como exemplo pode-se citar os rearranjos moleculares, o efeito filtro, a transferência de energia (long range quenching), colisão (supressão dinâmica de luminescência ou quenching dinâmico) e formação de complexos não luminescentes (supressão estática de luminescência ou quenching estático) (Lakowicz, 2006).

No efeito filtro (ou dark quenching), parte da radiação de excitação é absorvida por uma espécie química presente no meio onde se encontra o luminóforo, diminuindo a quantidade de fótons incidentes disponíveis para a excitação do luminóforo. A magnitude desse efeito é até certo ponto proporcional à quantidade da espécie química absorvedora e requer total ou parcial sobreposição entre a banda de absorção da espécie química que absorve radiação e o perfil de excitação do luminóforo.

Em ambos, quenching estático e quenching dinâmico, o contato entre a espécie supressora e o luminóforo ocorre. O quenching dinâmico caracteriza-se pela colisão entre a espécie supressora e o luminóforo durante o tempo de vida deste no estado excitado. Após o contato, o luminóforo retorna para o estado fundamental, sem emitir fótons já que a energia para tal foi transferida para a espécie supressora na colisão. Em geral, esse tipo de supressão ocorre sem qualquer alteração na estrutura química das espécies envolvidas no processo, isto é, não há reação química. Já no quenching estático, ocorre a formação de um complexo estável e não luminescente entre a espécie supressora e o luminóforo. A magnitude de ambos os tipos de supressão de fotoluminescência guarda relação de proporcionalidade com a quantidade da espécie supressora presente no meio onde o luminóforo se encontra. Em ambos os casos a capacidade de difusão da espécie supressora no meio onde ocorre o processo é importante.

A supressão de luminescência pode ser descrita por diferentes modelos, por exemplo, os de Langmuir, mas o modelo mais comum é o previsto pela equação de Stern-Volmer (Equação 6).

$$L_0/L = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q] \quad (6)$$

Onde L_0 e L são as intensidades de luminescência da sonda respectivamente na ausência e na presença da espécie supressora Q ; k_q é a constante de supressão bimolecular; τ_0 é o tempo de vida do luminóforo na ausência de Q ; $[Q]$ é a concentração de Q no meio onde se encontra o sensor. A constante de supressão de Stern-Volmer é dada por $K_{SV} = k_q\tau_0$. O gráfico que relaciona a razão L_0/L em função de $[Q]$ é linear, a inclinação da curva fornece o valor de K_{SV} e a intersecção da curva com o eixo das ordenadas ocorre idealmente em 1.

A natureza da supressão de luminescência pode ser avaliada pelas curvas de decaimento (e medições de tempo de vida) da luminescência da sonda na presença e ausência da espécie supressora. Quando as curvas mostram decaimentos luminescentes similares, e por consequência, os mesmos tempos de vida para a sonda independentemente da presença da espécie supressora, o quenching é do tipo estático. Isso se deve ao fato da interação entre o supressor e a sonda não afetar a população que se encontra no estado excitado. Caso contrário, quando o tempo de vida de decaimento da luminescência diminui na presença da espécie supressora, o quenching é do tipo dinâmico. Outra abordagem para se distinguir o tipo do quenching de luminescência é pela avaliação da variação da inclinação da curva de Stern-Volmer (o valor de K_{SV}) em função da temperatura do meio onde se dá a interação entre a sonda e a espécie supressora. Temperaturas mais elevadas desfavorecem a formação do complexo não luminescente entre a sonda e a espécie supressora, assim, no quenching do tipo estático, o aumento da temperatura reduz a estabilidade do complexo formado resultando na redução de K_{SV} . Em contrapartida, maiores temperaturas resultam em maior coeficiente de difusão da espécie supressora no meio, logo o valor de K_{SV} aumenta quando o quenching é do tipo dinâmico (Yang *et al.*, 2012).

Para se efetivamente descartar a possibilidade da diminuição de luminescência da sonda por causa de efeito de filtro, a contribuição dos coeficientes de absorção do meio deve ser considerada. Esse efeito de filtro interno é muitas vezes ignorado nos modelos de supressão usados para a quantificação de analitos. Quando existe no meio uma espécie química que

absorve a radiação de excitação ou a radiação emitida pela sonda, o modelo de Stern-Volmer corrigido deve levar em consideração os coeficientes de absorção como indicado na Equação 7 (Van De Weert, 2010).

$$L_{\text{cor}} = L_{\text{obs}} \times 10^{(A_{\text{exc}} + A_{\text{emis}})/2} \quad (7)$$

Onde L_{obs} e L_{cor} são as intensidades da fotoluminescência da sonda antes e depois da correção do efeito filtro, A_{exc} e A_{emis} são os valores das absorvâncias medidas nos comprimentos de onda de emissão e de excitação escolhidos para a sonda.

Como a fotoluminescência dos QDs é muito sensível às variações na sua superfície, é razoável esperar que a interação química ou física entre uma determinada espécie química e a superfície da nanopartícula resulte em mudanças na eficiência de recombinação do núcleo elétrons-buraco (Moore e Patel, 2001). Como esse efeito pode ser dependente da concentração da espécie supressora, a sua utilização no ponto de vista analítico é evidente. A primeira utilização dos QDs como sensor seletivo para íons foi relatada em 2002, onde QDs capeados com L-cisteína e tioglicerol foram utilizados para a detecção de Zn^{2+} e Cu^{2+} em amostras biológicas. QDs de CdS revestidos com tioglicerol foram sensíveis apenas aos íons Cu^{2+} e Fe^{2+} , enquanto que os QDs de L-cisteína-CdS foram sensíveis aos íons Zn^{2+} . O modelo de Stern-Volmer descreveu eficientemente a dependência da concentração do íon Cu^{2+} da intensidade luminescente dos QDs de tioglicerol-CdS (Chen e Rosenzweig, 2002).

Embora menos comum, outra abordagem decorre do aumento da fotoluminescência da sonda de QDs após a interação com a espécie química de interesse. O ganho de fotoluminescência ocorre devido à passivação dos defeitos existentes na superfície dos QDs. Um mecanismo proposto para explicar o ganho de fotoluminescência ao se adicionar o analito na dispersão seria a supressão dos processos de decaimentos não radiativos após a interação com o analito (Galian e De La Guardia, 2009). Esta abordagem de ganho de fotoluminescência é mais interessante do ponto de vista analítico porque proporciona uma maior seletividade quando comparado com o processo de quenching e não ter sua sensibilidade limitada pela magnitude do sinal da sonda na ausência do analito.

Na Tabela 2 estão sumarizadas algumas utilizações de QDs como sondas fotoluminescentes para determinação de diversos analitos.

Tabela 2 – Exemplos de métodos analíticos desenvolvidos usando QDs como sensores.

Revestimento dos QDs	QDs	Analito	Tipo de efeito *	LD	Referência
TOPO	CdSe	Spirolactona	Q	0,2 mg/mL	Liang <i>et al.</i> , 2006
L-Cisteína	CdS	Ag ⁺	A	5 nM	Chen <i>et al.</i> , 2005
3 MPA	CdTe	Cu(II)	Q	0,19ng/mL	Bo <i>et al.</i> , 2005
L-Cisteína	CdS	Hg (II)	Q	2,4 nmol/L	Cai <i>et al.</i> , 2006
L-Cisteína	CdTe	Cardiolipina	Q	18,5 nmol/L	Zhao <i>et al.</i> , 2010
TGA	CdTe	Melamina	Q	0,04 mg/L	Zhang <i>et al.</i> , 2012
3MPA			Q	8 mmol/L	
	CdTe	Lapachol			Aucélio <i>et al.</i> , 2013
3MPA	CdTe	Roxitromicina	Q	4.6 µg/mL	Peng <i>et al.</i> , 2011
TGA	CdS	Sulfatiazina	Q	8.0 µmol/L	Liu, <i>et al.</i> , 2007
L-cisteína	ZnS	Acid nucleics	Q	0,5 mmol/L	Li <i>et al.</i> , 2004
TGA	CdS	Sulfadiazina	Q	8 mmol/L	Liu <i>et al.</i> , 2008
Hexametáfosfato	CdS	Acido urico	Q	0,1 ng/mL	Han <i>et al.</i> , 2009
		Teteraciclina e oxitetraciclina		5nM	
TGA	CdS	oxitetraciclina	Q	10 nM	Zhao <i>et al.</i> , 2013
Glutaciona	CdTe	acido elagico	Q	0,093 µg/mL	Shen <i>et al.</i> , 2013
					Molina-Garcia <i>et al.</i> , 2013
MPA	CdTe	Cetoprofeno	Q	2,3 µg/mL	

*Q se refere à supressão de fotoluminescência e A se refere a aumento de fotoluminescência.

1.7.

Cromatografia em camada fina

A cromatografia em camada fina ou delgada (do inglês *Thin Layer Chromatography* ou TLC) foi uma das primeiras abordagens cromatográficas para isolar espécies químicas em uma amostra complexa. De sua inicial natureza qualitativa e preparativa, a TLC evoluiu como técnica quantitativa de capacidade ultra traço (determinação de traço de analito em uma microamostra) com a utilização de sistemas de detecção por fluorescência, refletância, densimetria e Raman. A técnica de separação se baseia na migração diferencial dos componentes da mistura devido às diferentes interações entre a fase móvel e a fase estacionária disposta na forma de uma camada fina de material sólido. Exemplos mais comuns de fase estacionária são placas contendo alumina e a

sílica gel, este último material é o mais utilizado na TLC (Gocan, 2002). O sucesso da separação de uma mistura complexa vai depender da escolha do tipo de fase estacionária em relação às propriedades dos analitos. Por exemplo, a sílica é uma substância polar, portanto quanto maior o caráter polar do analito, maior será sua retenção na sílica, requerendo para a sua eluição uma fase móvel muito polar.

A identificação inicial da zona (mancha) de um composto específico na placa pode ser feita por meio da presença de um indicador colorimétrico ou fluorescente e com a ajuda da avaliação comparativa de migração de padrões adicionados à placa. Cada analito adicionado na placa, após certo tempo em contato com a fase móvel, migra a uma distância específica que é definida pelo fator de retenção (valor de R_f) que é a razão entre a distância percorrida pela zona do analito e a distância percorrida pela frente do solvente. Embora simples, a capacidade da técnica para a separação de componentes de estrutura similar é muito boa. Isso aliado à sua simplicidade pode trazer grandes benefícios do ponto de vista analítico.

A separação de componentes por TLC é muito adequada para a determinação quantitativa usando sondas dos QDs, já que o material de uma zona na placa pode ser facilmente raspado, extraído e adicionado na sonda de maneira muito simples e rápida. O potencial dessa abordagem foi demonstrada recentemente por Aucélio *et al.* (2013) onde a determinação seletiva de lapachol em extratos de planta na presença de derivados da beta-lapachona foi obtida com sucesso usando uma TLC com fase estacionária de sílica e sonda dos QDs de 3MPA-CdTe.

1.8. Contextualização

A utilização dos QDs como sensores fotoluminescentes para determinação de analitos de interesse têm crescido consideravelmente nos últimos anos devido a facilidade de métodos sintéticos para a sua obtenção, principalmente em meio aquoso, e a existência do forte confinamento quântico nos nanocristais que habilitam a utilização de métodos ópticos de análise. Uma característica fundamental para escolha das nanopartículas semicondutoras como sondas

consiste na flexibilidade de escolha dos comprimentos de onda de excitação, uma vez que, dependendo do tipo de sensor utilizado é possível escolher comprimentos de onda de excitação mais deslocados para o vermelho, de modo a eliminar interferências causadas por matrizes complexas e contribuições de efeito de filtro (que possa ser causado por algum analito de interesse). A simplicidade no manuseio das dispersões aquosas dos QDs e sua elevada estabilidade, quando acondicionados sob refrigeração ao abrigo da luz tornam os QDs potenciais fluoróforos para aplicações em química analítica.

Vislumbrando o potencial da utilização de nanosondas dispersas em meio aquoso, o Laboratório de Espectroanalítica e Eletroanalítica (LEEA) da PUC-Rio, a partir de 2009, tem dedicado parte de seus esforços em pesquisa no desenvolvimento de abordagens analíticas que tiram vantagem da nanotecnologia, em especial ao uso das propriedades fotoluminescentes dos QDs e das propriedades ópticas de nanopartículas de ouro. A presente Tese é resultado de parte desse esforço que já rendeu uma dissertação, uma Tese e um projeto de pós-doutoramento que gerou três artigos publicados e quatro outros submetidos além de várias comunicações de congresso.