

4

Resultado e Discussão: Determinação de Rutina com a sonda dos QDs de 2MPA-CdS

Os QDs de 2MPA-CdS foram sintetizados de acordo com o método descrito na literatura por Acar *et al.* (2009). Após a obtenção e caracterização das nanopartículas, experimentos foram realizados para otimização do sinal analítico da sonda a fim de se obter resposta fotoluminescente estável e intensa, onde a variação no sinal analítico fosse a menor possível, em um intervalo de tempo adequado para realização das análises das amostras contendo rutina.

O sinal fotoluminescente da dispersão aquosa dos QDs de 2MPA-CdS sofreu supressão na presença de rutina quando esta estava presente na faixa de concentração entre $5,0 \times 10^{-6}$ e $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. A supressão de sinal analítico foi proporcional ao aumento da concentração de rutina presente na dispersão de trabalho. Assim, para se estabelecer uma correlação entre a variação de sinal fotoluminescente dos QDs e a concentração de rutina utilizou-se o modelo de Stern-Volmer com a correção dos valores de absorção do sistema para eliminar a contribuição de efeito de filtro interno. Testes com a enzima Horseradish peroxidase (HRP) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram realizados com as dispersões de trabalho na presença e na ausência de rutina com objetivo de aumentar a sensibilidade de resposta da sonda. Contudo os resultados não foram promissores, pois verificou-se a perda da estabilidade do sinal analítico da sonda na presença da rutina quando H₂O₂ e HRP encontravam-se presentes na dispersão de trabalho.

A sonda 2MPA-CdS foi utilizada para quantificação de rutina em amostras do medicamento Venocur Triplex (que contém 300 mg de rutina por cápsula), em amostras simuladas contendo rutina na concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e quercetina nas concentrações de $1,0 \times 10^{-5}$ e $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ após separação por TLC, e em amostras de saliva fortificadas (contendo rutina na concentração de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹). Nas amostras simuladas utilizou-se a abordagem de TLC para separar e isolar rutina de quercetina e assim se alcançar a seletividade do método. Um teste estatístico (t de Student) foi realizado para comparar os resultados das

dosagens obtidas pelo método proposto com aqueles obtidos com um método da literatura (HPLC), e os resultados indicaram que não houve diferença significativa entre eles. A Tabela com os valores de t_{tabelado} estão representados no Anexo 1.

4.1. Caracterização dos QDs de 2MPA-CdS

A caracterização dos QDs de 2MPA-CdS foi feita pela comparação dos perfis de fotoluminescência e de absorção obtidos do material sintetizado com os descritos na literatura. Na Figura 11A é mostrado o espectro de emissão fotoluminescente de uma dispersão aquosa de 2MPA-CdS na concentração de $5,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ com a excitação feita em 387 nm (λ_{exc}). Observou-se que o comprimento de onda máximo de emissão (λ_{em}) foi de 498 nm para essa dispersão, com um valor de largura da banda na meia altura (FWHM) de 125 nm. O espectro de absorção dessa mesma dispersão dos QDs de 2MPA-CdS (na concentração de $5,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$), mostrado na Figura 11B, apresentou um perfil bem característico, no qual o comprimento de onda referente à absorção do primeiro pico do excitônico foi encontrado em 356 nm.

A obtenção do perfil de absorção da dispersão foi fundamental para estimativa do diâmetro médio das nanopartículas e da sua concentração. Como mencionado, estes podem ser obtidos a partir de equações descritas por Yu *et al.*, (2003) onde D, que equivale ao diâmetro das partículas. Os cálculos foram feitos utilizando-se a Equação 3, sendo λ o comprimento de onda máximo de absorção do primeiro excitônico (Yu *et al.*, 2003). Para os QDs de 2MPA-CdS sintetizados, o diâmetro médio calculado foi de 2,2 nm.

A concentração das nanopartículas de 2MPA-CdS na dispersão aquosa sintetizada foi estimada a partir do valor de absorvância, no primeiro pico do excitônico, e do coeficiente de extinção, calculado a partir da Equação 4 (descrita anteriormente) considerando-se o diâmetro médio de 2,2 nm. Substituindo-se esses valores na equação de Lambert-Beer, onde o caminho óptico foi de 1 cm, e considerando-se os fatores de diluição, obteve-se uma estimativa de concentração de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para a dispersão obtida na síntese e de $5,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ para a dispersão diluída usada nessa etapa da caracterização.

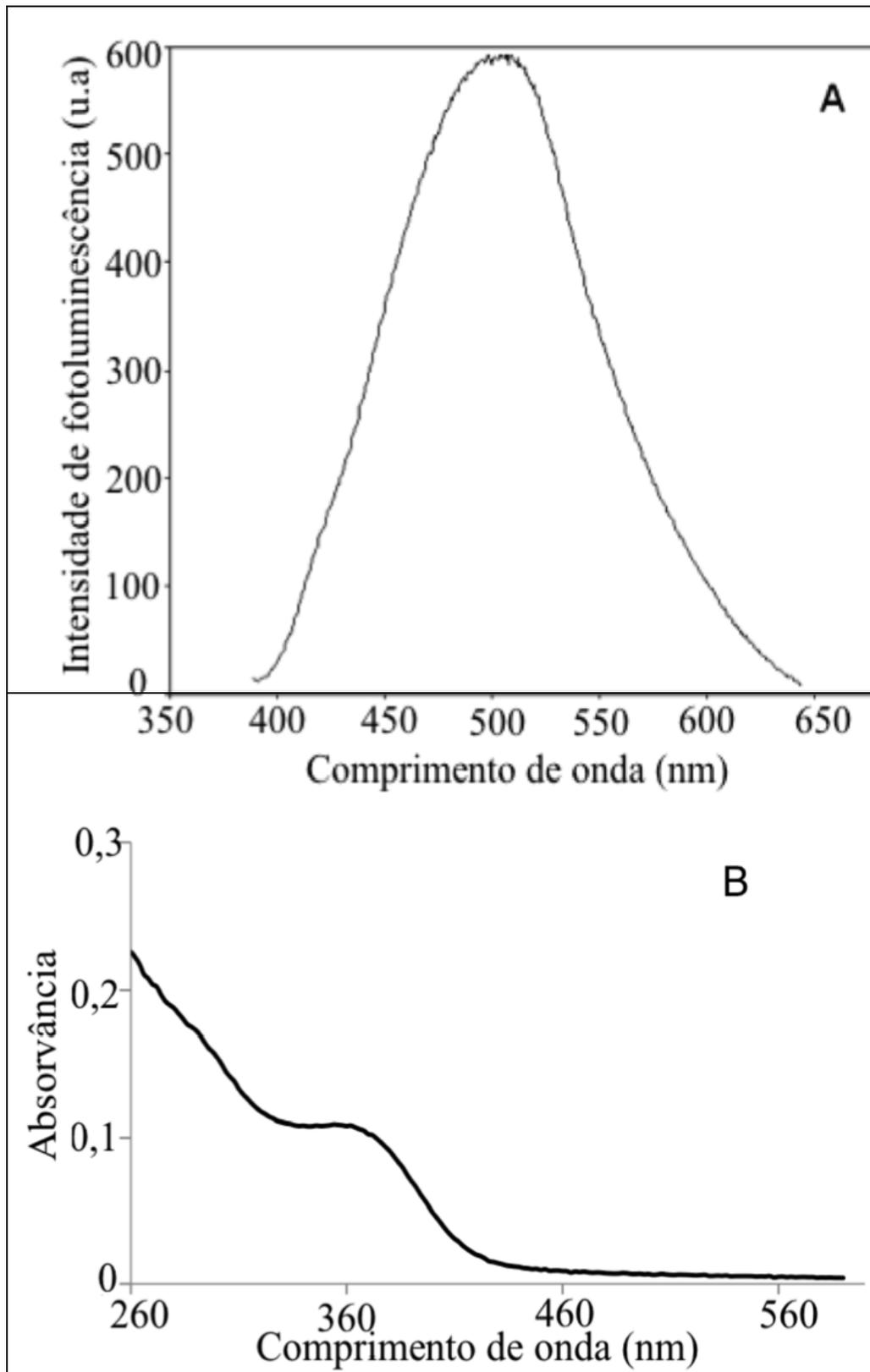


Figura 11 - Espectros da dispersão aquosa dos QDs de 2MPA-CdS ($5,0 \times 10^{-9}$ mol L $^{-1}$): (A) Fotoluminescência e (B) Absorção.

Conforme descrito, o rendimento quântico dos QDs de 2MPA-CdS foi obtido pela abordagem comparativa com uma solução padrão luminescente (com eficiência quântica conhecida), no caso a rodamina B. O gráfico que relaciona a intensidade de fotoluminescência com a absorvância integrada dos QDs e do padrão é mostrado na Figura 12. A partir desses dados, a eficiência quântica de 47% foi obtida para o QDs.

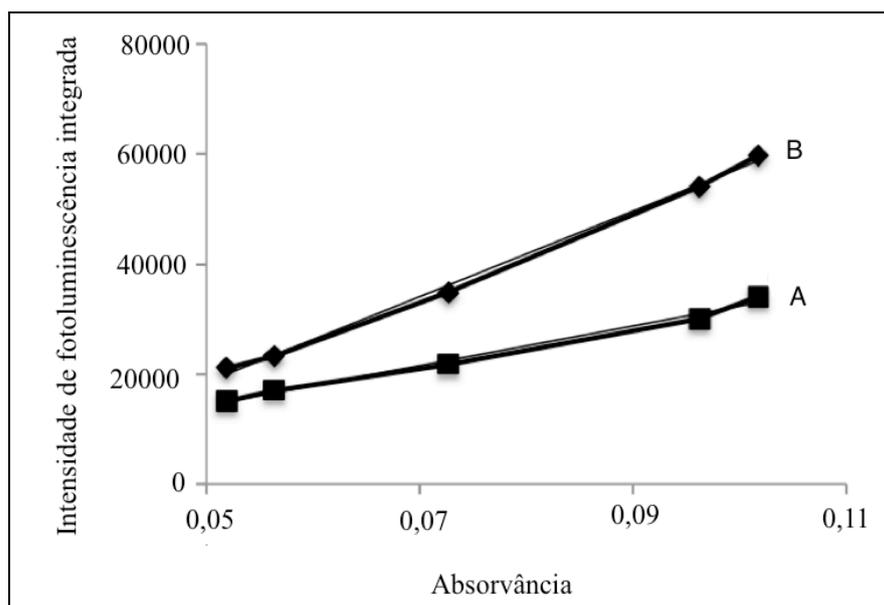


Figura 12 - Intensidade de fotoluminescência em função da absorvância integrada dos QDs de 2MPA-CdS (A) e rodamina B (B).

Sabe-se que o revestimento das nanopartículas com ligantes orgânicos produz uma melhora na estabilidade da dispersão aquosa e nas características luminescentes, pois eles promovem uma proteção na superfície dos QDs, retardando a foto-oxidação. Dados da literatura indicam que nanopartículas de CdS revestidas com 2MPA apresentam rendimento quântico de até 54% e tempo de vida de estocagem três vezes maior quando comparados com nanopartículas de CdS revestidas com o ligante 3MPA. Acar *et al.* (2009) justificaram essa diferença com cálculos de modelagem que indicaram que o 2MPA promove um revestimento mais eficaz na superfície do CdS, devido a menor distância de ligação entre os átomos do ligante e os átomos de superfície da esfera das nanopartículas.

Na Figura 13 estão as imagens das dispersões dos QDs de CdS revestidos com 2MPA sob luz visível (Figura 13A) e sob luz UV (366 nm) (Figura 13B), onde é possível observar sua fotoluminescência.

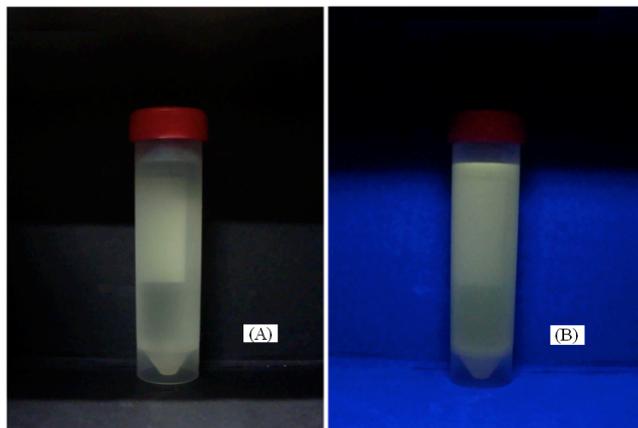


Figura 13 – Dispersão dos QDs de 2MPA-CdS sob luz visível (A) e sob luz UV (B)

4.2.

Otimização das condições para realização das medições de fotoluminescência.

Um estudo sistemático de parâmetros experimentais foi realizado para se encontrar as condições adequadas para a obtenção de um sinal fotoluminescente estável e intenso dos QDs de 2MPA-CdS dispersos em meio aquoso, de forma que a resposta da sonda frente à presença de rutina fosse sensível e reprodutível. Primeiramente, foi necessário escolher o volume da dispersão estoque dos QDs de 2MPA-CdS a ser usada na dispersão de trabalho (sonda). Foram testadas diversas aliquotas da dispersão estoque de 2MPA-CdS em meio aquoso (Figura 14), dentre elas a que proporcionou um sinal fotoluminescente intenso e dentro da escala do instrumento (de aproximadamente 670 u.a) foi a de 60 μL (dispersa em meio aquoso, em um volume total de 10,00 mL), equivalente a uma concentração estimada de $6,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. Desse modo, a sensibilidade da diminuição de fotoluminescência pode ser amplificada sem que ocorra a saturação da sonda. Em todos os parâmetros de otimização avaliados foi aplicado a média dos resultados obtidos de três análises realizadas.

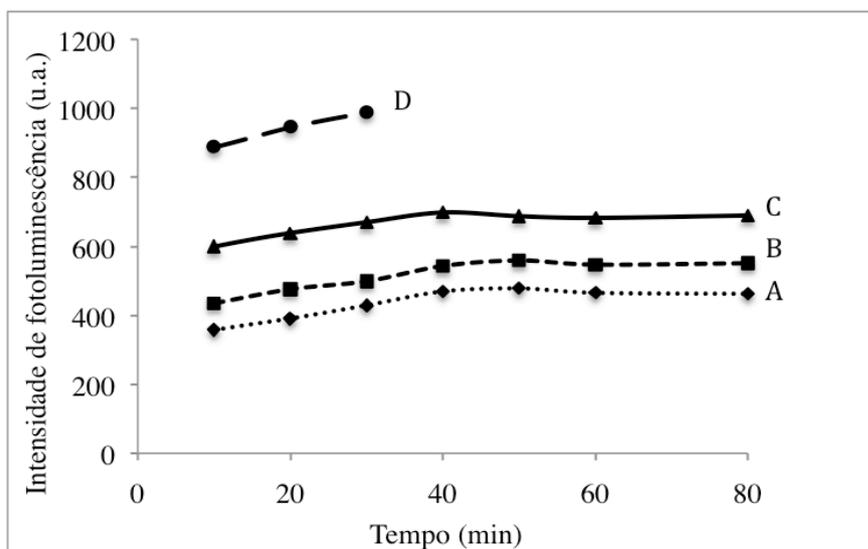


Figura 14 – Intensidade fotoluminescente da dispersão dos QDs de 2MPA-CdS em função da quantidade adicionada de dispersão estoque ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), a uma solução contendo 1,0 mL tampão Tris $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 e água para um volume total de 10,00 mL: (A) 30; (B) 40; (C) 60 e (D) 100 μL .

Em seguida, foi realizado um estudo para avaliar o efeito da presença de alguns tampões no sinal analítico original da sonda de trabalho, de modo a proporcionar a melhor estabilidade do sinal e permitir a manutenção do pH do meio quando da adição da solução de amostra. Essa manutenção do pH da dispersão de trabalho é crucial, pois a intensidade da fotoluminescência da sonda, assim, como a sua estabilidade são afetadas por esse parâmetro. Nessa etapa foram testados os tampões fosfato (pH 6,5), Tris (pH 7,4) e borato (pH 8,5) na concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. A escolha inicial do pH e da concentração do tampão foi feita com base em artigos publicados na literatura que indicavam estes valores como as condições de trabalho (Han e Zhao, 2009) usando tampão fosfato e tampão Tris (Cai *et al.*, 2006).

Como pode ser observado na Figura 15, as intensidades de fotoluminescência emitidas pelas sondas contendo tampão fosfato e tampão borato produziram um aumento sistemático da magnitude do sinal em função do tempo (ao longo dos 80 min de duração do estudo), tornando o sinal da sonda inadequado para a realização de medições confiáveis. Já para o sistema contendo o tampão Tris a estabilização do sinal da sonda foi obtida após cerca de 30 min do preparo da dispersão, o que se mostrou adequado para o monitoramento quantitativo. Além disso, a variação máxima do pH do meio foi de 0,06 unidades

após a adição de alíquotas da solução estoque de rutina $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, o que garante que a queda proporcional de sinal analítico da sonda fosse decorrente da presença do flavonóide e não referente a variação significativa no valor do pH.

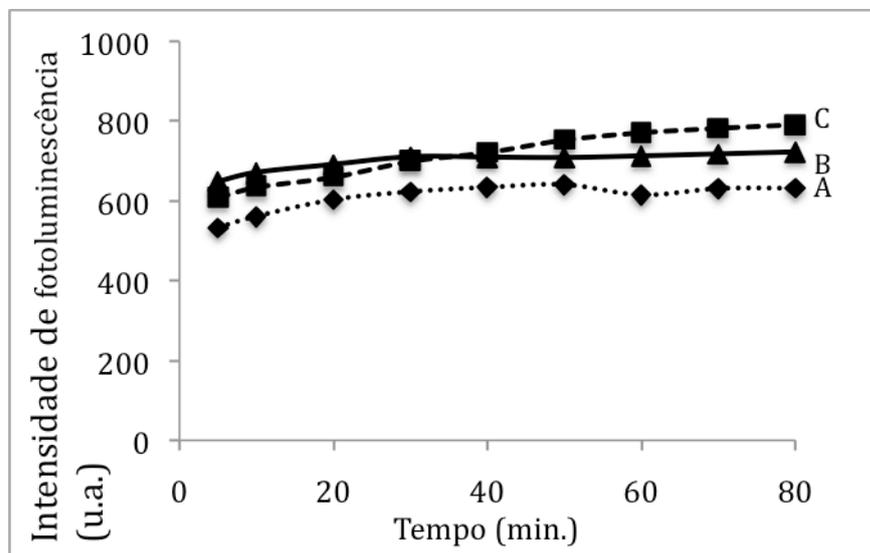


Figura 15 - Efeito da presença dos tampões (A) borato, (B) tris e (C) fosfato, na intensidade da fotoluminescência da dispersão aquosa dos QDs de 2MPA-CdS. Condições: $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ tampão, $6,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ 2MPA-CdS, 1,0 mL acetonitrila, 2,0 mL metanol e água para 10,00 mL.

Com a escolha do tampão Tris para fazer parte da composição da dispersão de trabalho, foi necessário estudar o efeito do valor do pH da dispersão de modo que preferencialmente se encontrasse uma faixa robusta onde se obtivesse sinal analítico estável e intenso. Foi verificado que em sistemas com valores de pH 5,0 e 6,0 (ajustados pela adição de HCl), a fotoluminescência da sonda diminuiu consideravelmente, provavelmente devido à remoção da camada de ligante da superfície dos QDs por causa da protonação do grupo tiol. Essa remoção do 2MPA diminui a eficiência quântica dos QDs e os desestabiliza no sistema aquoso. Entretanto, em dispersões coloidais com valores de pH entre 7,0 e 8,0 o sinal da sonda foi intenso e praticamente constante, mostrando a robustez da faixa de pH estudada. Nessas condições, a fotoluminescência mostrou-se estável entre 40 e 80 min (tempo máximo de monitoramento de sinal). Com isso, na faixa de pH entre 7,1 e 7,5 (próximo do pH fisiológico) a fotoluminescência foi estável sendo essa escolhida para a sonda. Em sistemas com pH ajustados para 7,4, três concentrações do tampão Tris (1,0 mL de tampão $0,01$; $0,02$ ou $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em

um volume final 10,00 mL da dispersão de trabalho), foram avaliadas e um aumento na intensidade do sinal dos QDs foi observada para a concentração de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Era de se esperar uma melhor resposta analítica do sinal da sonda de 2MPA-CdS ao se utilizar uma menor concentração do tampão fosfato, o que proporcionaria uma menor força iônica e diminuiria a possibilidade de agregação das nanopartículas. No entanto, neste caso, um aumento de fotoluminescência de cerca de 15% foi obtido ao se utilizar uma maior concentração do tampão Tris ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$). A estabilidade em função do tempo do sinal fotoluminescente da sonda constituídas por QDs de 2MPA-CdS foi praticamente a mesma para as três concentrações do tampão Tris testadas (Figura 16). Maiores concentrações do tampão não foram avaliadas devido ao grande aumento da força iônica na dispersão de trabalho, o que aumentaria a possibilidade de desestabilização do sistema coloidal.

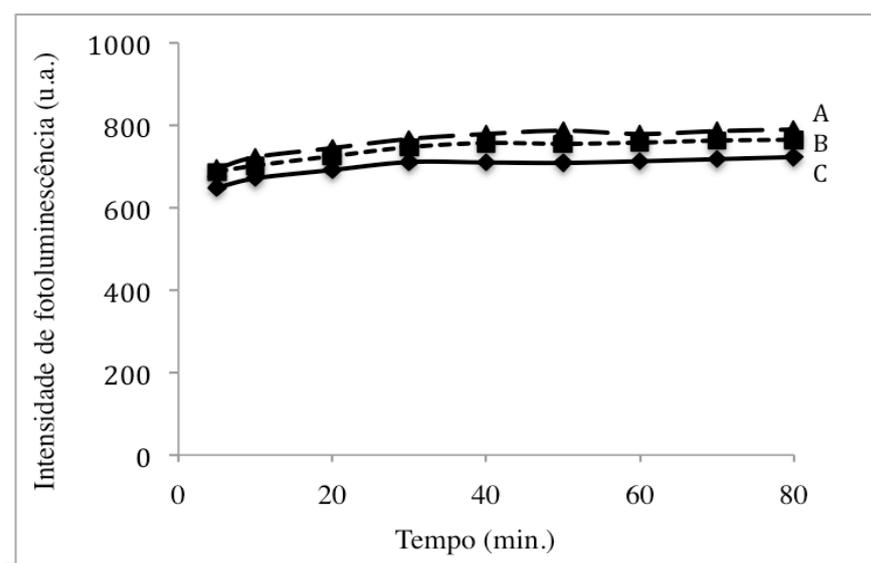


Figura 16 - Influência da concentração do tampão Tris ((A) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$; (B) $0,02 \text{ mol L}^{-1}$; (C) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$) na intensidade fotoluminescente de $6,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ 2MPA-CdS.

Como os flavonóides geralmente apresentam baixa solubilidade em água, a introdução de uma fração de solvente orgânico foi necessária a fim de garantir a completa dissolução da rutina nas dispersões de trabalho. Assim, o efeito da presença dos solventes metanol e acetonitrila na composição da dispersão de trabalho foi avaliada. A incorporação de 1,0 ou 2,0 mL (10 ou 20% em proporção de volume final) de metanol não afetou a intensidade da fotoluminescência e nem

sua estabilidade (Figura 17, linhas f e e). Com 3,0 mL de metanol (30% em volume) ou com 1,0 mL (10% em volume) de acetonitrila, um aumento do sinal analítico da sonda foi observado (Figura 17, linhas c e d), entretanto, a melhor condição (Figura 175, linhas a e b) foi alcançada com misturas de metanol e acetonitrila. Portanto, a condição escolhida para a análise foi 2,0 mL de metanol e 1,0 mL de acetonitrila (um total de 30%, em volume de solvente orgânico). Essa condição promoveu um aumento no sinal analítico e excelente estabilidade (variação aleatória com desvio padrão relativo abaixo de 1,2%). Maiores volumes de solvente orgânico não foram testados devido à possibilidade de precipitação das nanopartículas.

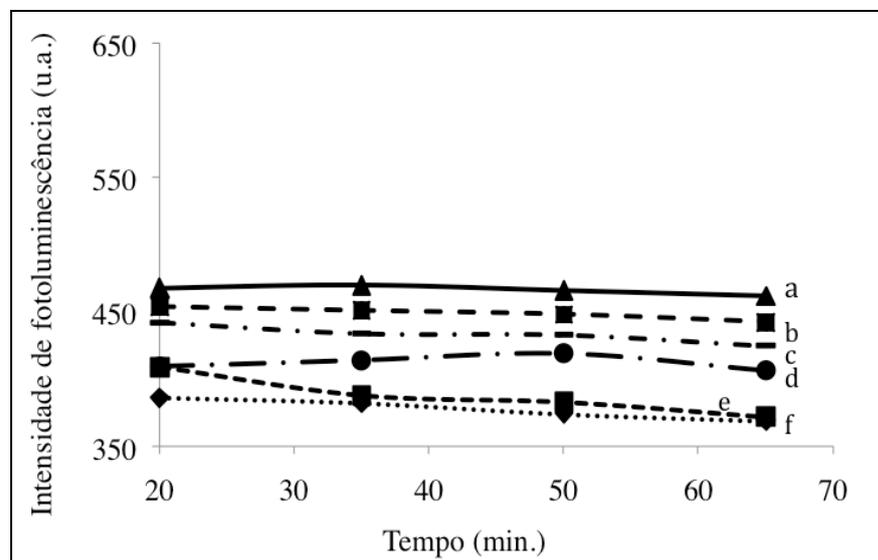


Figura 17 - Efeito da presença de solventes orgânicos (em 10,00 mL de volume total de dispersão) na fotoluminescência da dispersão de trabalho dos QDs de 2MPA-CdS ($6,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$) contendo água, tampão Tris (pH 7,4; $0,05 \text{ mol L}^{-1}$) e (a) 2,0 mL metanol e 1,0 mL acetonitrila; (b) 1,0 mL metanol e 1,0 mL acetonitrila; (c) 3,0 mL metanol; (d) 1,0 mL acetonitrila; (e) 2,0 mL metanol; (f) 1,0 mL metanol.

4.3.

Fotoluminescência dos QDs de 2MPA-CdS na presença de H_2O_2 /HRP

Na presença de peróxido de hidrogênio/enzima horseradish peroxidase (H_2O_2 /HRP), compostos fenólicos promovem significativa atenuação da fotoluminescência dos QDs. Este fato foi constatado em um estudo realizado por Yuan *et al.* (2008) que mostraram que compostos fenólicos, como hidroquinona e dopamina, na presença de H_2O_2 e HRP, promoveram um eficiente supressão da

fotoluminescência dos QDs de CdTe, permitindo o alcance de limite de detecção para dopamina na faixa de 10^{-7} mol L⁻¹. Acredita-se que a quinona produzida a partir da oxidação enzimática destes compostos fenólicos provoca o efeito de supressão do sinal devido à subtração de elétrons dos QDs ficando indisponíveis para retornar para a BV e promover o decaimento radiante do sistema (Yuan *et al.*, 2008). Nas condições estabelecidas para a dispersão de trabalho, alíquotas de soluções $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de H₂O₂ e 5,0 µg/mL HRP foram introduzidos a fim de verificar se a oxidação da rutina, produzindo uma quinona, aumentaria a sensibilidade da resposta analítica de supressão.

A fim de garantir a reação entre HRP e rutina, uma certa quantidade de HRP é requerida no meio, para agir como catalisador. Sendo assim, foi investigado o efeito causado pela presença de H₂O₂ e HRP na fotoluminescência da sonda dos QDs de 2MPA-CdS. A concentração de H₂O₂ nas dispersões aquosas foi variada na faixa de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Os resultados obtidos indicaram uma diminuição de cerca de 22% na intensidade da fotoluminescência da dispersão dos QDs, em relação ao aumento da concentração de H₂O₂ presente, até a concentração de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Após esta concentração, o sinal da sonda permaneceu estável até a concentração final testada de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (Figura 18). Portanto, a concentração intermediária de $7,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ foi escolhida para dar continuidade aos testes, uma vez que essa pareceu ser uma condição robusta para a realização das medições de fotoluminescência da sonda na presença da rutina. Em seguida, foi avaliado o efeito causado pela enzima HRP na fotoluminescência da sonda. A concentração de enzima adicionada às dispersões aquosas dos QDs de 2MPA-CdS variou de 0,025 a 0,075 µg mL⁻¹ HRP (50 a 150 µL) sendo observada uma diminuição de 6% na intensidade da fotoluminescência da sonda referente ao aumento da concentração de enzima. Sendo assim, a concentração de 0,035 µg mL⁻¹ (70,0 µL) HRP presente na dispersão foi escolhida, uma vez que a diminuição na intensidade do sinal fotoluminescente da sonda foi de apenas 1,2%.

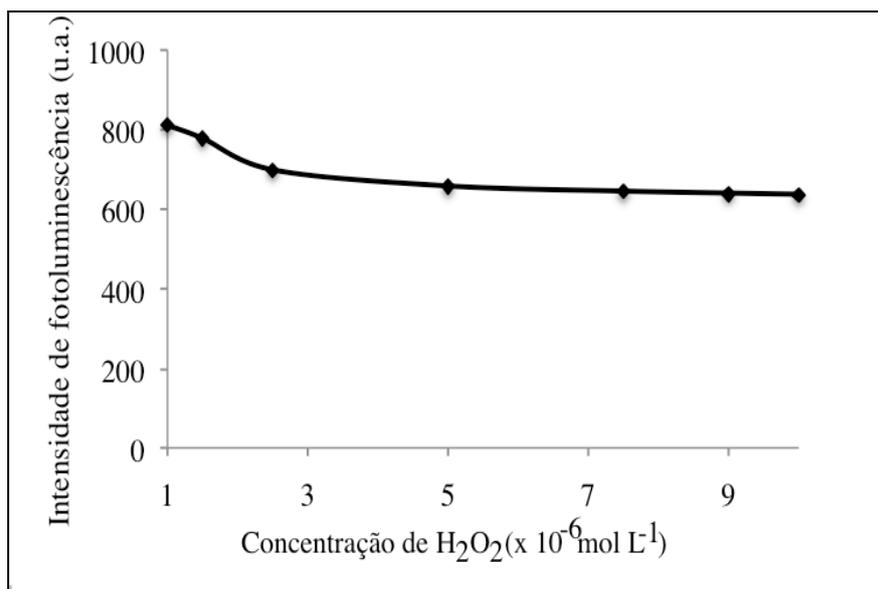


Figura 18 – Influência da concentração de H₂O₂ no sinal fotoluminescente da dispersão dos QDs de 2MPA-CdS.

As medições de fotoluminescência da sonda tamponada (pH 7,4) contendo H₂O₂/HRP foram realizadas a fim de se avaliar a estabilidade desse sistema na ausência e na presença de rutina. De acordo com o perfil mostrado na Figura 19, a fotoluminescência da sonda foi estável na ausência de rutina, no entanto, a intensidade do sinal na presença da rutina diminuiu com o tempo. Desse modo, o comportamento do sinal da sonda na presença de H₂O₂/HRP e rutina não permite obter medições quantitativas confiáveis para a determinação desse flavonóide. Portanto, o método foi desenvolvido sem a utilização do sistema H₂O₂/HRP.

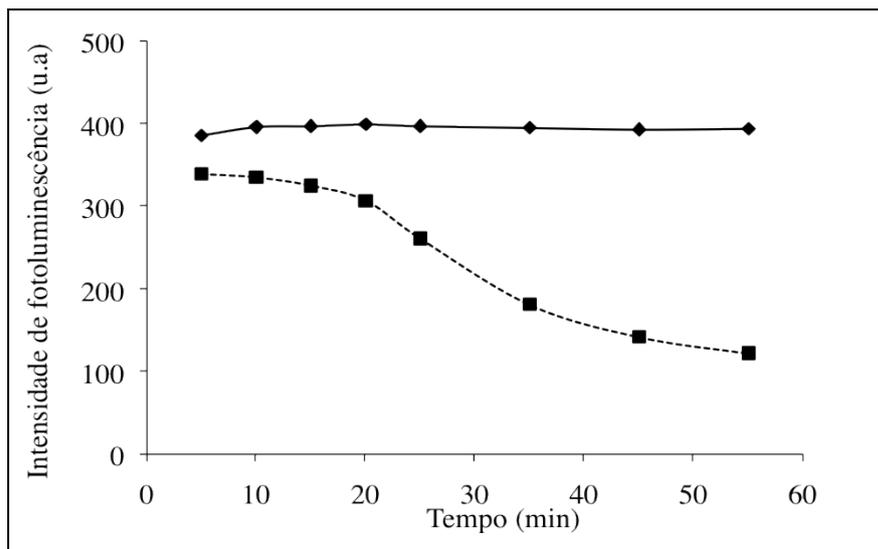


Figura 19 - Fotoluminescência da sonda dos QDs de 2MPA-CdS ($6,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$) contendo $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HRP}$ $7,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $0,035 \text{ }\mu\text{g/mL}$ na ausência (linha sólida) e na presença de rutina (linha pontilhada).

4.4.

Supressão de fotoluminescência e estudos de mecanismo de interação

O espectro de absorção da rutina apresenta uma banda de absorção entre 200 e 400 nm (Figura 20), sendo este perfil típico de compostos fenólicos. O perfil de absorção de rutina precisa ser considerado para uma criteriosa escolha do par $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ a ser utilizado na sonda, a fim de se eliminar a contribuição de efeito filtro provocado pelo analito. Esta escolha é necessária para que se tenha controle do fenômeno provocado pela diminuição de sinal fotoluminescente da sonda. No caso, pretendeu-se minimizar a diminuição de sinal provocada pela absorção de luz de excitação e garantir que a supressão de sinal fosse decorrente do processo de interação entre rutina e os QDs. Assim, foi escolhido para a excitação óptica o comprimento de onda de 387 nm, uma vez que esta escolha permite se obter a medição considerável de fotoluminescência em ambiente cuja absorvância da rutina é menos intensa.

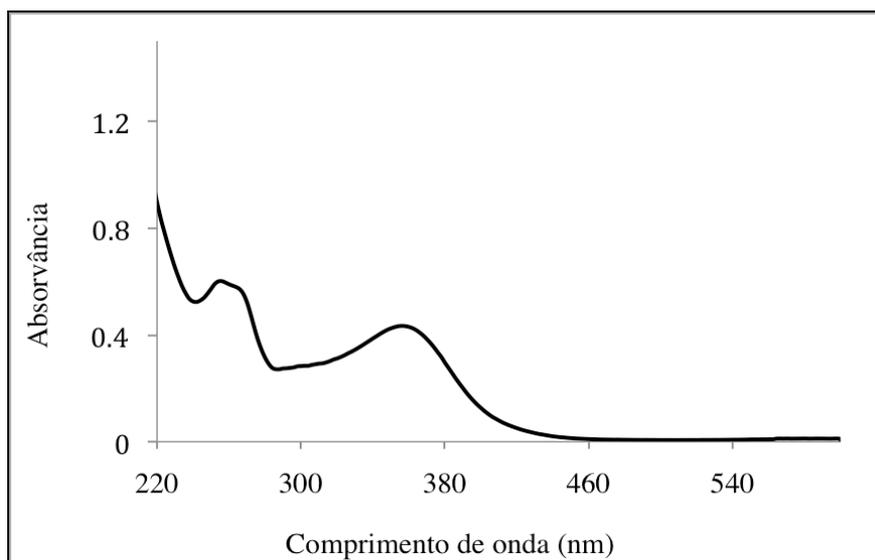


Figura 10 - Espectro de absorção de uma solução $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina.

Nestas condições, espectros de emissão de fotoluminescência da sonda na presença de diferentes concentrações de rutina (concentração final na dispersão de $5,0 \times 10^{-6}$ a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) foram obtidos (Figura 21A) indicando a diminuição de intensidade da luminescência da sonda com o aumento da concentração de rutina, sem qualquer deslocamento no comprimento de onda máximo de emissão. O perfil de decaimento de sinal é mostrado na Figura 21B.

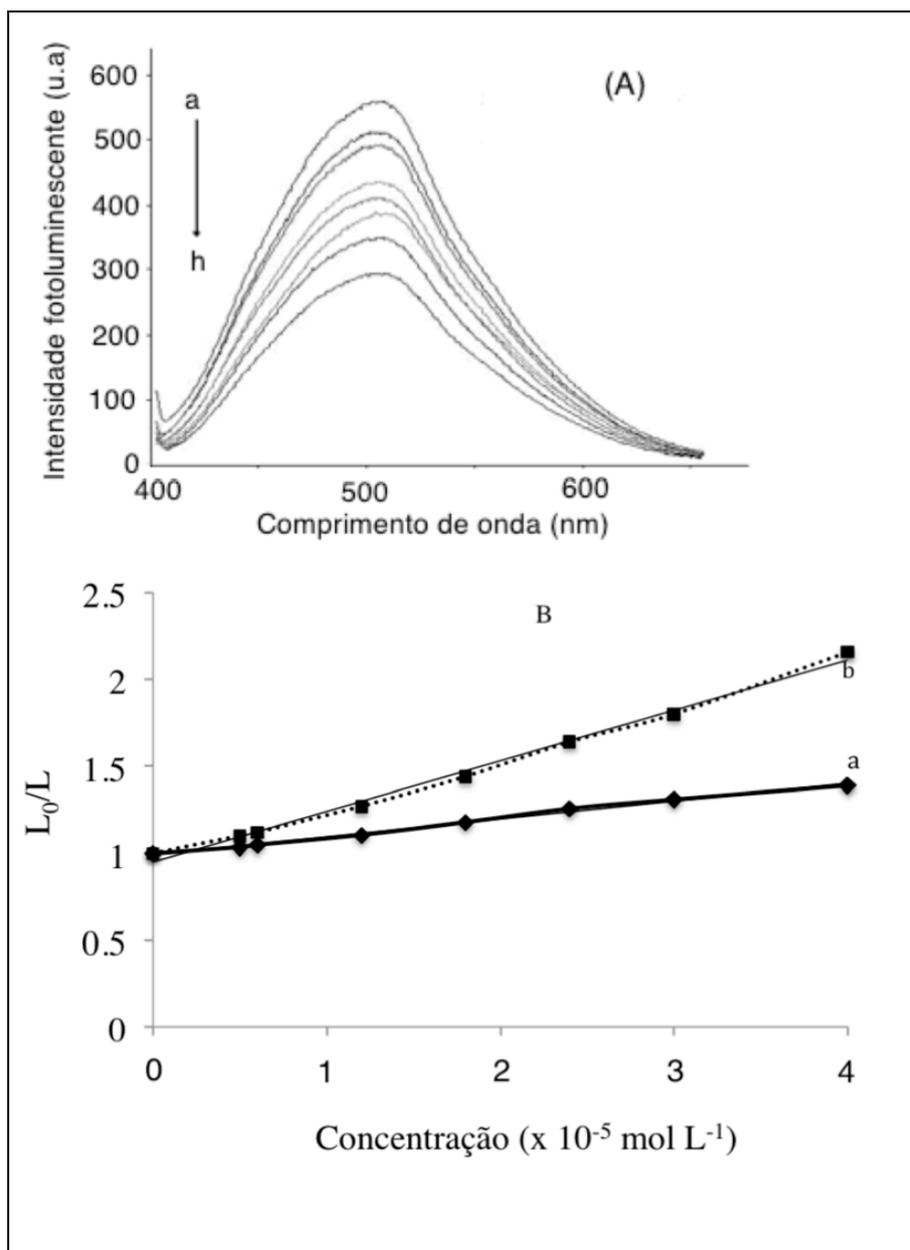


Figura 11 – (A) Espectros fotoluminescentes da sonda 2MPA-CdS na presença de diferentes concentrações de rutina: 0 (a); 0,5 (b); 0,7 (c); 0,9 (d); 1,0 (e); 2,0 (f); 3,0 (g) e (h) $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. (B) Curvas analíticas (linha de tendência) e curva interligando os pontos em função da concentração crescente de rutina (0 a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) presentes em dispersões aquosas de 2MPA-CdS: (a) sem os valores de absorvância da rutina ($y = 29069x + 0,950$ com $R^2 = 0,993$) e (b) com correção dos valores de absorvância ($y = 10267x + 0,9994$ com $R^2 = 0,994$).

Os espectros de absorção obtidos para as diferentes dispersões de trabalho mostraram que em 387 nm (A_{387}) os valores de absorvância de rutina variaram de 0,004 a 0,388 em função do aumento da sua concentração de $5,0 \times 10^{-6}$ a $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (Figura 22). Nenhuma absorção de luz significativa foi observada no comprimento de onda de emissão de 498 nm (A_{498}) da sonda. Por causa dos elevados valores de absorvância produzidos nas concentrações maiores de rutina, tornou-se necessário aplicar o cálculo de correção do efeito filtro, a fim de se obter a verdadeira extensão da supressão de luminescência causada pela interação entre a rutina e os QDs de 2MPA-CdS, e assim isolá-lo da atenuação de sinal devido a contribuição da componente de efeito filtro interno.

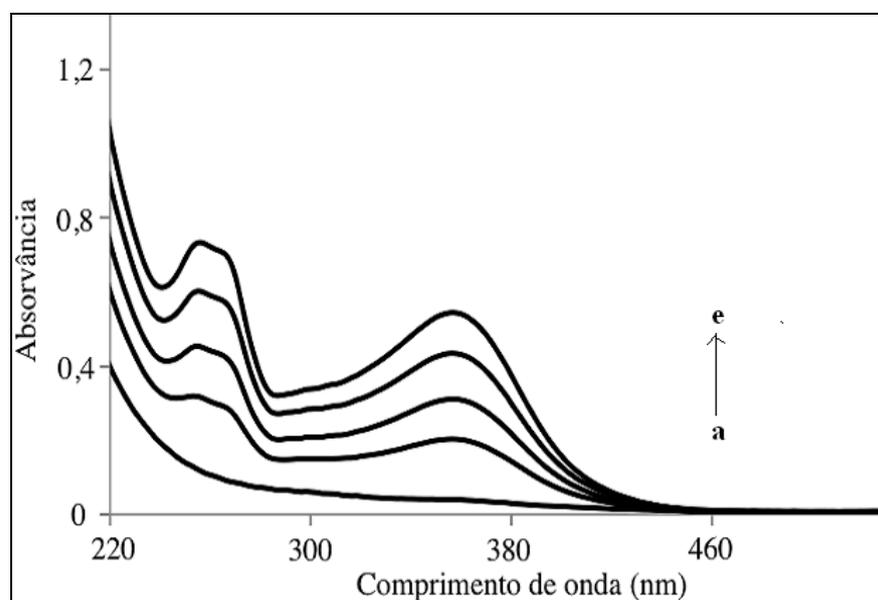


Figura 12 - Espectros de absorção da dispersão aquosa dos QDs de 2MPA-CdS (6×10^{-9} mol L⁻¹) (a) na ausência de rutina na presença de rutina: $9,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹(b); $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹(c); $3,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (d); $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹(e).

Tal efeito de filtro interno provocado pela absorção de luz pela rutina foi corrigida utilizando-se a Equação 9, modificada pela eliminação da contribuição da absorvância em 498 nm, e o modelo de Stern-Volmer foi usado para estabelecer a relação linear (curva analítica linear) entre a intensidade da fotoluminescência medida (L) e a concentração de rutina (Equação 10),

$$L_{\text{corr}} = L \times 10^{[(A_{387} + 0) / 2]} \quad (9)$$

$$L_0/L_{\text{corr}} = 1 + K_S [\text{rutina}] \quad (10)$$

Onde L_0 e L representam as intensidades de sinal fotoluminescente da sonda respectivamente na ausência e na presença da rutina e A_{387} é a absorvância obtidas nos comprimentos de onda de excitação e K_S é a constante de supressão da fotoluminescência, que na ausência de efeito filtro pode ser chamada de constante de Stern-Volmer (K_{SV}). A Figura 23 mostra a curva analítica do tipo Stern-Volmer referente à supressão da rutina, após a correção dos valores de absorvância.

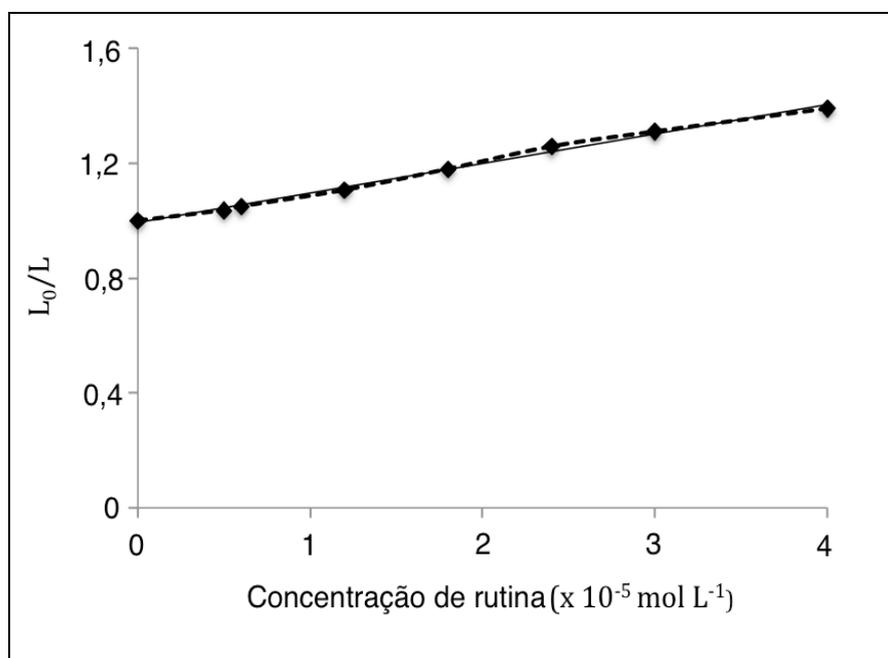


Figura 13 - Curva analítica do tipo Stern-Volmer (linha cheia) mostrando a supressão de fotoluminescência da sonda em função do aumento da concentração de rutina. Linha de união entre os pontos da curva (linha pontilhada).

A curva analítica usando a sonda dos QDs de 2MPA-CdS apresentou uma resposta linear entre $5,0 \times 10^{-6}$ e $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina, com modelos matemáticos para a curva não corrigida igual a $L_0/L = 2,9 \times 10^4 [\text{rutina}] + 0,95$ ($R^2 = 0,993$) e para a curva com correção do efeito filtro igual a $L_0/L = 1,0 \times 10^4 [\text{rutina}] + 0,99$ ($R^2 = 0,994$). Segundo o Inmetro (2011), o comportamento homocedástico do modelo pode ser avaliado através do Teste de Cochran (Teste G). Neste teste, o parâmetro $G_{\text{calculado}}$ corresponde a $s_{\text{maior}}^2 / \Sigma s^2$ (onde s_{maior}^2 é a

variância máxima dividido pelo somatório das variâncias). Os valores de G_{tabelado} encontram-se no Anexo 1. Quando $G_{\text{calculado}}$ é maior que o G_{tabelado} pode-se dizer que há heterocedasticidade, ou seja, a variabilidade dos resíduos da regressão ao longo dos níveis de concentração estudados não é constante. Porém quando o $G_{\text{calculado}}$ é menor que o G_{tabelado} há homocedasticidade, ou seja, a variabilidade dos resíduos segue uma constante. O comportamento da variância da curva foi testada a partir dos dados obtidos para o preparo da curva analítica. O valor de $G_{\text{calculado}}$ foi de 0,27, sendo o valor de G_{tabelado} de 0,653 ($G_{\text{calculado}} < G_{\text{tabelado}}$). Portanto, pode-se concluir que o método pode ser considerado estatisticamente como homocedástico.

Os parâmetros da curva indicam que mesmo na condição selecionada, a contribuição devida à absorção de luz pela rutina em 387 nm deve ser levada em consideração. Isso é evidenciado pela diferença significativa entre o valor de K_S obtidos com e sem a correção do efeito filtro (respectivamente $1,0 \times 10^4$ e $3,0 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$).

A natureza da supressão não acarretada pela atenuação da luz incidente foi avaliada pelas curvas de decaimento da fotoluminescência dos QDs de 2MPA-CdS na presença e ausência de rutina (na concentração de $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). De acordo com Lakowicz (2006) medir o tempo de vida do processo luminescente é um jeito bastante seguro para se avaliar se o tipo de mecanismo de supressão é de natureza estática ou dinâmica.

A Figura 24 mostra que, em ambos os casos (na ausência e na presença de rutina), os perfis temporais são iguais. Esses perfis têm duas componentes de decaimento (obtidos pela linearização das mesmas, não mostrada aqui) com tempos de vida (τ) com valores em torno de 35 ns e de 164 ns. A partir deste resultado presumiu-se que a supressão de fotoluminescência da sonda é de natureza estática, isto é, uma interação efetiva entre rutina e a nanopartícula é estabelecida no meio.

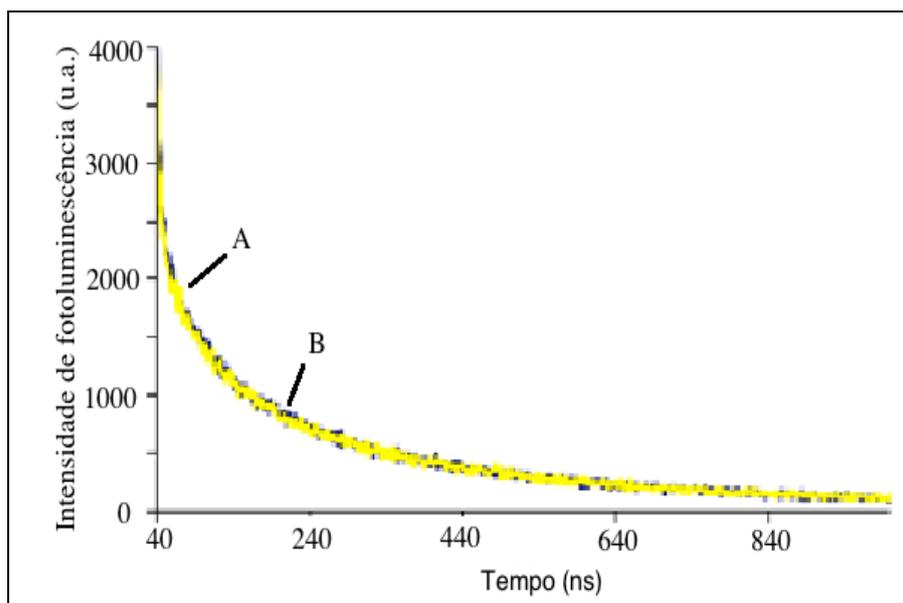


Figura 14 - Perfis temporais de decaimento fotoluminescente dos QDs de 2MPA-CdS na presença (amarelo, A) e na ausência (B, azul) de rutina ($3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

Para efeito de análise quantitativa, a curva analítica não corrigida foi usada já que esta apresentava uma melhor sensibilidade da resposta de diminuição de sinal e por que, independente do fenômeno responsável pela diminuição de fotoluminescência da sonda, esta guardava relação de proporção com a concentração de rutina na dispersão de trabalho. Nessas condições, o limite de detecção (LD) de $1,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,73 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) foi obtido. Esse valor foi calculado como a concentração de rutina capaz de reduzir o sinal médio da dispersão dos QDs de 2MPA-CdS (x_b), também chamada de dispersão branco (solução contendo QDs de 2MPA-CdS na ausência do analito), para um valor igual à $x_b - 3s_b$, onde s_b é o desvio padrão de 10 valores de sinal medidos para a dispersão branco. O limite de quantificação de $4,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($2,8 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) foi calculado como a concentração de rutina capaz de reduzir o sinal médio da dispersão dos QDs de 2MPA-CdS (x_b), para um valor igual à $x_b - 10s_b$.

A precisão das medições foi calculada a partir da Equação 11, obtida do desvio padrão combinado da razão de sinais da curva de calibração. Os valores avaliados levaram em consideração a medição de sinal de 10 soluções independentes em dois níveis de concentração diferentes da rutina ($6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Os valores encontrados foram de cerca de 2% para os dois níveis de concentração.

$$S_{(L_0/L)} = L_0/L \times [(S_L/L)^2 + (S_{L_0}/L_0)^2]^{1/2} \quad (11)$$

4.5.

Estudo de interferência de outros compostos fenólicos

Os espectros de absorção de soluções de hesperidina (HSPD) e hesperetina (HSPT) ambos na concentração de $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e de quercetina (QUE) $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 25) foram feitos a fim de se obter os valores de suas absorvâncias em 387 nm e, investigar a possível interferência destes flavonóides na determinação da rutina. No λ_{ex} de 387 nm, a absorção de luz de hesperidina e hesperetina são insignificantes. Testes realizados com excitação da sonda em outros comprimentos de onda entre 280 a 367 nm indicaram potencial interferência de HSPD e HSPT, que variaram entre 2 a 34%, devido à contribuição de absorção destes flavonóides. Por outro lado, hesperidina e hesperetina não foram capazes de induzir supressão estática de luminescência na sonda.

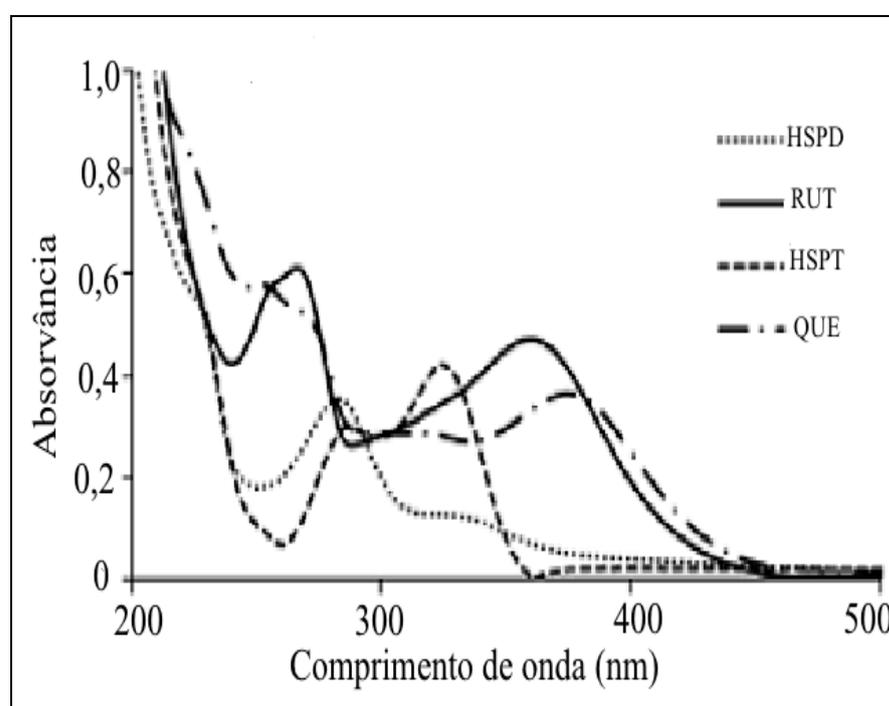


Figura 15 - Espectro de absorção de soluções de hesperidina (HSPD) e hesperetina HSPT ($3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e de rutina (RUT) e quercetina (QUE) ($2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

Testes de interferência foram realizados na presença de hesperidina e hesperetina por meio da comparação da diminuição da fotoluminescência da sonda na presença de rutina (I_{RUT}) com o observado em misturas de rutina com hesperetina ou hesperidina (respectivamente $I_{(RUT+HSPT)}$ ou $I_{(RUT + HSPD)}$), onde as proporções molares de RUT:HSPT e RUT:HSPD foram 1:1, 1:5 e 1:10, na dispersão aquosa contendo $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ RUT. Os resultados mostraram que não houve interferência na supressão da fotoluminescência da sonda na presença de hesperetina e hesperidina, mesmo quando estes dois flavonóides estão presentes em concentrações dez vezes maiores que a de rutina, uma vez que as razões de $I_{RUT}/I_{(RUT+HSPT)}$ e $I_{RUT}/I_{(RUT+HSPD)}$ foram próximas de 1.

No caso da quercetina, o seu perfil de absorção é similar ao da rutina e, portanto, isto causou uma interferência significativa na atenuação de sinal de luminescência da sonda, não importando o comprimento de onda escolhido para a excitação dos QDs. Essa diminuição de sinal é certamente causada por supressão estática, devido às similaridades de estrutura entre quercetina e rutina. Neste caso, uma separação prévia do flavonóide quercetina tornou-se necessária.

4.6.

Separação e isolamento de rutina por TLC em amostras simuladas contendo quercetina

O procedimento escolhido para a separação de rutina e quercetina em amostras contendo esses dois componentes foi a TLC já que essa técnica é compatível com o caráter ultra-traço da abordagem analítica usando a sonda dos QDs de 2MPA-CdS. Por ultra-traço entende-se técnicas analíticas que medem quantidades traço de analitos em microquantidades de amostra (μL ou μg de amostra).

A fim de separar eficientemente a rutina do interferente e minimizar a perda do analito na fase estacionária, as condições foram ajustadas para que somente a quercetina migrasse ao longo das placas de sílica gel enquanto que a rutina permanecesse no ponto de amostragem inicial (origem). Isso foi alcançado com a utilização da fase móvel apropriada, ou seja, com uma mistura de acetato de etila/hexano/ácido acético 24/15/1 v/v/v. O fator de retenção da rutina na sílica não pôde ser medido, já que esta permaneceu não migrou pela fase estacionária. Uma vez que rutina foi removida das placas de sílica gel a partir de pequenas

porções presentes no ponto original de amostragem, perdas por espalhamento, ou arraste da rutina ao longo da placa foram minimizadas. Na Figura 26 é representada uma cromatoplaça de sílica gel, após eluição de soluções de padrões de rutina na concentração de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (A), quercetina na concentração de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (B) e de uma mistura de rutina e quercetina ambas na concentração de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

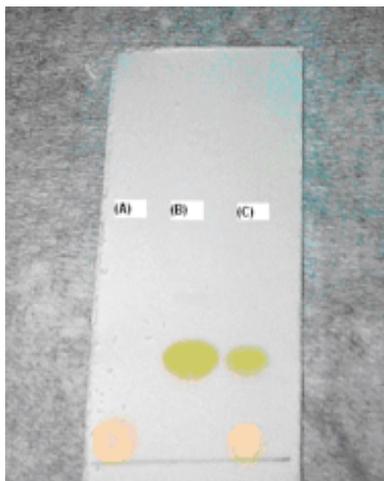


Figura 26 - Cromatografia em camada fina de (A) solução padrão de rutina na concentração de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (B) solução padrão de quercetina na concentração de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e (C) mistura de rutina e quercetina ambas na concentração de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, utilizando-se como eluente a mistura acetato de etila/hexano/ácido acético 24/15/1 v/v/v.

A remoção da rutina da fase estacionária foi realizada pela raspagem da sílica gel no local onde a amostra foi colocada. Esse material foi coletado em copos Becker. Metanol foi adicionado e a solução deixada por 5 min em um banho de ultrassom, a fim de facilitar a remoção deste flavonóide retido na sílica gel. Em seguida, o material extraído foi filtrado, evaporado sob fluxo de nitrogênio e reconstituído nas dispersões de trabalho dos QDs de 2MPA-CdS. A fim de avaliar a exatidão das determinações, testes de recuperação foram realizados usando diferentes quantidades de rutina amostradas nas placas de sílica gel. Para tal, quatro diferentes quantidades de rutina (61, 122, 183 e 244 μg) foram colocadas (adicionadas) nas placas de sílica gel. As placas foram expostas à fase móvel na cuba de corrida, por aproximadamente 5 min. e, em seguida, a rutina foi extraída do local original da amostragem com metanol. Volumes das

soluções foram injetadas diretamente no HPLC a fim de avaliar suas concentrações e calcular a recuperação, que foram acima de 96% para as três primeiras concentrações e de 92% para a maior concentração de rutina (244 µg). Os valores de recuperação obtidos na curva analítica da sonda dos QDs de 2MPA-CdS, com correção dos valores de absorção, foram similares (99,0; 98,6; 95,3 e 91,3% para concentrações de 1,0 a $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹), e os resultados indicaram uma perda insignificante para quantidades amostradas na placa menores que 183 µg.

4.7.

Análise das amostras com o método proposto

O método proposto foi aplicado na determinação de rutina presente na formulação farmacêutica Venocur Triplex, que contém 300 mg de rutinosídeo (rutina) por cápsula, e em amostras de saliva humana fortificadas com rutina em dois níveis de concentração nas dispersões de trabalho ($1,0 \times 10^{-5}$ e $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹). As análises foram realizadas utilizando a sonda dos QDs de 2MPA-CdS e também através de HPLC, a fim de validar o método proposto. Os resultados são apresentados na Tabela 3. As recuperações obtidas pelo método proposto foram próximas a 100% e os resultados foram equivalentes aos obtidos por HPLC (n = 3; nível de confiança de 95%). O teste t de Student foi realizado para cada concentração de cada amostra, mostrando que não houve diferença significativa entre as médias obtidas para os dois métodos de determinação da rutina.

As amostras simuladas de rutina ($1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) contendo hesperidina e hesperetina em proporções molares dez vezes maiores que à da rutina (RUT:HSPT:HSPD 1:10:10 v/v/v) foram também analisadas com a sonda dos QDs de 2MPA-CdS e apresentou uma média de recuperação de $96,8 \pm 1\%$.

Amostras simuladas de rutina ($1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em metanol) contendo quercetina em proporções molares iguais a 1:1 e 1:2 (rutina:quercetina) foram também analisadas com a sonda. Após a fase móvel alcançar o topo da placa, o fator de retenção da quercetina foi calculado, obtendo um valor de R_f de 0,4 enquanto a rutina permaneceu no ponto de amostragem (origem). Os valores de recuperação da rutina obtidos através da curva analítica da sonda dos QDs de 2MPA-CdS foram de 98,5 e 98,2% para as amostras com proporções 1:1 e 1:2

respectivamente. Estes resultados, mostrados na Tabela 3, foram similares ao encontrado por HPLC (99,0 e 100,3% para as amostras com proporções 1:1 e 1:2, respectivamente) quando a quantidades de rutina foram extraídas das de placas de TLC.

Tabela 3 - Resultados de recuperações para amostras do medicamento Venocur Triplex e amostras de saliva fortificadas com RUT, em dois níveis de concentração $1,0 \times 10^{-5}$ e $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Amostras*	Concentração encontrada na sonda dos QDs de 2MPA-CdS ($\times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Concentração encontrada por HPLC ($\times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
V1	1,02	$103 \pm 1,6$	1,03	$104,5 \pm 0,8$
V2	2,06	$103 \pm 0,8$	2,11	$105,7 \pm 2,3$
S1	1,02	$102,8 \pm 2,5$	1,00	$100,2 \pm 0,3$
S2	2,04	$102,1 \pm 2,2$	2,03	$101,3 \pm 0,4$
R:I	0,97	$96,8 \pm 1,0$	-	-
R:Q	0,98	$98,5 \pm 1,9$	0,99	$99,0 \pm 1,5$
R:Q	0,98	$98,2 \pm 2,1$	1,00	$100,3 \pm 1,6$

* Amostras

V1 (medicamento Venocur na concentração de rutina estimada em $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$);

V2 (medicamento Venocur na concentração de rutina estimada em $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$);

S1 (Saliva fortificada com rutina na concentração estimada de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$);

S2 (Saliva fortificada com rutina na concentração estimada de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$);

R:I (amostra simulada contendo RUT:HSPD:HSPT, na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ RUT e $1,0 \times 10^{-4}$ HSPD e HSPT).

R:Q (amostra simulada contendo RUT:QUE na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ RUT e $1,0 \times 10^{-5}$ e $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ QUE).