

5

Sensor dos QDs de 3MPA-CdTe: estudo da interação com diferentes flavonóides em meio organizado e não organizado

As sínteses dos QDs de 3MPA-CdTe foram realizadas em conformidade com o procedimento de Gu *et al.* (2008), com uma pequena modificação no tempo de reação com o objetivo de obter nanopartículas com fotoluminescência máxima de emissão (λ_{em}) em torno de 525 nm. As sínteses foram repetidas diversas vezes até que se obtivesse um domínio do processo com partidas de síntese diferentes, mas com perfis similares de absorção e de luminescência. O procedimento de síntese dos QDs de 3MPA-CdTe é mais complexo que o dos QDs de 2MPA-CdS devido a dois fatores: a utilização da aparelhagem de refluxo (que requer maior vazão de nitrogênio (N₂) para remover totalmente o oxigênio presente no meio) e a transferência do precursor NaHTe de um balão para o outro. O precursor deve ser imediatamente transferido para o balão de síntese dos QDs (reator) quando a coloração de sua solução é vinho intenso. Durante a transferência feita com auxílio de seringa e agulha inox, de 8,0 cm, oxigênio do ar não pode entrar no interior da seringa, de modo a evitar a oxidação do telúrio à sua forma metálica, o que inviabiliza a síntese dos QDs de CdTe.

Após o ajuste da etapa de síntese e a caracterização dos QDs de 3MPA-CdTe, foram realizados estudos para otimizar os parâmetros experimentais para se obter estabilidade na fotoluminescência medida em dispersões aquosas tamponadas dos QDs de 3MPA-CdTe. A presença de uma fração de solvente orgânico nas dispersões aquosas não organizadas com surfactante foi necessária para garantir a completa solubilização dos flavonóides no meio. Portanto um estudo sobre o efeito de solvente orgânico na estabilidade do sinal analítico foi realizado. Em seguida, foram feitos testes para avaliar o comportamento do sinal da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso na presença dos flavonóides flavona, galangina, naringenina, canferol, miricetina, hesperetina, morina, catequina, taxifolin, quercetina e rutina. O melhor resultado de interação com os QDs foi observado para o flavonóide quercetina, que promoveu uma supressão

mais efetiva da luminescência da sonda do que as demais substâncias testadas. Estudos realizados com variação de temperatura indicaram que tal supressão tinha natureza estática (quenching estático). Esse comportamento definiu a escolha do flavonóide quercetina como analito de interesse para o desenvolvimento de método analítico usando a sonda dos QDs. Como a maior parte dos flavonóides testados causou, em algum grau, supressão de sinal da sonda, a prévia separação de quercetina dos outros flavonóides por TLC em cromatofolhas de alumínio revestidas com sílica gel foi requerida. Através dessa abordagem conjunta TLC/Sondagem por QDs foi possível dosar quercetina presente em amostras de extratos de cebola roxa e amarela. Um suplemento a base de quercetina, contendo ácido ascórbico, também foi analisado, nesse caso, contudo, sem a necessidade de separação por TLC.

A sonda dos QDs de 3MPA-CdTe também foi testada no meio organizado por surfactante, quando além das investigações em meio tamponado foram realizados estudos para escolha do surfactante que habilitasse a realização de medições estáveis na sonda. Dentre os surfactantes testados (Triton X-100, Triton X-114 e CTAB) o melhor resultado encontrado foi para o surfactante CTAB. A interação dos demais flavonoides citados anteriormente, acrescidos de 3-hidroxi-flavona, 5-hidroxi-flavona, 6-hidroxi-flavona e 7-hidroxi-flavona com os QDs de 3MPA-CdTe também foi avaliada nas dispersões contendo CTAB. Os resultados, de uma maneira geral, foram diferentes dos obtidos em meio aquoso não organizado por surfactante, e o flavonóide que gerou maior supressão de fotoluminescência foi a 3-hidroxi-flavona.

5.1.

Síntese e caracterização de 3MPA-CdTe

O ácido 3-mercaptopropiônico (3MPA) é um ácido carboxílico com cadeia constituída por três átomos de carbono e um grupamento tiol (S-H) em uma das extremidades. A ligação S-H é relativamente lábil e faz com que o átomo de hidrogênio possa ser abstraído facilmente sob condições moderadas como, por exemplo, o aumento da basicidade do meio. Desta forma, substâncias orgânicas que apresentam grupo tiol, como o 3MPA, a glutatona reduzida e o ácido tioglicólico, entre outras, são muito utilizadas para revestir a superfície dos

QDs de CdTe. Como já citado, tal revestimento geralmente evita a agregação das nanopartículas (uma vez que em pH básico ocorre a desprotonação do ácido carboxílico) em meio aquoso e aumenta a fotoestabilidade dos QDs. Existem diversas sínteses dos QDs de CdTe descritas na literatura e umas das mais reportadas é a feita com 3MPA, por outro lado, o 2MPA é muito pouco explorado nas síntese, por causa da baixa qualidade dos QDs obtidas com esse ligante. Tal resultado demonstra que para esse tipo dos QDs, o 3MPA provavelmente deve fornecer um melhor capeamento. Portanto 3MPA foi escolhido como ligante para síntese dos QDs de CdTe.

As sínteses dos QDs de 3MPA-CdTe foram repetidas diversas vezes até se obter homogeneidade em todas as partidas (nanopartículas com o mesmo diâmetro médio). As figuras 27A e 27B representam as etapas de síntese do precursor NaHTe e QDs de 3MPA-CdTe respectivamente. Na Figura 25C e 25D é mostrada uma mesma dispersão estoque dos QDs de 3MPA-CdTe sob luz visível e luz UV no comprimento de onda de 254 nm. Para purificação, as nanopartículas de 3MPA-CdTe foram precipitadas com adição de acetona, centrifugadas e o material ressolubilizado em solução aquosa de NaOH com pH 10,0.

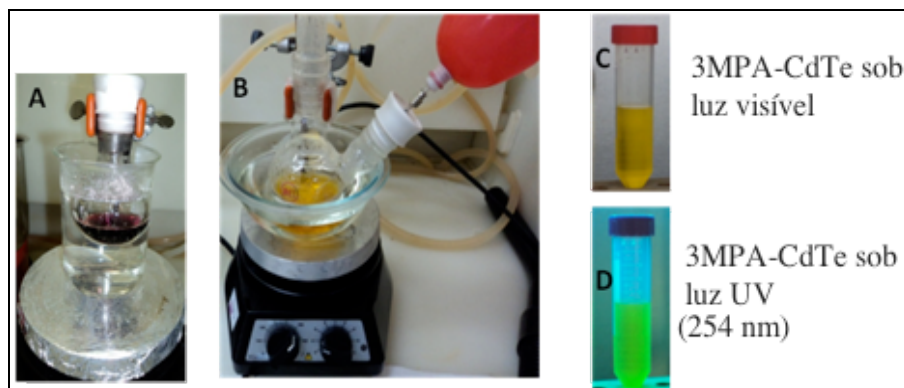


Figura 27 - (A) síntese do precursor NaHTe, (B) síntese das nanopartículas de 3MPA-CdTe, (C) dispersão estoque dos QDs de 3MPA-CdTe sob luz visível e (D) dispersão de 3MPA-CdTe sob luz UV no comprimento de onda de 254 nm.

A caracterização dos QDs de 3MPA-CdTe foi feita a partir da comparação dos perfis de emissão fotoluminescente e de absorção eletrônica, mostrados na Figura 28A e 28B respectivamente, com os perfis obtidos da literatura. No caso, quando a excitação foi feita em 460 nm a emissão máxima de fotoluminescência foi coletada a 527 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 460/527$ nm). O comprimento de onda de excitação de 460 nm foi escolhido levando-se em consideração o perfil de absorção dos flavonóides, a fim de evitar a elevada contribuição de efeito de filtro interno. O perfil largo de absorção é uma das grandes vantagens na utilização dos QDs como sondas analíticas, pois eles permitem uma ampla faixa de espectro para a escolha da excitação, que por sua vez é selecionado em função das peculiaridades da realização das análises.

O espectro de emissão fotoluminescente da dispersão aquosa de 3MPA-CdTe original de síntese (60 μL diluído em água) em um volume total de 10,00 mL apresentou valor de FWHM de 40 nm, um excelente perfil simétrico e estreito que indica a presença de nanocristais homogêneos e monodispersos (Yu *et al.*, 2008). O espectro de absorção apresentou uma banda característica dos QDs com primeiro pico do excitônico em 516 nm com absorvância máxima (A_{max}) de 0,0127.

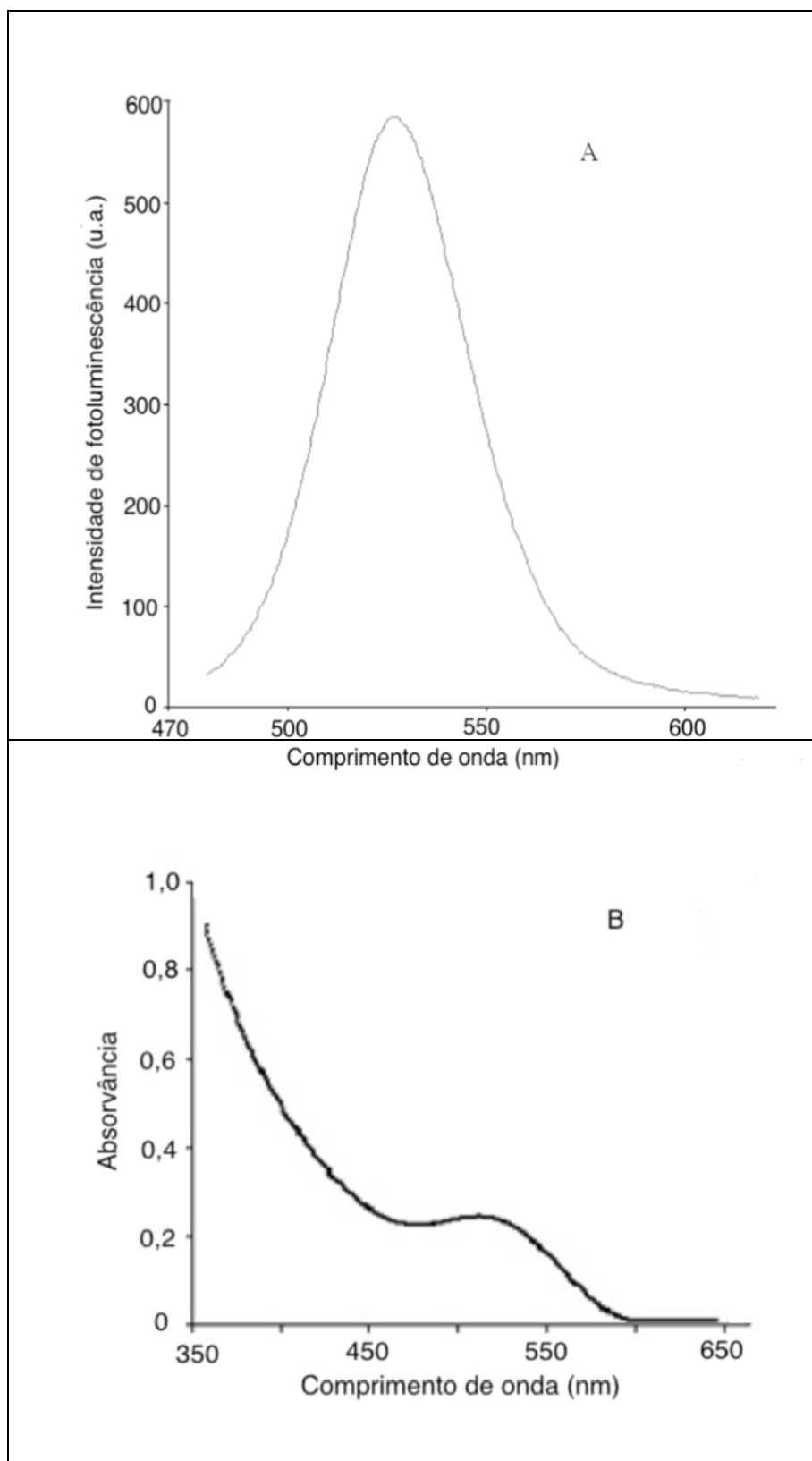


Figura 28 - Espectros da dispersão aquosa dos QDs de 3MPA-CdTe ($1,2 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹): (A) emissão fotoluminescente com intensidade máxima em 527 nm e (B) perfil de absorção.

A partir do perfil de absorção da dispersão foi possível estimar o diâmetro médio das nanopartículas de 3MPA-CdTe em 2,7 nm, utilizando-se a Equação 3. A concentração da dispersão diluída dos QDs de ($1,2 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$) foi estimada considerando-se o comprimento de onda do primeiro pico do excitônico (516 nm) a partir da Equação 5. Considerando-se o fator de diluição, foi possível estimar a concentração da dispersão estoque dos QDs de 3MPA-CdTe em $1,54 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

Conforme descrito, o rendimento quântico dos QDs de 3MPA-CdTe 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 do 3MPA-CdTe e do padrão é mostrado na Figura 29. A partir desses dados, a eficiência quântica de 54% foi obtida para os QDs de 3MPA-CdTe.

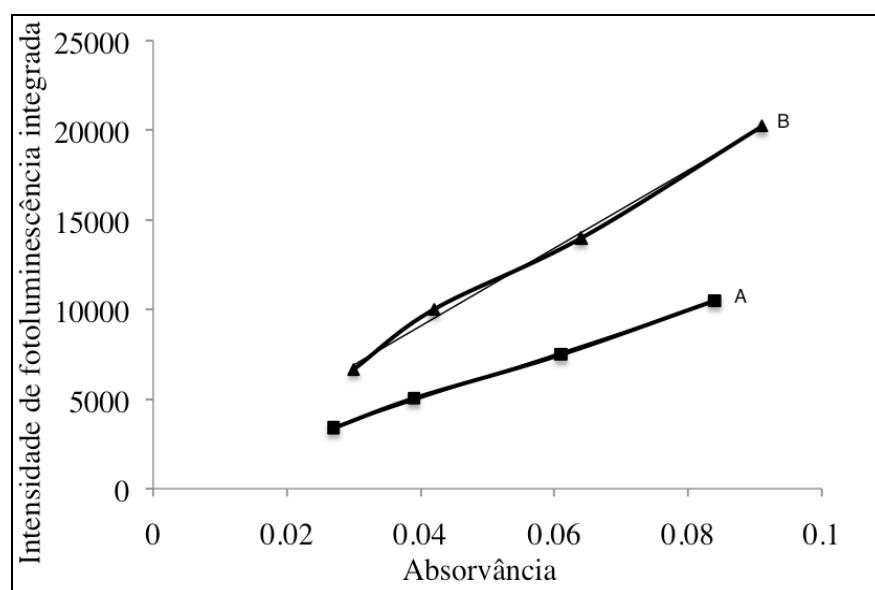


Figura 29 - Intensidade de fotoluminescência em função da absorvância integrada dos QDs de 3MPA-CdTe (A) e rodamina B (B).

Após as devidas caracterizações, as partidas de síntese que apresentaram os perfis descritos acima foram homogeneizadas para que em seguida fossem iniciadas as otimizações para realização de medições confiáveis.

5.2.

Avaliação dos perfis de absorção e de luminescência dos flavonóides

A escolha de substâncias pertencentes à classe dos flavonóides para realização desse estudo foi baseado no interesse em avaliar a importância de diferentes sítios presentes na estrutura desses compostos na interação efetiva entre flavonóide e QDs, vislumbrando o desenvolvimento de método analítico baseado na resposta da sonda dos QDs de CdTe frente a presença de flavonoides.

Os flavonóides diferem estruturalmente entre si pela presença ou ausência de conjugações entre os anéis e/ou pela presença ou ausência de hidroxilas ligadas a diferentes posições nos anéis das suas estruturas. Na Figura 30 estão representadas as estruturas das substâncias flavona (FLAV), galangina (GAL), naringenina (NAR), hesperetina (HSPT), morina (MOR), catequina (CAT), taxifolin (TAX), quercetina (QUE), canferol (CAN), miricetina (MIR) e rutina (RUT) que foram as escolhidas para os estudos em dispersões aquosas não organizadas com surfactante.

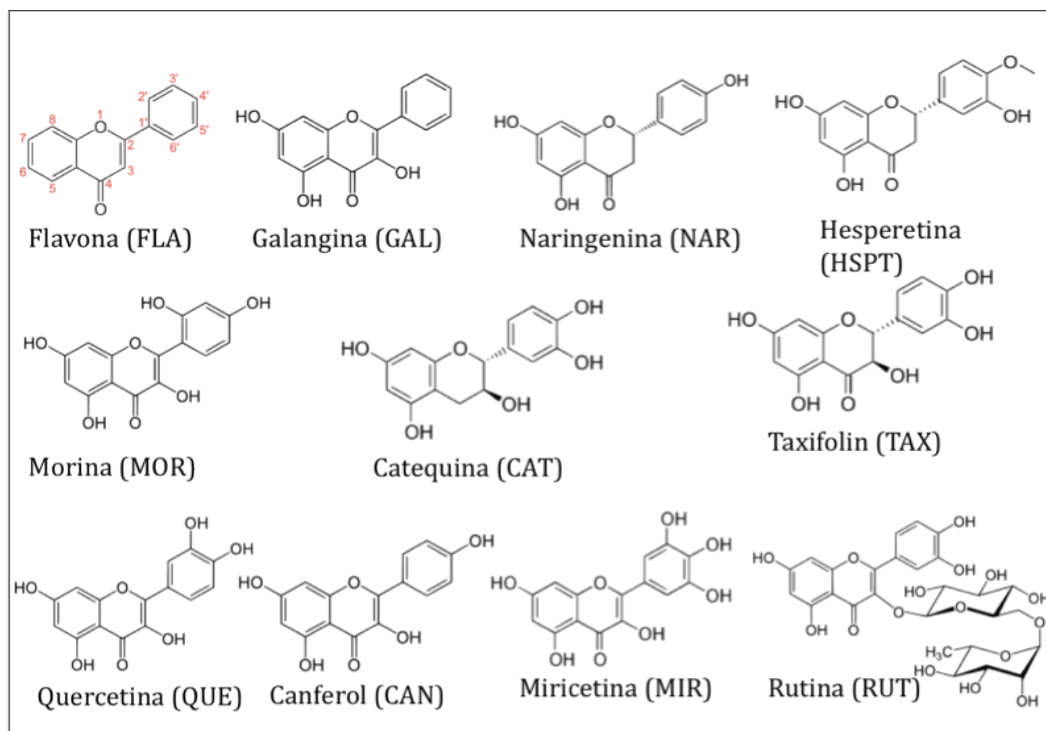


Figura 30 – Estruturas das substâncias flavona (FLAV), galangina (GAL), naringenina (NAR), hesperetina (HSPT), morina (MOR), catequina (CAT), taxifolin (TAX), quercetina (QUE), canferol (CAN), miricetina (MIR) e rutina (RUT).

Primeiramente foram obtidos os espectros de absorção no UV-vis dos flavonóides, a fim de se identificar a região da potencial contribuição de efeito filtro interno provocado na resposta óptica da sonda e assim evitá-la. Deste modo, o perfil de absorção dos analitos (Figura 31) precisa ser considerado para uma criteriosa escolha do par $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ para ser utilizado na sonda.

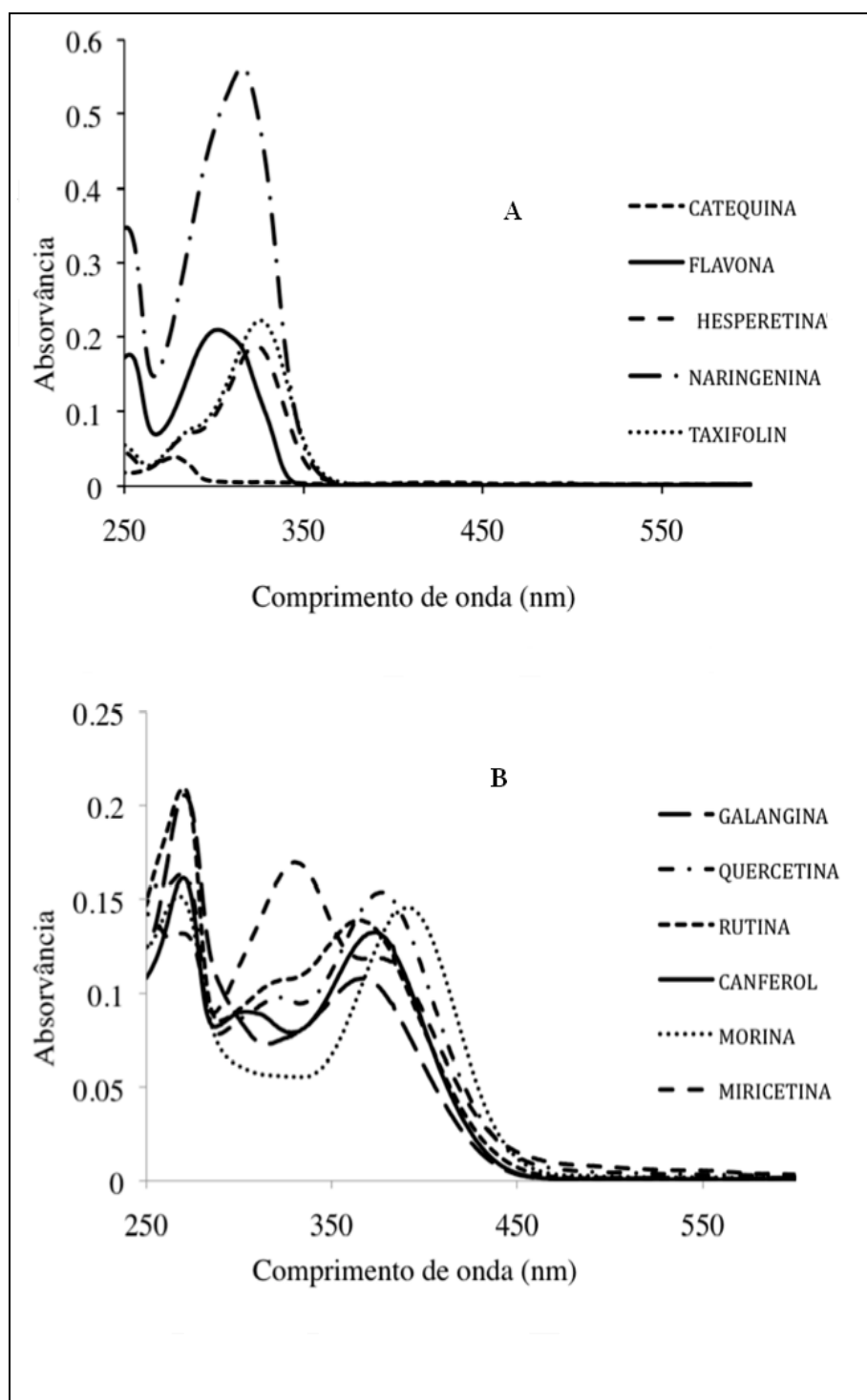


Figura 31 - Espectro de absorção de soluções $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4 de (A) catequina, flavona, hesperitina, naringenina e taxifolin; (B) galangina, quercetina, rutina, canferol, morina e miricetina.

Nos espectros de absorção dos flavonóides catequina, flavona, hesperetina, naringenina e taxifolin (na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e na presença de tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) mostrados na Figura 31A, verificou-se que eles absorvem intensamente a radiação até 380 nm, aproximadamente. É importante ressaltar que com exceção da flavona, que não possui grupos cromóforos ligados aos anéis A e B, os outros quatro flavonóides não possuem extensão de conjugação entre os anéis A, B e C devido a saturação existente entre os átomos de carbono 2 e 3 (ver estrutura básica dos flavonóides na Figura 30). Por outro lado, os flavonóides galangina, quercetina, rutina, canferol, morina e miricetina (sob as mesmas condições experimentais indicadas anteriormente) são completamente conjugados e possuem grupos OH ligados aos anéis A e C. Tais características fazem com que a faixa de absorção até 450 nm (Figura 31B) seja mais ampla que a faixa de absorção dos espectros das substâncias na Figura 29A.

Assim sendo, o comprimento de onda de 460 nm foi escolhido para a excitação óptica das dispersões dos QDs de 3MPA-CdTe, a fim de se eliminar a potencial contribuição de efeito filtro provocado pela absorção de luz pelo flavonóide no comprimento de onda de excitação do QDs.

Os perfis de emissão fotoluminescentes dos flavonóides, no comprimento de onda de 527 nm, foram também monitorados fazendo-se a excitação das soluções em 460 nm. Essa avaliação teve como intuito verificar a existência da luminescência natural dessas substâncias. As medições foram feitas em soluções aquosas contendo cada um dos flavonóides na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, 1,0 mL metanol, 1,0 mL tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 e água ultrapura para se completar o volume final de 10,00 mL em cada balão volumétrico. Os resultados demonstram que os flavonóides não possuem luminescência nativa considerável, devido aos baixos valores de emissão obtidos na faixa de 2,75 a 16,03 u.a., que são insignificantes e no nível do sinal característico dos brancos dessas soluções.

5.3.

Otimização das condições para realização das medições de fotoluminescência em meio aquoso com a sonda dos QDs de 3MPA-CdTe

Um estudo sistemático de parâmetros experimentais foi realizado para se encontrar as melhores condições para a estabilidade da fotoluminescência dos QDs de 3MPA-CdTe visando aplicações analíticas da sonda usando o par $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 460/527 nm. Primeiramente foi feita a escolha da alíquota de dispersão estoque dos QDs na sonda de trabalho (dispersão aquosa de trabalho) que habilitasse uma intensidade de sinal elevada, porém não saturando a escala de resposta do instrumento. As alíquotas testadas foram de 30; 40; 60 e 80 μL . As alíquotas de 30 e 40 μL produziram intensidades máximas de fotoluminescência em 527 nm de aproximadamente 470 e 650 unidades arbitrárias (u.a), numa escala máxima do instrumento de 1000 u.a. Por outro lado a alíquota de 60 μL apresentou uma melhor resposta, com intensidade máxima de fotoluminescência, em 527 nm, de 834 u.a. Por fim a utilização da alíquota de 80 μL não foi adequada, pois observou-se que tal quantidade de QDs provocou a saturação de sinal medido pelo instrumento. Portanto a alíquota de 60 μL foi escolhida para preparo das dispersões em balões volumétricos de 10,00 mL onde a concentração estimada da dispersão foi de $9,2 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$.

A estabilidade da fotoluminescência emitida pela sonda de trabalho foi avaliada na presença dos tampões Tris e fosfato, ambos em pH 7,4 (10% do volume total da dispersão), nas concentrações de 0,01; 0,02 e 0,04 mol L^{-1} . Este estudo foi fundamental para assegurar a manutenção do pH da dispersão aquosa quando amostra ou padrões dos flavonóides fossem adicionados. A escolha inicial do pH foi feita baseada em informações reportadas em estudos com QDs de CdTe disponíveis na literatura (Aucélio *et al.*, 2013) que cita o pH 7,4 como o que permite maior estabilidade de sinal numa faixa robusta de resposta. A escolha dos tampões Tris e fosfato foram baseados na abrangência da faixa de pH, que inclui o valor requerido para o estudo. Os resultados dos testes com tampão Tris, mostrados na Figura 32, indicaram um crescimento sistemático do sinal óptico da sonda ao longo de 60 min. Foi possível concluir também que independente da concentração do tampão, as intensidades de sinais foram

semelhantes. Contudo o elevado tempo requerido para estabilização do sinal fotoluminescente não habilitou o tampão Tris para continuidade dos testes.

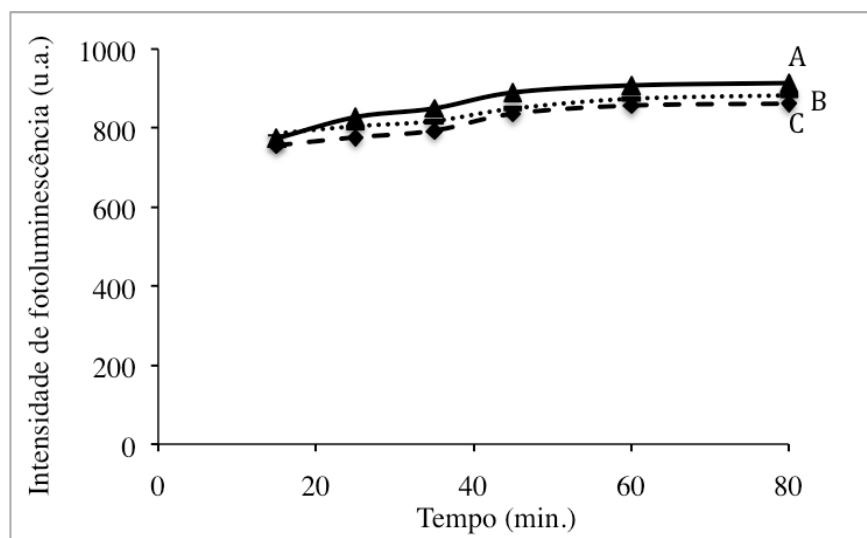


Figura 32 – Estabilidade da fotoluminescência emitida pelas dispersões aquosas de 3MPA-CdTe ($9,2 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de tampão Tris em pH 7,4 e nas concentrações (A) 0,01; (B) 0,02 e (C) 0,04 mol L⁻¹.

Os resultados obtidos para dispersões de trabalho na presença de tampão fosfato, mostrados na Figura 33, indicaram que as concentrações de 0,02 e 0,04 mol L⁻¹ causaram um decréscimo acentuado na intensidade do sinal emitido após 60 min. Por outro lado, na concentração de 0,01 mol L⁻¹ a fotoluminescência da dispersão apresentou uma tendência de estabilidade após 40 min, com uma variação máxima de ± 13 u.a., ou seja, menor que 2%. Uma explicação para a maior magnitude do sinal na dispersão dos QDs contendo tampão fosfato na concentração de 0,01 mol L⁻¹, pode ser devido a menor força iônica do meio, quando comparada com as outras concentrações mais elevadas. A utilização de tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ nas dispersões dos QDs de 3MPA-CdTe foi escolhida para dar continuidade aos testes posteriores.

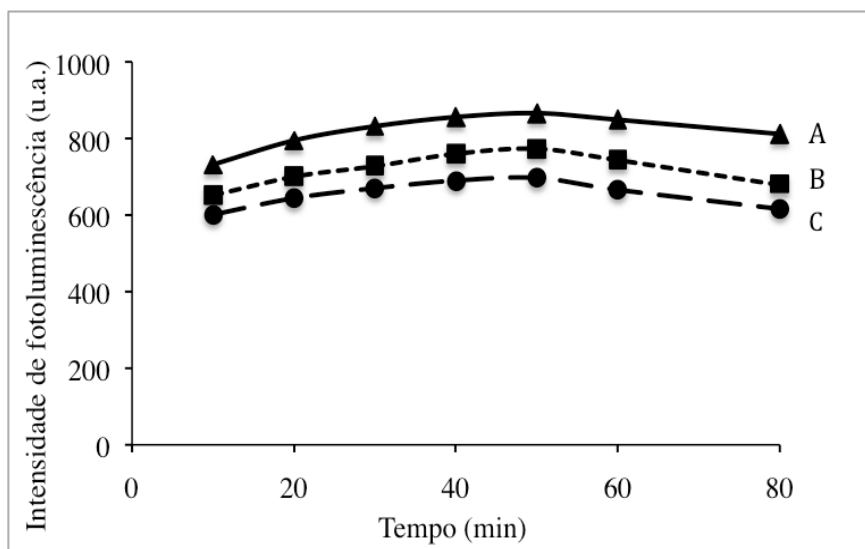


Figura 33 – Estabilidade da fotoluminescência emitida para dispersões aquosas de 3MPA-CdTe ($9,2 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de tampão fosfato (pH 7,4) e nas concentrações de (A) 0,01; (B) 0,02 e (C) 0,04 mol L^{-1} .

Um estudo com dispersões aquosas dos QDs de 3MPA-CdTe na presença de tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} foi realizado com a adição de tampão com pH na faixa entre 5,0 a 8,0 (faixa escolhida de acordo com a eficiência do tampão fosfato). Os resultados dessa avaliação são mostrados na Figura 34, na qual pode-se observar que a presença de tampão com pH 5,0 e 6,0 levou a um menor valor na intensidade da fotoluminescência medida que pode ser justificado pelo desligamento de grupos tiois da superfície dos QDs em função do aumento da acidez do meio, deixando a superfície dos QDs desprotegida (o que ocasiona foto degradação mais intensa dos QDs ou mesmo agregação e precipitação dos mesmos com consequentemente decréscimo na intensidade do sinal fotoluminescente). A possibilidade de ocorrer a protonação das hidroxilas provenientes dos grupos carboxilato (presentes no 3MPA) pode favorecer a agregação das nanopartículas ocasionando alterações nas propriedades ópticas. Contudo em dispersões com adição de tampão com pH 6,0, entre 40 e 60 min, uma pequena variação no sinal analítico (menor que 4%) foi observada, o que habilitaria situação de estabilidade suficiente para realizações de medições de fotoluminescência, apesar da baixa intensidade no sinal da sonda.

Por outro lado, os resultados obtidos com dispersões contendo tampão valores de pH 7,0; 7,4 e 8,0 foram bem homogêneos, indicando robustez, e promoveram estabilidade de sinal a partir de 40 min após o preparo da sonda de

trabalho. Desta forma seria possível realizar medições confiáveis em dispersões contendo tampão na faixa de pH de 7,0 a 8,0 entre 40 e 80 min, onde a fotoluminescência apresentou baixíssima variação de intensidade.

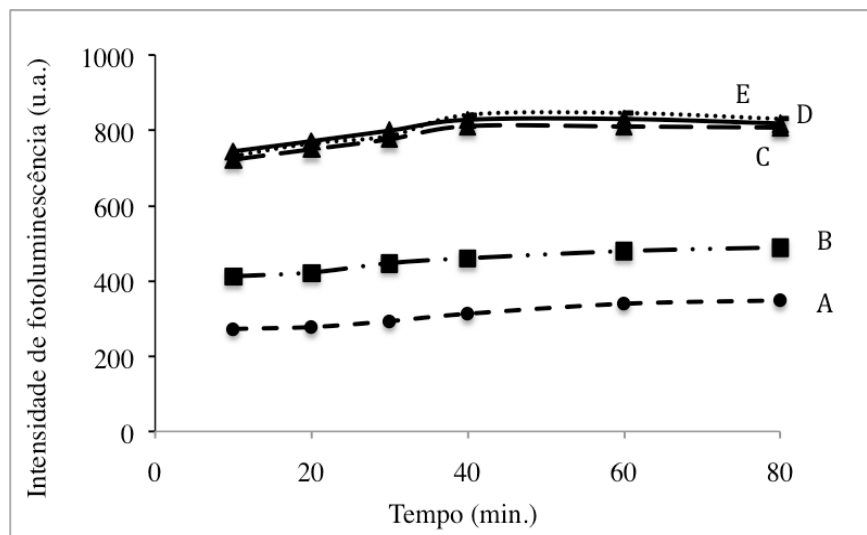


Figura 34 – Estabilidade da fotoluminescência emitida para dispersões aquosas de 3MPA-CdTe ($9,2 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$: (A) pH 5,0; (B) pH 6,0; (C) pH 7,0; (D) pH 7,4 e (E) pH 8,0.

Em seguida, foi avaliado o volume de tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) requerido nas dispersões aquosas dos QDs de 3MPA-CdTe para promover a manutenção do pH da dispersão na faixa robusta (entre 7,0 e 8,0) e com o mínimo de variação no momento da adição de amostra ou padrão de flavonóide, no caso, foi escolhido a quercetina para os testes. As alíquotas de tampão fosfato testadas nas dispersões foram de 0,5; 1,0 e 1,5 mL para um volume final de 10,00 mL de dispersão de trabalho. De acordo com os resultados apresentados na Figura 35, as dispersões de trabalho contendo alíquotas de 1,0 e 1,5 mL do tampão fosfato (pH 7,4; $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) produziram fotoluminescência estável ao longo de 80 min de medição. Estas alíquotas de tampão fosfato também foram capazes de manter o pH das dispersões na faixa robusta na presença de quercetina (concentração final na dispersão de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Os efeitos de variação de pH das dispersões contendo alíquotas entre 0,1 e 2,0 mL de tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,4) em função da presença e também na ausência de quercetina estão sumarizados na Tabela 4, onde é possível verificar que a partir da alíquota de 1,0 mL de tampão, o pH do meio mantém-se praticamente

constante (variação menor que 0,1 unidade de pH). Portanto, esse volume de tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ foi escolhido para fazer parte da composição das dispersões de trabalho. Essa alíquota de tampão equivale a 10% do volume total da dispersão de trabalho.

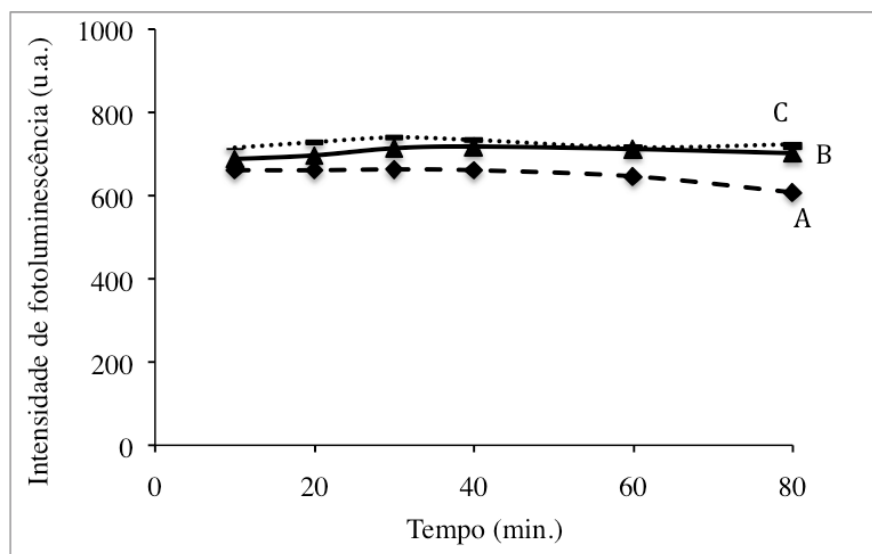


Figura 35 – Estabilidade da fotoluminescência emitida para dispersões aquosas de 3MPA-CdTe ($9,2 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de alíquotas (A) 0,5; (B) 1,0 e (C) 1,5 mL de tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,4).

Tabela 4 - Variações de pH de dispersões aquosas de 3MPA-CdTe ($9,2 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) contendo alíquota de 0,1 a 2,0 mL de tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,4) na ausência e na presença de quercetina (QUE) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Alíquota de tampão Fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (mL)	pH de dispersões aquosas de 3MPA-CdTe ($9,2 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$)	pH de dispersões aquosas de 3MPA-CdTe ($9,2 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ QUE	Variação de pH
0,1	7,83	7,43	0,40
0,2	7,79	7,40	0,39
0,3	7,80	7,50	0,30
0,4	7,83	7,53	0,30
0,5	7,80	7,59	0,21
0,6	7,80	7,60	0,20
0,7	7,80	7,56	0,16
0,8	7,77	7,64	0,13
0,9	7,75	7,64	0,11
1,0	7,74	7,63	0,08
1,5	7,73	7,66	0,07
2,0	7,73	7,65	0,08

Por fim, o último parâmetro otimizado para a constituição da dispersão de trabalho foi referente à alíquota de solvente orgânico presente, já que uma fração desse componente garante a completa dissolução dos flavonóides no meio aquoso da sonda. Assim, o monitoramento (intensidade e estabilidade) do sinal fotoluminescente da sonda, contendo diferentes alíquotas de metanol, foi realizado. Uma vez que as soluções estoque dos flavonóides foram preparadas pela dissolução e/ou diluição dos analitos em metanol, esse solvente foi o escolhido para constituir as dispersões. Os testes foram realizados com dispersões aquosas de 3MPA-CdTe ($9,2 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) em meio tamponado (1,0 mL de tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,4) contendo alíquotas entre 0,5 a 4,0 mL de metanol. Um teste com dispersão aquosa tamponada sem solvente orgânico também foi realizado, pois a partir dele, foi possível fazer uma comparação de variação de sinal (aumento ou decréscimo) quando da inclusão do metanol. De acordo com os resultados apresentados na Figura 36, conclui-se que a adição de 1,0 mL de metanol promoveu um aumento de cerca de 20% na intensidade de sinal fotoluminescente emitido pelos QDs dispersos no meio

aquoso. Nessa situação, a estabilidade do sinal foi alcançada aproximadamente a partir de 30 min após o preparo da dispersão. Volumes maiores que 1,0 mL de metanol promoveram um decréscimo significativo no sinal da sonda. Este fato pode ser atribuído ao favorecimento da precipitação de parte dos nanocristais dispersos no meio. Portanto, um volume final de 1,0 mL de metanol (considerando também os volumes de metanol presentes nas alíquotas de flavonoides que serão adicionadas às dispersões) foi escolhido para a composição das dispersões de trabalho dos QDs de 3MPA-CdTe. A fração de metanol corresponde a 10% v/v do volume total de cada dispersão.

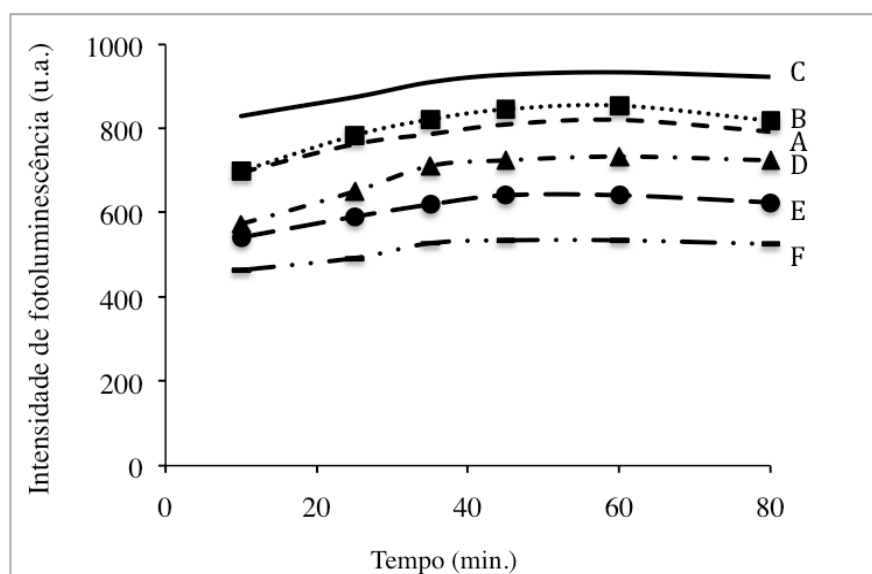


Figura 36 – Avaliação do efeito de metanol na fotoluminescência das dispersões aquosas de 3MPA-CdTe ($9,2 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de alíquotas de 0 (A); 0,5 (B); 1,0 (C); 2,0 (D); 3,0 (E) e 4,0 mL (F) do solvente orgânico metanol.

Ao término da etapa de otimização das condições foi determinado que as dispersões aquosas deveriam ser constituídas por 60 μL de dispersão estoque dos QDs de 3MPA-CdTe, 1,0 mL de tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,4), 1,0 mL de metanol e água ultrapura suficiente para avolumar balões volumétricos de 10,00 mL.

5.4.

Avaliação do efeito causado pelos flavonóides na fotoluminescência da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso

Um estudo preliminar do efeito da presença de diferentes flavonóides no comportamento do sinal medido das dispersões dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso foi realizado, a fim de se avaliar, dentre os onze flavonóides testados, quais tinham maior ou menor interação com a sonda, e com isso, identificar as mais promissoras para dar continuidade ao trabalho de natureza analítica.

A avaliação da interação QDs-flavonóide foi feita em função da variação na magnitude da fotoluminescência da sonda, com os resultados expressos pela razão L_0/L , onde L_0 e L representam respectivamente as intensidades sinal (medido em 527 nm) na ausência e na presença do flavonóide. Nesse estudo, as concentrações de cada flavonóide presente nas dispersões dos QDs de 3MPA-CdTe (na condição otimizada) foram fixadas em três níveis: $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A fim de avaliar se o pH do meio modificaria a resposta de cada flavonóide foram realizadas medições em dispersões contendo tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) com valores de pH 6,0; 7,0; e 8,0. Na ausência de interação com os QDs, o valor de L_0/L é igual à unidade (1,00), pois, nesse caso os valores de L e de L_0 seriam iguais. Porém, considerou-se uma variação da razão L_0/L igual a 0,05 (na faixa de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) como indicativo para a interação entre QDs-flavonóide, isto é, o flavonóide afetaria o sinal da sonda quando os valores de L_0/L fossem maiores do que 1,05 ou menores que 0,95. Esse valor equivale a uma variação de 5% no sinal analítico da sonda, embora o desvio padrão relativo percentual das dispersões branco (na ausência de flavonóide) seja inferior a 2%, o valor de 0,05 da razão L_0/L foi estabelecido a fim de garantir a identificação de uma atenuação efetiva do sinal excluindo a possibilidade de pequenas variações que pudessem ser interpretadas como um falso resultado positivo. Os valores de L foram corrigidos nos comprimentos de onda de 460 (λ_{ex}) e 527 nm (λ_{em}) a fim de corrigir quaisquer contribuição de atenuação do sinal devido a efeito de filtro interno. Para a faixa de concentração testada, os valores máximo e mínimo de absorvância nesses

comprimentos de onda foram de 0,06287 (no caso da morina) e 0,00379 (no caso da quercetina), respectivamente.

Na Tabela 5 encontram-se os resultados (L_0/L) dos testes com as substâncias flavona, catequina, hesperetina, taxifolin e naringenina, onde é possível observar que não houve nenhuma interação significativa com os QDs já que quase todos os valores de L_0/L ficaram dentro do limite estipulado (0,95 a 1,05) para a faixa de concentração testada para os flavonóides (de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Na avaliação dos resultados sumarizados na Tabela 6 foi possível perceber com clareza que os flavonóides canferol, morina, rutina, quercetina e miricetina proporcionam um decréscimo efetivo na intensidade do sinal luminescente. Dentre esses, os efeitos menos intensos foram atribuídos a canferol (em dispersão com tampão pH 8,0) e rutina (em dispersão com tampão pH 7,0), e os mais intensos foram provocados pela quercetina e miricetina, em todos os valores de pH testados. A galangina, por sua vez, não provocou nenhuma variação significativa na sonda. Considerando-se esses resultados preliminares, pode-se atribuir como potenciais sítios (presentes na estrutura dos flavonóides) de interação com os QDs, a insaturação no anel C que estende a conjugação eletrônica pelos três anéis e também à presença de substituintes hidroxila no anel B. É importante ressaltar que galangina e a flavona possuem elétrons que podem se deslocar pelos três anéis, mas não possuem substituintes hidroxila no anel B. Desta forma fica claro que para a ocorrência de interação entre flavonóides e QDs esses dois fatores são essenciais.

Tabela 5 – Resposta da sonda dos QDs 3MPA-CdTe em meio aquoso em função da presença dos flavonoides flavona, catequina, hesperetina, taxifolin e naringenina, expressa pela razão L_0/L na presença de tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 6,0, 7,0 e 8,0).

Flavonoide	Concentração do flavonóide na sonda (mol L^{-1})	L_0/L em pH 6,0	L_0/L em pH 7,0	L_0/L em pH 8,0
Flavona	$1,0 \times 10^{-6}$	1,03	1,04	1,00
	$5,0 \times 10^{-6}$	1,05	1,05	1,02
	$1,0 \times 10^{-5}$	1,03	1,03	1,02
Catequina	$1,0 \times 10^{-6}$	1,03	0,98	1,02
	$5,0 \times 10^{-6}$	1,04	1,03	0,99
	$1,0 \times 10^{-5}$	1,03	0,96	0,99
Hesperetina	$1,0 \times 10^{-6}$	1,01	0,92	0,99
	$5,0 \times 10^{-6}$	1,03	0,92	1,00
	$1,0 \times 10^{-5}$	1,02	0,96	1,02
Taxifolin	$1,0 \times 10^{-6}$	0,98	0,94	0,97
	$5,0 \times 10^{-6}$	0,96	0,95	1,00
	$1,0 \times 10^{-5}$	0,96	0,97	0,96
Naringenina	$1,0 \times 10^{-6}$	1,03	1,03	1,03
	$5,0 \times 10^{-6}$	1,02	1,04	1,02
	$1,0 \times 10^{-5}$	1,03	1,02	1,03

Tabela 6 – Resposta da sonda dos QDs 3MPA-CdTe em meio aquoso em função da presença dos flavonoides galangina, quercetina, rutina, miricetina, canferol e morina, expressa pela razão L_0/L na presença de tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 6,0, 7,0 e 8,0).

Flavonoide	Concentração do flavonóide na sonda (mol L^{-1})	L_0/L em pH 6,0	L_0/L em pH 7,0	L_0/L em pH 8,0
Galangina	$1,0 \times 10^{-6}$	1,01	1,00	1,00
	$5,0 \times 10^{-6}$	1,04	1,00	1,02
	$1,0 \times 10^{-5}$	1,03	1,03	1,02
Quercetina	$1,0 \times 10^{-6}$	1,02	1,00	1,02
	$5,0 \times 10^{-6}$	1,04	1,06	1,05
	$1,0 \times 10^{-5}$	1,11	1,13	1,13
Rutina	$1,0 \times 10^{-6}$	0,99	1,00	1,02
	$5,0 \times 10^{-6}$	1,03	1,02	1,03
	$1,0 \times 10^{-5}$	1,04	1,05	1,05
Miricetina	$1,0 \times 10^{-6}$	1,09	1,03	1,22
	$5,0 \times 10^{-6}$	1,20	1,28	3,00
	$1,0 \times 10^{-5}$	1,35	1,63	3,90
Canferol	$1,0 \times 10^{-6}$	1,09	0,99	1,03
	$5,0 \times 10^{-6}$	1,07	1,07	1,06
	$1,0 \times 10^{-5}$	1,09	1,09	1,08
Morina	$1,0 \times 10^{-6}$	0,96	0,92	0,95
	$5,0 \times 10^{-6}$	0,99	1,03	1,04
	$1,0 \times 10^{-5}$	1,03	1,06	1,06

5.4.1.

Supressão de fotoluminescência e estudos de mecanismos de interação entre os flavonóides rutina, canferol, morina, quercetina e miricetina e a sonda 3MPA-CdTe em meio aquoso

A supressão de fotoluminescência da sonda causada pela presença dos flavonóides miricetina, canferol, rutina, quercetina e morina foi estudada em maiores detalhes para se verificar a estabilidade do sinal e a magnitude da supressão de sinal da sonda na presença do flavonóide. As condições da sonda foram as previamente otimizadas, porém com o ajuste do pH do tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) na faixa 6,0 a 8,0. Para aqueles flavonóides que promoveram supressão atingindo estabilidade de sinal da sonda, o modelo de Stern-Volmer foi escolhido para se avaliar a linearidade da relação entre a supressão do sinal e o aumento na concentração do flavonóide. Parâmetros de constante de Stern-Volmer, constante de ligação e número de sítios de interação, foram devidamente calculados e, a partir deles, foi possível identificar qual flavonóide apresentou maior interação com a sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso.

5.4.1.1.

Estudo de interação pelo efeito do flavonóide canferol na fotoluminescência da sonda dos QDs 3MPA-CdTe em meio aquoso

Nesta etapa, um estudo inicial foi realizado com o flavonóide canferol na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para verificar a estabilidade da atenuação da fotoluminescência em função do tempo, em dispersões contendo tampão com pH 6,0; 7,0; 7,4; e 8,0 ao longo de 80 min. Os valores de L_0/L (valores corrigidos) mostrados na Tabela 7, indicaram que, de uma maneira geral, a partir de 35 min, os testes em dispersões contendo tampão de pH 7,0; 7,4 e 8,0 foram bem similares e produziram sinais estáveis.

Tabela 7 – Resposta da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso, em função da presença de canferol ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), expressa pela razão L_0/L na presença de 1,0 mL de metanol e tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 6,0; 7,0; 7,4 e 8,0).

Tempo (min.)	L_0/L em pH 6,0	L_0/L em pH 7,0	L_0/L em pH 7,4	L_0/L em pH 8,0
10	1,07	1,04	1,07	1,06
25	1,10	1,05	1,07	1,08
35	1,09	1,07	1,08	1,08
50	1,07	1,08	1,09	1,09
80	1,08	1,07	1,08	1,09

De acordo com Javanovic *et al.* (1994), os valores experimentais (em meio hidroalcoólico) de pK_{a1} e pK_{a2} para o canferol são respectivamente 8,2 e 9,5. Esses valores são referentes as hidroxilas ligadas aos carbono 7 do anel A e ao carbono 4' do anel B (Figura 37A). A partir desses dados foi possível calcular os valores de pH (aproximados) nos quais começam a ocorrer as desprotonações dessas duas hidroxilas (fixando-se a concentração canferol em $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Os valores de pH encontrados foram de 6,6 e 7,2, respectivamente para a primeira e segunda desprotonações. Portanto acredita-se que a interação com a sonda ocorreria com o flavonóide presente na dispersão tanto na forma (estrutura) original protonada quanto nas desprotonadas (íons fenóxidos) (Figura 37B e 37C), considerando o resultado experimental obtido em pH 6,0 (Tabela 8) e os valores de pH estimado para as desprotonações. Constatou-se também que, no caso do canferol, o fato de ocorrer desprotonação ou não das duas hidroxilas, destacadas em vermelho na Figura 37A, não modifica o efeito na resposta fotoluminescente da sonda, visto que em dispersões contendo tampão (pH 7,4) a razão L_0/L não difere muito da obtida em dispersões contendo tampão (pH 6,0). Ou seja, o aumento na quantidade de cargas negativas na estrutura do canferol não interfere na interação QDs-flavonóide. Devido a deslocalização eletrônica existente entre os três anéis na estrutura do canferol é possível que os íons fenóxidos possam gerar outras estruturas estabilizadas por ressonância, das quais algumas são mostradas na Figura 38.

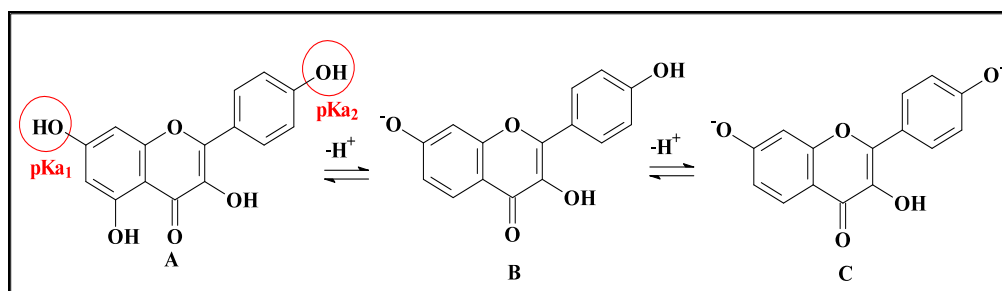


Figura 37 - Estrutura química do canferol com as hidroxilas referentes aos pK_{a1} e pK_{a2} circuladas em vermelho (A), desprotonação da primeira hidroxila (B), desprotonação da segunda hidroxila (C).

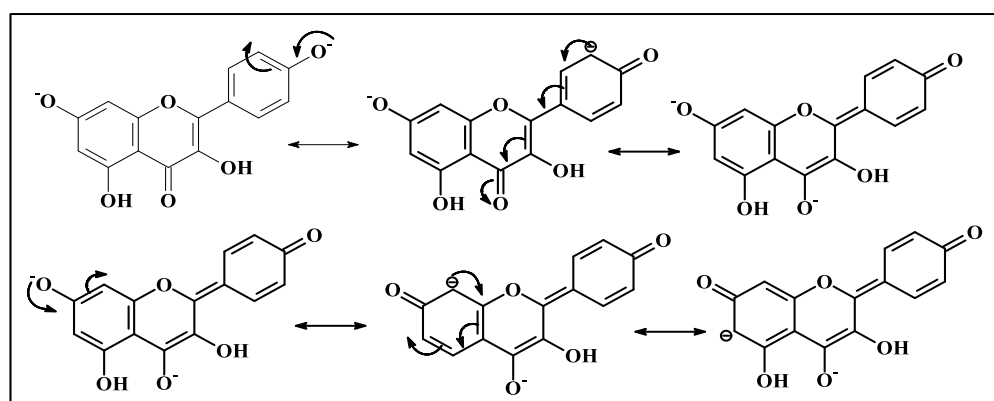


Figura 38 - Estruturas canônicas de ressonância provenientes da desprotonação das duas hidroxilas do canferol (ion fenóxido).

A fim de estabelecer um modelo de resposta entre a intensidade de sinal fotoluminescente dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso na presença de canferol, diferentes alíquotas de uma solução de canferol $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionados às dispersões na condição otimizada. As curvas de supressão de luminescência obtidas na presença de canferol indicam variação de sinal da sonda, em meio aquoso, proporcional ao aumento da concentração de canferol na faixa de $1,0 \times 10^{-5}$ a $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 39). A correção dos valores de absorvância do analito foram feitas (obtida pela Equação 7) nos comprimentos de onda de excitação e emissão (460 e 527 nm respectivamente) do QDs. Os valores de absorvância mostrados na Tabela 8 indicaram os limites mínimo de 0,00581 e máximo de 0,03458, onde os valores maiores de absorvância foram referentes ao comprimento de onda de 460 nm. As curvas obtidas com e sem correção dos valores de absorvância e as respectivas equações do modelo apresentaram inclinações semelhantes. As curvas de supressão apresentaram as seguintes

equações: $L_0/L = 5771 [\text{canferol}] + 1,018$ ($R^2 = 0,991$) (curva sem correção) e $L_0/L = 5594[\text{canferol}] + 1,019$ ($R^2 = 0,989$) (curva com correção). Portanto, conclui-se que para o canferol não é necessário fazer correção de efeito filtro e que a atenuação do sinal da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso foi devido ao efeito de contato (interação) do canferol com os QDs. Na Tabela 8 encontram-se também os parâmetros de L_0/L corrigidos e não corrigidos para a faixa de concentração do canferol.

Tabela 8 – Dados das medições realizadas em dispersões de trabalho em meio aquoso, em pH 6,0 (na condição otimizada) na presença de canferol ($1,0 \times 10^{-5}$ a $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

Concentração de canferol (mol L^{-1})	L_0 e L sem correção	L_0/L sem correção	Absorvância em 460nm	Absorvância em 527nm	L_0 e L corrigidos	L_0/L corrigido
0	621		0,02087	0,00563	640	
$1,0 \times 10^{-5}$	568	1,09	0,02212	0,00581	585	1,09
$2,0 \times 10^{-5}$	533	1,14	0,02495	0,00584	552	1,14
$6,0 \times 10^{-5}$	455	1,36	0,03458	0,00827	478	1,35

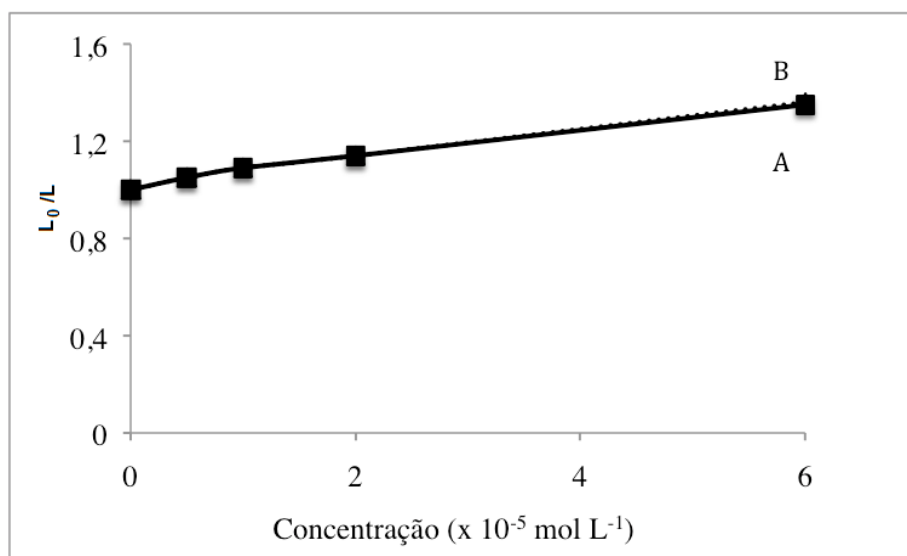


Figura 39 - Curva de supressão de fotoluminescência da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso, na presença de canferol. (A) curva corrigida para potencial efeito filtro ($y = 5594x + 1,019$) e (B) curva não corrigida para potencial efeito filtro ($y = 5771x + 1,018$).

5.4.1.2.

Estudo de interação pelo efeito do flavonóide morina na fotoluminescência da sonda dos QDs 3MPA-CdTe em meio aquoso

Da mesma forma conforme descrito para canferol, foi realizado um estudo para avaliar o efeito de supressão de fotoluminescência promovida pelo flavonóide morina, na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em dispersões contendo tampão na faixa de pH de 6,0 a 8,0 e medir a estabilidade do sinal nessas condições. Os resultados apresentados na Tabela 9 indicaram que a razão L_0/L (valores corrigidos) apresentou um comportamento similar na faixa de pH do tampão de 6,0 a 7,4, contudo em dispersões contendo tampão com pH 8,0 não foi confirmada a supressão de luminescência e sim uma tendência no aumento da intensidade do sinal a partir de 25 min como indicado pelos valores da razão L_0/L menores que 1. A estrutura química da morina apresenta uma hidroxila a mais no anel B (em posição *meta*) quando comparada com a do canferol. A princípio percebe-se que esta hidroxila adicional, localizada no carbono 2', prejudica a interação que gera supressão de fotoluminescência na sonda dos QDs de 3MPA-CdTe, pois a supressão do sinal causada pela morina foi menor do que a provocada pelo canferol, considerando ambos flavonóides na mesma concentração.

Tabela 9 - Resposta da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso, em função da presença de morina ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), expressa pela razão L_0/L na presença de 1,0 mL de metanol e tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 6,0; 7,0; 7,4 e 8,0).

Tempo (min.)	L_0/L em pH 6,0	L_0/L em pH 7,0	L_0/L em pH 7,4	L_0/L em pH 8,0
10	1,02	1,01	1,01	1,00
25	1,04	1,03	1,04	1,00
35	1,05	1,04	1,05	0,98
50	1,02	1,03	1,01	0,96
80	1,02	1,02	1,03	0,96

A partir dos valores de pK_{a1} , pK_{a2} e pK_{a3} (4,97, 8,23 e 10,34 respectivamente) estimados por Herrero-Martínez *et al.* (2008) para morina em meio hidroalcoólico, foi possível estimar os valores de pH referentes as ionizações das hidroxilas presentes na estrutura desse flavonóide (concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Na Figura 40A estão representadas, com um círculo vermelho, as hidroxilas que podem sofrer desprotonação. De acordo com os cálculos acredita-se que as ionizações da molécula, com perda dos prótons das hidroxilas, começam a ocorrer nos valores de pH de 5,0; 6,6 e 7,7. Vale a pena ressaltar que a primeira ionização na morina começa a ocorrer em pH 5,0 (referente ao pK_{a1}) que é mais baixo do que a observada para o canferol. Tal fenômeno é justificado pela formação de ligação de hidrogênio intramolecular com o oxigênio do anel C (via anel de seis membros) que, por sua vez, eleva acidez do próton devido ao fato da ligação de hidrogênio enfraquecer a ligação covalente da hidroxila. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10, observa-se que em dispersões contendo tampão até pH 7,4 existe uma leve tendência da morina suprimir a fotoluminescência da sonda, porém a supressão efetiva não é caracterizada, já que todos os valores não superam a razão de L_0/L de 1,05. Provavelmente, até esse valor de pH, estejam presentes no meio as estruturas referentes aos íons fenóxidos B e C mostradas na Figura 40. Por outro lado, estima-se que a terceira ionização deva começar a ocorrer em pH superior a 7,7. Por analogia, a partir dos resultados obtidos em pH 8,0, sumarizados na Tabela 10, acredita-se que uma elevada fração da morina na dispersão tenha perdido prótons formando o íon fenóxido representado pela estrutura D na Figura 40. Essa espécie é provavelmente a responsável pela inibição da tendência de supressão de fotoluminescência, já que os valores para a razão L_0/L se tornam menores que 1,00. Esse comportamento da sonda (em dispersões contendo tampão com pH 8,0) pode significar uma tendência de interação com os íons Cd^{2+} disponíveis na superfície do QDs. Outra hipótese especulada é que esse íon fenóxido poderia revestir parte da superfície dos QDs que por ventura não estivessem capeadas com 3MPA.

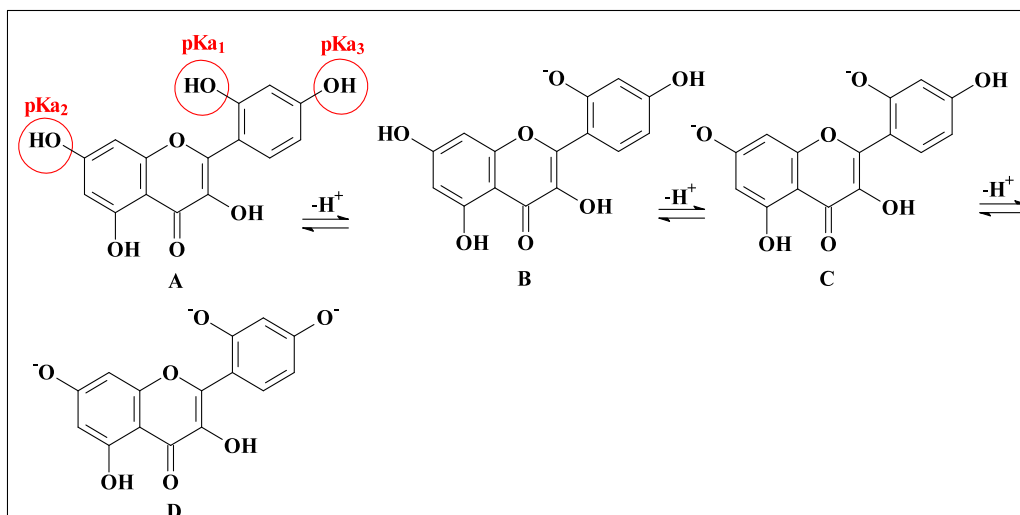


Figura 40 - Estrutura química da morina com as hidroxilas referentes a pK_{a1}, pK_{a2} e pK_{a3} circuladas em vermelho (A), desprotonação da primeira hidroxila (B), desprotonação da segunda hidroxila (C) e desprotonação da terceira hidroxila (D).

O modelo de Stern-Volmer utilizado para obtenção das curvas de supressão com e sem correção, proporcional a concentração de morina na faixa de $5,0 \times 10^{-6}$ a $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, forneceu as equações $L_0/L = 3134 [\text{morina}] + 1,014$ ($R^2 = 0,987$) (curva sem correção) e $L_0/L = 4027 [\text{morina}] + 1,014$ ($R^2 = 0,992$) (curva com correção), como pode ser visto na Figura 41. Os valores de absorvância na Tabela 10 indicaram um perfil de absorção para morina mais elevado quando comparado com o canferol, portanto nesse caso, a correção faz-se necessária, pois há uma contribuição relevante de efeito de filtro interno na resposta de atenuação de sinal da sonda. Tal fato pode ser confirmado pela diferença de 20% nas inclinações das curvas corrigida e não corrigida para efeito filtro. Na Tabela 10 encontram-se também os parâmetros de L_0/L corrigidos e não corrigidos.

Tabela 10 - Dados das medições realizadas em dispersões de trabalho em meio aquoso (na condição otimizada) na presença de morina ($5,0 \times 10^{-6}$ a $6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹).

Concentração de morina (mol L ⁻¹)	L ₀ e L sem correção	L ₀ /L sem correção	Absorvância em 460 nm	Absorvância em 527 nm	L ₀ e L corrigidos	L ₀ /L corrigido
0	621	1,00	0,02087	0,00563	640	1,00
$5,0 \times 10^{-6}$	589	1,04	0,0219	0,00499	607	1,04
$1,0 \times 10^{-5}$	585	1,06	0,02643	0,00654	607	1,05
$2,0 \times 10^{-5}$	564	1,10	0,03574	0,00947	594	1,08
$4,0 \times 10^{-5}$	500	1,18	0,05091	0,01198	538	1,14
$6,0 \times 10^{-5}$	502	1,25	0,06287	0,01375	548	1,20

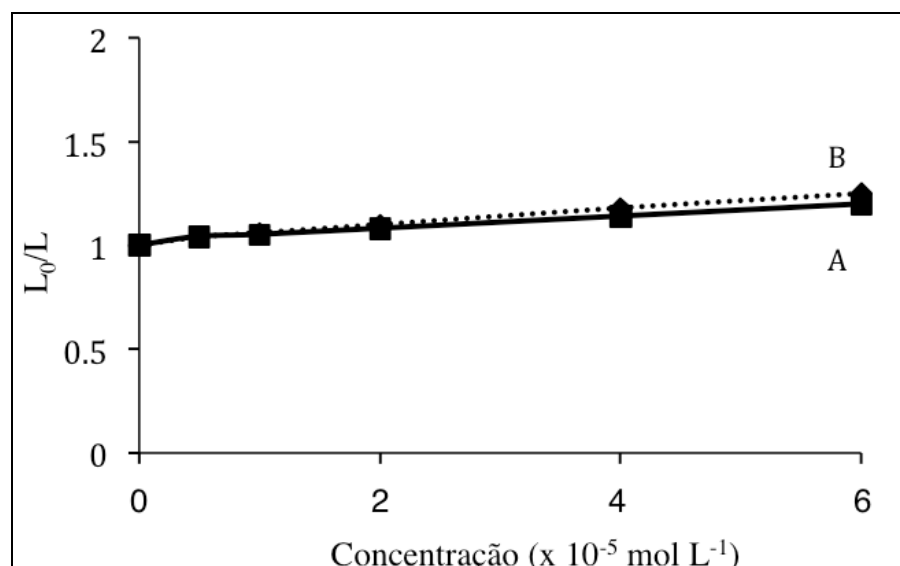


Figura 41 - Curva de supressão de fotoluminescência da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso, na presença de morina. (A) curva não corrigida para potencial efeito filtro ($y = 3134x + 1,014$) e (B) curva corrigida para potencial efeito filtro ($y = 4027x + 1,014$).

5.4.1.3.

Estudo de interação pelo efeito do flavonóide quercetina na fotoluminescência da sonda dos QDs 3MPA-CdTe em meio aquoso

Na presença de quercetina na concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, os valores das razões L₀/L (valores corrigidos) presentes na Tabela 11, indicaram significativo efeito de supressão de fotoluminescência da sonda contendo tampão na faixa de pH de 7,0 a 8,0 e indicou também a estabilidade de sinal, após a supressão provocada pela quercetina, a partir de 35 min da preparação da sonda.

Em dispersões contendo tampão pH 6,0 obteve-se uma supressão ainda mais acentuada, porém, o sinal se mostrou instável no intervalo de tempo entre 35 e 80 min, o que inviabiliza a realização de medições confiáveis.

Tabela 11 - Resposta da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso, à presença de quercetina ($1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹), expressa pela razão L_0/L na presença de tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ e 1,0 mL de metanol, nos valores de pH 6,0; 7,0; 7,4 e 8,0.

Tempo (min.)	L_0/L em pH 6,0	L_0/L em pH 7,0	L_0/L em pH 7,4	L_0/L em pH 8,0
10	1,14	1,09	1,13	1,11
25	1,15	1,14	1,14	1,10
35	1,12	1,12	1,12	1,12
50	1,20	1,13	1,12	1,13
80	1,21	1,13	1,13	1,12

No anel B da quercetina, assim como no da morina, estão presentes dois substituintes hidroxila, porém na estrutura química da quercetina eles estão em posição *orto*. Comparando os resultados promovidos pelos dois flavonóides, foi possível identificar que esses substituintes em posição *orto* são fundamentais na interação de supressão de sinal da sonda, uma vez que essa é a única diferença estrutural entre as moléculas de morina e quercetina.

De acordo com Javanovic *et al.* (1994), os valores experimentais (em meio hidroalcoólico) de pK_{a1} , pK_{a2} e pK_{a3} para quercetina são respectivamente 6,74, 9,02 e 11,55. Tais valores são referentes as hidroxilas, circuladas em vermelho, presentes na estrutura A da Figura 42. De posse dos dados de pK_a foi possível estimar os valores de pH (concentração de quercetina em $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) nos quais poderiam começar a ocorrer as ionizações das três hidroxilas. Esses valores de pH críticos são 5,9, 7,1 e 8,3. Comparando-se essas estimativas com os resultados experimentais apresentados na Tabela 12, observa-se que dispersões contendo tampão na faixa de pH de 6,0 a 8,0, a supressão de fotoluminescência praticamente não foi influenciada pelas duas primeiras ionizações, cujas estruturas (íons fenóxidos) estão representadas por B e C na Figura 42. Desta forma propõe-se que tanto as estruturas B e C, representadas na Figura 42, quanto a estrutura E, representada na Figura 43, esta última gerada pela oxidação da quercetina (formação de quinona) contribuam de modo efetivo

para interação que promove a supressão de fotoluminescência da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso. Dados de Aucelio *et al.* (2013), demonstraram que o sistema quinônico presente nas estruturas das substâncias bioativas lapachol e β -lapachona agem como aceptores de elétrons, abstraindo densidade eletrônica de nanopartículas de 3MPA-CdTe dispersas em meio aquoso. Como consequência desse fenômeno observou-se a supressão do tipo estático de fotoluminescência da sonda.

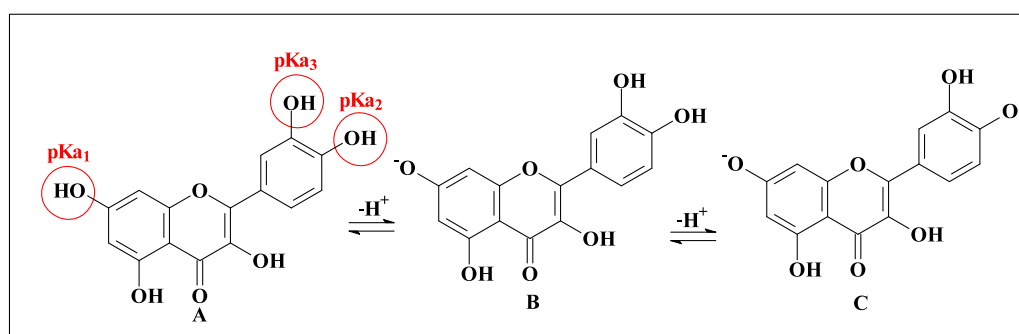


Figura 42 – Estrutura química da quercetina com as hidroxilas referentes a pKa₁, pKa₂ e pKa₃ circuladas em vermelho (A), desprotonação da primeira hidroxila (B), desprotonação da segunda hidroxila (C).

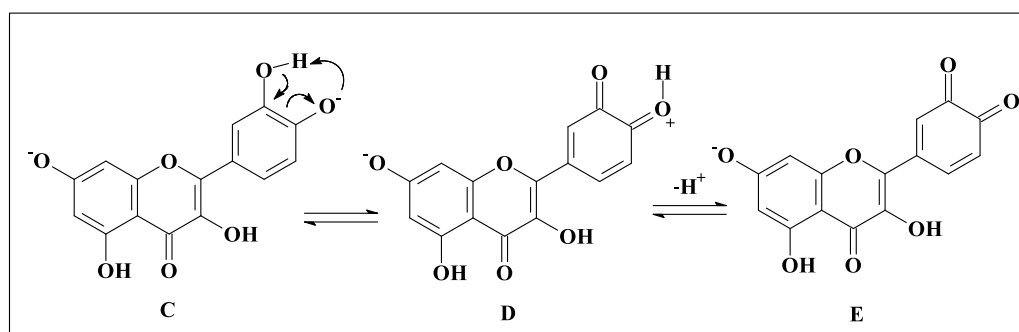


Figura 43 - Oxidação da molécula de quercetina.

O modelo de Stern-Volmer utilizado para obtenção das curvas de supressão (com e sem correção para efeito filtro) em função do aumento da concentração de quercetina (na faixa de $5,0 \times 10^{-6}$ a $6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) forneceu as equações: $L_0/L = 12400 [\text{quercetina}] + 1,009$ ($R^2 = 0,9941$) (curva com correção) e $L_0/L = 11293 [\text{quercetina}] + 1,015$ ($R^2 = 0,9929$) (curva sem correção). Assim como observado para morina, na curva quercetina sem correção verifica-se contribuição de efeito de filtro interno, justificada pela inclinação um

pouco mais acentuada (em torno de 10%) conforme visto na Figura 44. Na Tabela 12 encontram-se também os parâmetros de L_0/L corrigidos e não corrigidos, bem como os valores de absorvância referentes aos comprimentos de onda de 460 e 527 nm.

Tabela 12 - Dados das medições realizadas em dispersões de trabalho em meio aquoso (na condição otimizada) na presença de quercetina ($5,0 \times 10^{-6}$ a $6,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}).

Concentração de quercetina (mol L^{-1})	L_0 e L sem correção	L_0/L sem correção	Absorvância em 460 nm	Absorvância em 527 nm	L_0 e L corrigidos	L_0/L corrigido
0	621	1,00	0,02087	0,00563	640	1,00
$5,0 \times 10^{-6}$	583	1,05	0,02164	0,0037	600	1,06
$1,0 \times 10^{-5}$	535	1,16	0,02492	0,004256	553	1,15
$2,0 \times 10^{-5}$	484	1,28	0,02849	0,004958	503	1,27
$4,0 \times 10^{-5}$	420	1,48	0,04209	0,005034	443	1,44
$6,0 \times 10^{-5}$	352	1,76	0,05144	0,004968	376	1,70

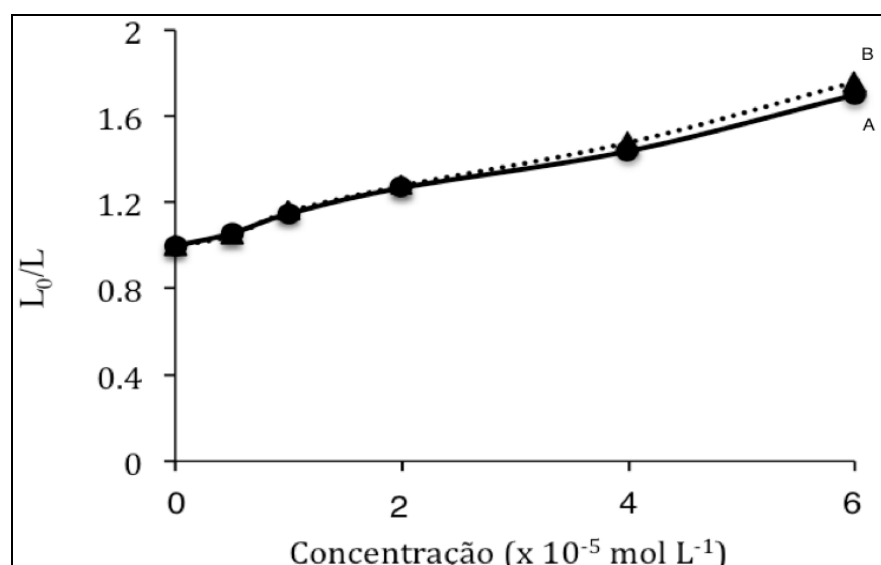


Figura 44 - Curva de supressão de fotoluminescência da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso, na presença de quercetina. (A) curva não corrigida para potencial efeito filtro ($y = 11293x + 1,015$) e (B) curva corrigida para potencial efeito filtro ($y = 12400x + 1,009$).

5.4.1.4.

Estudo de interação pelo efeito do flavonóide rutina na fotoluminescência da sonda dos QDs 3MPA-CdTe em meio aquoso

O efeito da presença de rutina (na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na intensidade e na estabilidade da fotoluminescência da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe foi estudada em dispersões contendo tampão na faixa de pH de 6,0 a 8,0. Os resultados estão sumarizados na Tabela 13. A partir da razão L_0/L (valores corrigidos), foi possível constatar que a magnitude da supressão do sinal da sonda é muito semelhante em dispersões contendo tampão com pH 7,0 a 8,0, considerando-se medição após 35 min da preparação da dispersão de trabalho. Similarmente ao observado nos testes de estabilidade dos demais flavonóides, verificou-se um leve aumento nos valores L_0/L nas dispersões com pH 6,0. Como o fato é recorrente para os quatro flavonóides testados até o momento, acredita-se que essa tendência (de maior variação da razão L_0/L) pode ser decorrente da variação natural de sinal da própria sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em pH 6,0 e não devido à presença do flavonóide.

Tabela 13 - Resposta da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso, à presença de rutina ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), expressa pela razão L_0/L na presença de tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e 1,0 mL de metanol, nos valores de pH 6,0; 7,0; 7,4 e 8,0

Tempo (min.)	L_0/L em pH 6,0	L_0/L em pH 7,0	L_0/L em pH 7,4	L_0/L em pH 8,0
10	1,08	1,08	1,07	1,04
25	1,10	1,09	1,06	1,07
35	1,07	1,08	1,07	1,09
50	1,09	1,07	1,09	1,08
80	1,11	1,08	1,06	1,08

Um ponto importante a ser levantado é que quando são comparadas as estruturas químicas de rutina e quercetina, a única diferença é que a rutina possui uma unidade rutinosídeo (substituindo volumoso) ligada ao carbono 3 do anel C. A presença de uma unidade de rutinosídeo provavelmente é a responsável pelo menor efeito de supressão de fotoluminescência da sonda promovido pela rutina em comparação ao observado para a quercetina. Considerando-se as mesmas condições, os valores médios de L_0/L da quercetina foi 1,12 enquanto o da rutina

foi 1,08. Especula-se que essa diferença (embora pequena) possa sugerir o efeito de impedimento estérico causado pela presença do substituinte rutinosídeo, que pode desfavorecer a aproximação entre o flavonóide e os QDs. Quando comparados, os valores de pK_a descritos para quercetina e rutina por Javanovic *et al.* (1994), constata-se que eles são bem semelhantes (em meio hidroalcoólico). Os valores de pK_{a1} , pK_{a2} e pK_{a3} reportados para rutina são 7,1, 9,5 e 11,5 (referentes as hidroxilas circuladas em vermelho na Figura 45). Considerando-se esses dados e a concentração rutina ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) estimou que os valores de pH nos quais começam a ocorrer a ionização da rutina são 6,0; 7,1 e 8,3. Assim como para a quercetina, a variação do pH das dispersões contendo rutina não afetou a magnitude da supressão de sinal da sonda provocada por este flavonóide. Assim, no caso da rutina, o impedimento estérico seria o fator crucial para o decréscimo na interação com a sonda.

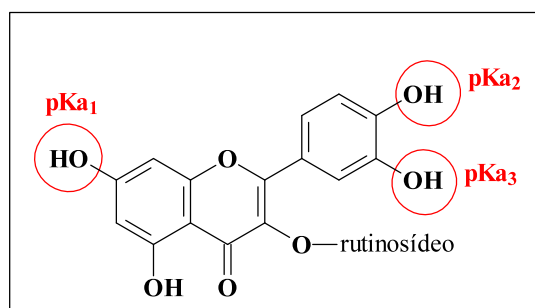


Figura 45 – Estrutura química da rutina com as hidroxilas referentes a pK_{a1} , pK_{a2} e pK_{a3} circuladas em vermelho.

Na faixa de concentração de $1,0$ a $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, o flavonóide rutina promoveu a supressão no sinal das dispersões dos QDs de 3MPA-CdTe que seguiu o modelo de Stern-Volmer, cujas curvas de supressão (com correção e sem correção de efeito filtro causado pelo flavonóide) são mostradas na Figura 46. A equação da curva com correção foi $L_0/L = 4413 [\text{rutina}] + 1,007$ ($R^2 = 0,9938$) enquanto a da curva sem correção foi $L_0/L = 3939 [\text{rutina}] + 1,009$ ($R^2 = 0,9925$). A comparação das inclinações das curvas (diferença em torno de 10%) indica uma discreta contribuição de efeito de filtro quando não é realizada a correção dos valores de absorvância. As intensidades de fotoluminescência corrigidas e não corrigidas na presença rutina, as razões L_0/L e os valores de absorvância estão relacionados na Tabela 14.

Tabela 14 – Dados das medições realizadas em dispersões de trabalho em meio aquoso (na condição otimizada) na presença de rutina ($5,0 \times 10^{-6}$ a $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

Concentração de rutina (mol L^{-1})	L_0 e L sem correção	L_0/L sem correção	Absorvância em 460 nm	Absorvância em 527 nm	L_0 e L corrigidos	L_0/L corrigido
0	428	1,00	0,02087	0,008583	442	1,00
$5,0 \times 10^{-6}$	416	1,05	0,025647	0,008339	420	1,05
$1,0 \times 10^{-5}$	386	1,11	0,0267	0,006509	401	1,10
$2,0 \times 10^{-5}$	360	1,18	0,035481	0,006862	378	1,17
$6,0 \times 10^{-5}$	347	1,27	0,042657	0,007443	368	1,24

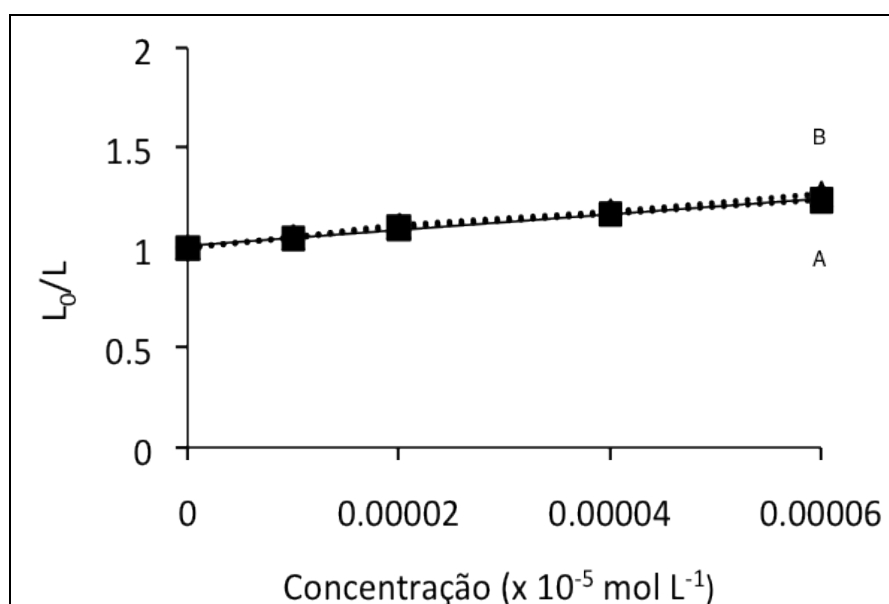


Figura 46 - Curva de supressão de fotoluminescência da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso, na presença de rutina. (A) curva não corrigida para potencial efeito filtro ($y = 3939x + 1,009$) e (B) curva corrigida para potencial efeito filtro ($y = 4413x + 1,007$).

5.4.1.5.

Estudo de interação pelo efeito do flavonóide miricetina na fotoluminescência da sonda dos QDs 3MPA-CdTe em meio aquoso

O estudo indicou a falta de estabilidade do sinal da sonda, em função do tempo, na presença de miricetina (na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em dispersões contendo tampão na faixa de pH de 6,0 a 8,0. Uma tendência de aumento da supressão ao longo do tempo foi verificada em todas as dispersões testadas, contudo observou-se que essa tendência é mais pronunciada em dispersões contendo tampão a partir do pH 7,0, conforme visto na Figura 47, na qual se mostra os gráficos de L_0/L (com valores corrigidos) em função do tempo.

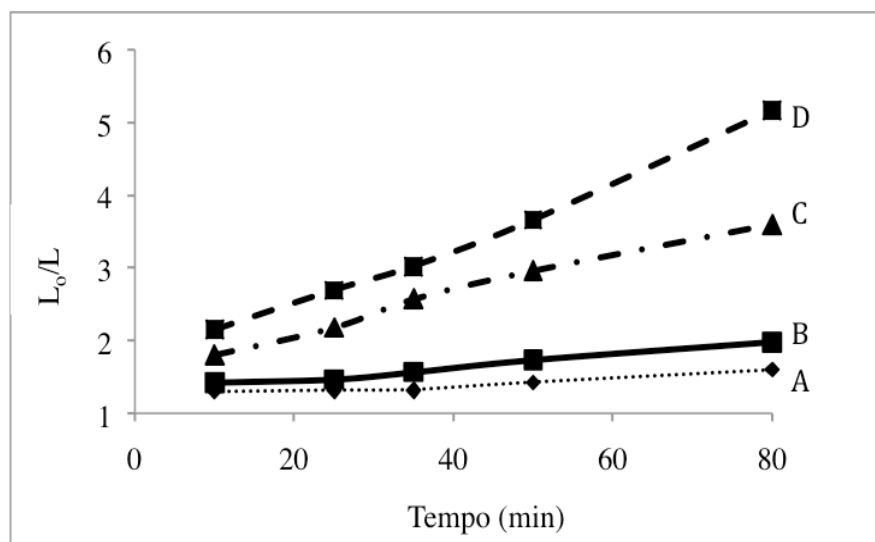


Figura 47 – Resposta da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso, na presença de miricetina ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), em tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ nos valores de pH: (A) 6,0, (B) 7,0, (C) 7,4 e (D) 8,0.

A tendência do aumento na supressão de sinal da sonda foi correlacionada, em parte, com as sucessivas desprotonações das hidroxilas, circuladas em vermelho, representadas na Figura 48 (estrutura A). Para obtenção dos valores de pK_a da miricetina utilizou-se o programa computacional Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) citado por Verdan *et al.* (2011). Lançou-se mão dessa ferramenta devido a escassez de dados na literatura sobre a miricetina, o que possivelmente é devido a instabilidade gerada na molécula de miricetina após a primeira ionização, ou até mesmo devido à sua oxidação, que inviabiliza a realização das determinações experimentais de pK_a com base na

estrutura química de origem. Através da simulação, foram obtidos os valores de $6,89 \pm 0,60$, $7,22 \pm 0,60$ e $9,21 \pm 0,15$ respectivamente para pK_{a1} , pK_{a2} e pK_{a3} . Considerando a concentração de miricetina presente na sonda ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e os valores de pK_a , sugere-se que as ionizações (com formação dos íons fenóxidos representados na Figura 46 nas estruturas B, C e D) começam a ocorrer nos valores de pH próximos de 6,0; 6,1 e 7,1. As desprotonações das três hidroxilas são responsáveis pela supressão cada vez mais significativa e acentuada do sinal fotoluminescente em função do aumento do pH do meio. Essa hipótese foi justificada principalmente a partir dos resultados indicados na Figura 47, obtidos em dispersões contendo tampão com pH 6,0 a 8,0 onde é possível observar claramente a tendência na elevada inclinações das curvas após 35 min. Em pH básico, percebe-se que a instabilidade no sistema é maior ainda. Mesmo não ocorrendo outras desprotonações referente ao pK_a é provável que a elevação do pH favoreça o desencadeamento de processos oxidativos, gerando uma infinidade de subprodutos reativos (como os representados pela estruturas G e H na Figura 49), que podem promover a supressão de sinal descontrolada da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso.

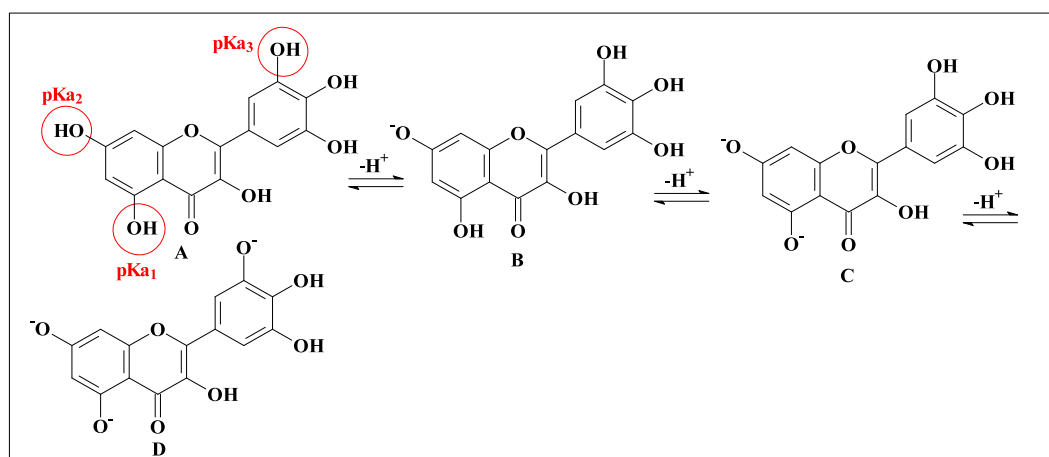


Figura 48 – Estrutura química da miricetina com as hidroxilas referentes a pK_{a1} , pK_{a2} e pK_{a3} circuladas em vermelho (A), desprotonação da primeira hidroxila (B), desprotonação da segunda hidroxila (C) e desprotonação da terceira hidroxila (D).

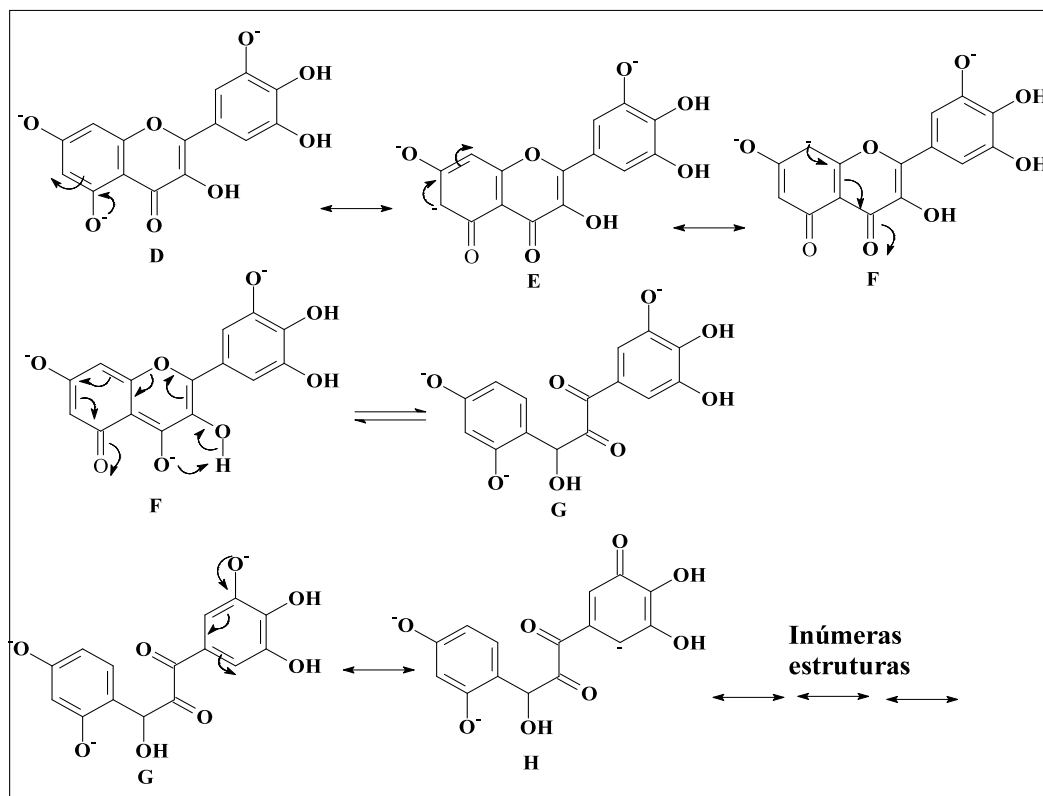


Figura 49 - Propostas de produtos formados gerados a partir das ionizações da miricetina.

5.4.2.

Parâmetros de interação entre os flavonóides (canferol, morina, quercetina e rutina) e os QDs de 3MPA-CdTe: constantes de Stern-Volmer, constante de ligação e número de sítios

A partir dos resultados obtidos nos estudos com as dispersões dos QDs de 3MPA-CdTe na presença de flavonóides verificou-se que canferol, morina, rutina e quercetina promovem a supressão do sinal fotoluminescente do QDs, em meio aquoso, de maneira linear, segundo o modelo de Stern-Volmer, nas faixas de concentrações de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (para quercetina, rutina e morina) e de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para o canferol. Os parâmetros obtidos dos gráficos de supressão, usando o modelo de Stern-Volmer (com correção e sem correção de efeito filtro) são mostrados na Tabela 15. Analisando os valores das constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) das curvas (corrigidas para o efeito filtro), para os quatro flavonóides, verifica-se que a ordem crescente é $K_{SV} \text{ morina} < K_{SV} \text{ rutina} < K_{SV} \text{ canferol} < K_{SV} \text{ quercetina}$, com

este último flavonóide produzindo supressão de fotoluminescência cerca de duas vezes maior que o promovido pelo canferol (o flavonóide, exceto quercetina, que produz supressão mais efetiva de sinal da sonda). Na tentativa de relacionar a ordem do efeito com as estruturas químicas dos flavonóides, conforme visto na Figura 45, a quercetina possui uma hidroxila a mais que o canferol, localizada no anel B, sendo esta provavelmente a responsável pelo incremento de supressão de fotoluminescência da sonda. A rutina, por sua vez, produziu menor efeito na sonda do que quercetina e canferol, devido ao impedimento estérico causado pelo substituinte glicosídico. Já a presença da hidroxila ligada ao carbono 2' na estrutura da morina desfavorece a interação com os QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso, causando o menor efeito de supressão de sinal.

Tabela 15 – Equações das curvas analíticas de Stern-Volmer com e sem correção para potencial efeito filtro para os flavonóides quercetina, canferol, morina e rutina em dispersões contendo tampão ajustado em pH 6,0.

Flavonóide	Faixa linear(mol L ⁻¹)	R ²	Equação da curva	K _{SV} (L mol ⁻¹)
QUE ^a	5,0 x 10 ⁻⁶ a 6,0 x 10 ⁻⁵	0,9926	Y ^c = 12400 X ^d + 1,0090	1,3 x 10 ⁴
CAN ^a	1,0 x 10 ⁻⁵ a 6,0 x 10 ⁻⁵	0,991	Y ^c = 5795 X ^d + 1,0170	5,6 x 10 ³
RUT ^a	1,0 x 10 ⁻⁵ a 6,0 x 10 ⁻⁵	0,9938	Y ^c = 4413,8 X ^d + 1,0072	4,4 x 10 ³
MOR ^a	5,0 x 10 ⁻⁶ a 6,0 x 10 ⁻⁵	0,9921	Y ^c = 4027,9 X ^d + 1,0144	3,8 x 10 ³
QUE ^b	5,0 x 10 ⁻⁶ a 6,0 x 10 ⁻⁵	0,9922	Y ^c = 11293 X ^d + 1,0153	1,2 x 10 ⁴
CAN ^b	1,0 x 10 ⁻⁵ a 6,0 x 10 ⁻⁵	0,99	Y ^c = 5614 X ^d + 1,0180	5,5 X 10 ³
RUT ^b	1,0 x 10 ⁻⁵ a 6,0 x 10 ⁻⁵	0,9925	Y ^c = 3939,7 X ^d + 1,0096	3,8 X 10 ³
MOR ^b	5,0 x 10 ⁻⁶ a 6,0 x 10 ⁻⁵	0,9878	Y ^c = 3134,9 X ^d + 1,0145	2,9 X 10 ³

^a Curva sem correção do efeito filtro

^b Curva com correção do efeito filtro

^c Y = L₀/L

^d X = [flavonoide]

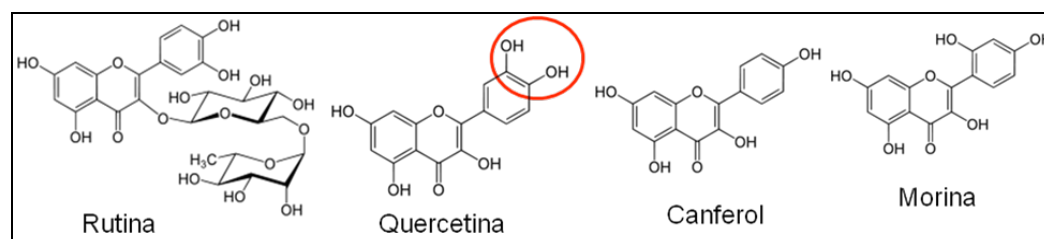


Figura 50 - Estruturas químicas dos flavonóides rutina, quercetina, canferol e morina.

Assumindo supressão do tipo estático, as constantes de ligação (K) entre as espécies (QDs e flavonóide) foram obtidas através de gráficos de $\log [(L_0-L)/L]$ em função do $\log [\text{flavonóide}]$ e da Equação 12, que relaciona as intensidades de fotoluminescência dos QDs na presença e na ausência do flavonóide com a concentração do flavonóide e o número de sítios (n).

$$\log [(L_0-L)/L] = \log K + n \log [\text{flavonóide}] \quad (12)$$

Conforme dados da Tabela 16, os resultados para quercetina demonstraram maior valor para a constante de ligação e maior número de sítios de interação, justificando sua maior eficiência na interação com os QDs em relação aos outros flavonóides testados. A constante de ligação da quercetina é cerca de oito vezes maior que a da rutina, doze vezes maior que a do canferol e cerca de 40 vezes maior que a da morina. De acordo com a literatura (Zhang, 2012) uma forte interação entre analito e supressor é sugerida quando o número de sítios é próximo de 1,0. Fazendo-se uma analogia com os resultados de números de sítios calculados para as curvas na presença dos flavonóides, conclui-se que a interação com os QDs de 3MPA-CdTe, em meio aquoso, com a quercetina, sem dúvida, foi a mais efetiva com número de sítios igual a 0,89. Os números de sítios calculados para os outros flavonóides foram muito próximos refletindo a proximidade dos valores de K_{SV} obtidos pela inclinação das curvas de Stern-Volmer. A propagação de erro associada ao cálculo de n (não computada nesse trabalho) tornam esses três valores praticamente iguais, não se podendo extrapolar a ordem de seus valores com a eficiência da supressão de sinal dos QDs.

Tabela 16 - Equações das curvas de $\log [(L_0-L)/L]$ x $\log [\text{flavonoide}]$, constantes de ligação e número de sítios para quercetina, rutina, canferol e morina

Flavonóide	Equação da curva	Constante de ligação	Número de sítios
Quercetina	$y = 0,89 x + 3,595$	$3,9 \times 10^3$	0,89
Canferol	$y = 0,71 x + 2,531$	$3,4 \times 10^2$	0,71
Rutina	$y = 0,791 x + 2,712$	$5,1 \times 10^2$	0,79
Morina	$y = 0,646 x + 1,988$	$9,7 \times 10^1$	0,65

5.5.

Otimização das condições para realização das medições de fotoluminescência dos QDs 3MPA-CdTe em meio organizado por surfactante

Um estudo do comportamento da fotoluminescência das dispersões constituídas por nanopartículas de 3MPA-CdTe foi realizada em meio aquoso contendo surfactante buscando condições que proporcionassem um sinal estável e intenso. A abordagem usando meio com surfactantes visa também comparar o efeito de supressão de fotoluminescência promovida pelos flavonóides com os obtidos anteriormente na ausência de surfactante. As concentrações micelar crítica (CMC), em água, para os surfactantes CTAB, Triton X-100 e Triton X-114 são respectivamente $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (Javadian *et al.*, 2013), $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (Li *et al.*, 2004;) e $1,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (Besel, 2003). Portanto, utilizou-se na maioria dos experimentos, dispersões contendo quantidade surfactante para a formação de estruturas organizadas. Assim, as dispersões dos QDs de 3MPA-CdTe foram preparadas de forma que a concentração de surfactante fosse fixada em $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ independentemente do tipo de surfactante.

Os primeiros testes foram realizados com dispersões contendo alíquotas de 60 μL (valor de referência otimizado no meio aquoso), 80 μL e 100 μL da dispersão original de síntese (estoque) dos QDs de 3MPA-CdTe, na presença de CTAB (concentração final de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). A excitação da dispersão de trabalho assim obtida foi feita em 460 nm, onde a emissão máxima foi coletada em 529 nm (comprimento de onda máximo deslocado para o vermelho em 2 nm em relação ao observado no meio sem surfactante). Ainda comparado com o comportamento observado em meio sem surfactante, ao se procederem as medições na dispersão contendo CTAB, observou-se que a intensidade da fotoluminescência da dispersão de trabalho, que continha 60 μL da dispersão estoque, foi menor (em torno de 40% menos intenso). Por outro lado, as dispersões contendo surfactante que continham 80 ou 100 μL de dispersão estoque promoveram intensidade de sinal acima de 600 u.a., contudo para essa última (contendo 100 μL) observou-se certa flutuação aleatória, porém significativa, de intensidade do sinal. Essa instabilidade foi provavelmente causada pelo aumento na quantidade de nanocristais dos QDs de 3MPA-CdTe dispersos no meio e que fatalmente imporia um tempo adicional para habilitar a

estabilização do sinal medido. Em virtude desses resultados, a alíquota de 80 μL de dispersão estoque dos QDs de 3MPA-CdTe (concentração final na dispersão de trabalho de $1,2 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$) foi escolhida para os estudos em meio contendo surfactante.

O efeito da presença de surfactante na dispersão de trabalho foi inicialmente avaliado usando os surfactantes CTAB (surfactante catiônico), Triton X-100 e Triton X-114 (surfactantes não iônicos), todos em meio tamponado como também na ausência de tampão. Similarmente ao realizado em meio aquoso sem surfactante, foram testados os tampões fosfato e Tris, ambos na concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e com pH 7,4. Em todas as dispersões dos QDs contendo surfactante (tamponada ou não) assegurou-se que a concentração final dos surfactantes fossem $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para garantir a formação significativa de estruturas organizadas (meio aquoso organizado).

As estabilidades dos sinais medidos das sondas foram monitoradas por até 90 min, com medições realizadas de 10 em 10 min. Os resultados apresentados na Figura 49 indicaram que na presença do surfactante CTAB (Figura 51A) a estabilidade da fotoluminescência é alcançada mais rapidamente na presença do tampão fosfato (aproximadamente 20 min) do que na presença de tampão Tris (aproximadamente 30 min). Além disso, esses dois tampões promoveram uma sutil elevação na intensidade do sinal da sonda, quando comparado com o resultado obtidos das dispersões não tamponadas contendo CTAB.

Na Figura 51B encontram-se os resultados dos testes realizados com Triton X-100, onde é possível observar que, embora a presença de tampão tenha promovido um aumento significativo na intensidade do sinal durante os primeiros 20 min após a preparação da sonda, uma tendência de decréscimo de sinal ocorreu na medida em que o tempo de medição avançou para os 90 min do experimento. Na ausência de tampão, observou-se um perfil de queda de sinal significativo até 50 min, quando o sinal se tornou estável, porém relativamente pouco intenso (200 u.a.).

Nas dispersões contendo Triton X-114 (Figura 51C) constatou-se que na presença dos tampões, os sinais tenderam a estabilidade, contudo com variações de sinal um pouco maiores quando comparados com os resultados obtidos com CTAB. Por outro lado, na ausência de tampão, a flutuação de sinal é muito

grande, o que não habilita a sonda para aplicações analíticas. Uma outra desvantagem do uso do Triton X-114 diz respeito a sua elevada viscosidade, que compromete a amostragem reprodutiva de alíquotas para preparação das dispersões. Do ponto de vista da magnitude e estabilidade de sinal da sonda, os resultados obtidos para dispersões de CTAB foram os mais promissores.

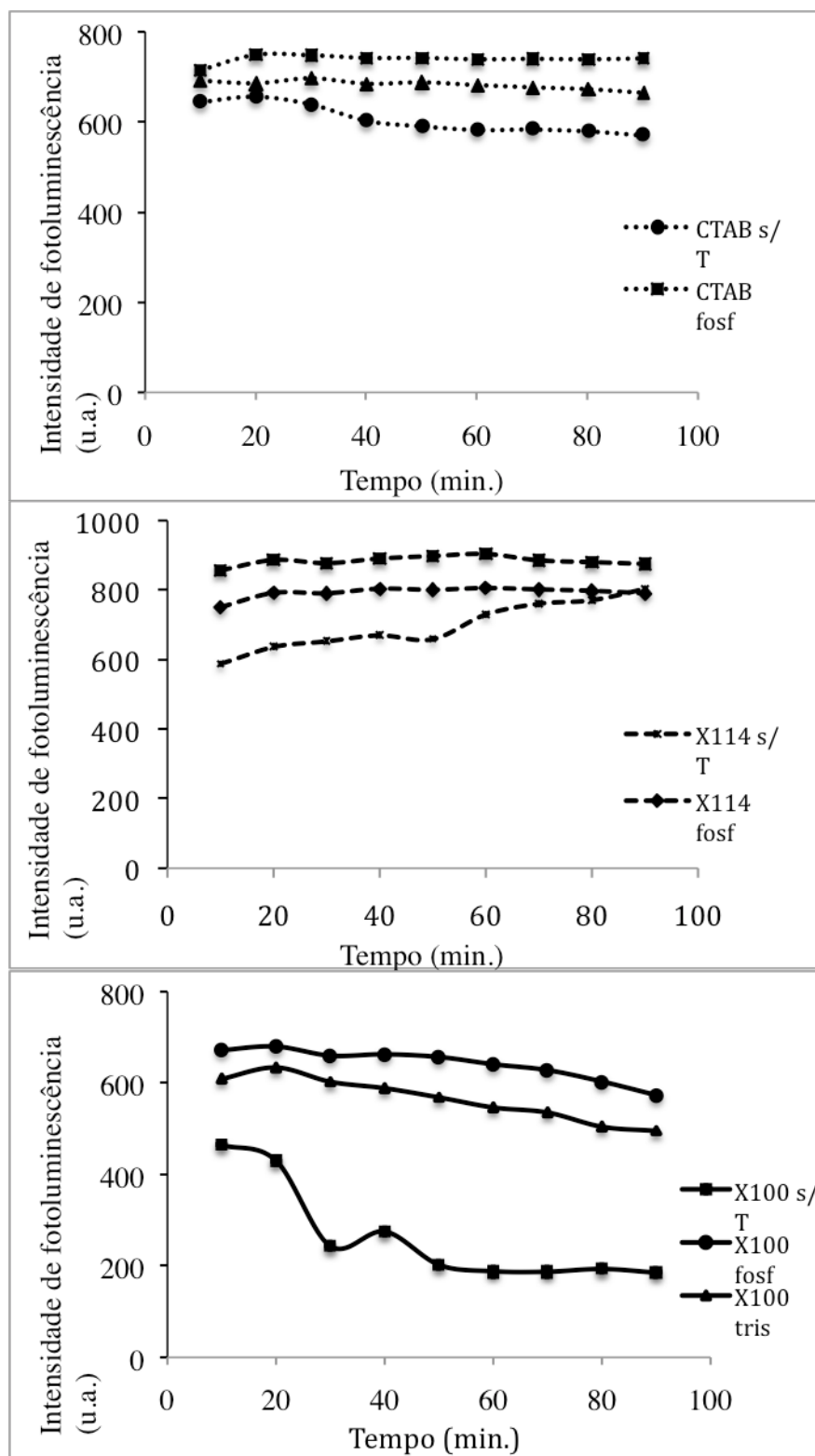


Figura 51 – Estabilidade da intensidade da fotoluminescência medida de dispersões dos QDs de 3MPA-CdTe ($1,2 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$) na ausência ou presença de tampão (fosfato ou tris) ambos na concentração $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e em pH 7,4 e contendo os surfactantes (A) CTAB; (B) Triton-X100; (C) Triton-X114 na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Posteriormente foram realizados testes para aferir a capacidade tamponante das dispersões dos QDs de 3MPA-CdTe em meio com surfactante em função da adição do flavonóide quercetina (na concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). A quercetina foi escolhida como representante da classe dos flavonóides para estes testes com os tampões fosfato e Tris ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4). Testes com dispersões dos QDs de 3MPA-CdTe em meio contendo surfactante sem a adição de quercetina também foram realizados de modo a se ter base de comparação de comportamento. Os resultados desses experimentos são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 – Variação do pH de dispersões aquosas de 3MPA-CdTe QDs na presença de quercetina (concentração final de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em meios não tamponados e tamponados com tampão fosfato ou Tris (concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4), contendo diferentes surfactantes (CTAB, Triton X-100 ou Triton X-114).

	CTAB $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$			Triton X-100 ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)			Triton X-114 ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)		
	pH (sem tampão)	pH (fosfato)	pH (tris)	pH (sem tampão)	pH (fosfato)	pH (tris)	pH (sem tampão)	pH (fosfato)	pH (tris)
Dispersão aquosa de 3MPA-CdTe	6,89	7,37	7,11	6,84	7,35	6,97	7,54	7,47	7,29
Dispersão aquosa de 3MPA-CdTe na presença de quercetina ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$)	6,45	7,32	6,93	6,6	7,31	6,89	7,31	7,52	7,21
Variação pH	0,44	0,05	0,18	0,24	0,04	0,08	0,23	0,05	0,08

Observou-se que nas dispersões organizadas com surfactantes (independente do tipo de surfactante) sem tampão, a adição de quercetina fez com que o pH variasse consideravelmente. Esse resultado indicou que o sistema deveria ser tamponado para se evitar a potencial variação de sinal em função da variação de pH. Nos testes cujo meio continha o tampão Tris verificou-se a variação significativa de pH após a adição de quercetina: 0,18 unidades de pH nas dispersões contendo CTAB e de 0,08 unidades de pH nas dispersões contendo Triton X-100 ou Triton X-114. As menores variações de pH (0,04 e 0,05) observados após adição de quercetina ocorreram nas dispersões contendo tampão

fosfato. A partir destes resultados, decidiu-se dar continuidade aos experimentos com as dispersões dos QDs de 3MPA-CdTe contendo CTAB e tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$).

A próxima avaliação foi a da influência da variação da concentração de CTAB nas dispersões dos QDs de 3MPA-CdTe. Para tal, foram testadas dispersões nas quais a concentração de CTAB no meio variou de $8,9 \times 10^{-5}$ a $4,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. De acordo com os resultados apresentados na Figura 52, verificou-se que nas concentrações mais baixas de CTAB (de $8,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a $4,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), apesar do surfactante promover o aumento da intensidade da fotoluminescência da sonda, a estabilidade desse sinal foi precária, provavelmente devido ao aumento da força iônica causado pelas unidades livres de surfactante ionizadas na dispersão, que ainda não formaram estruturas organizadas. A partir da concentração $8,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de CTAB, observou-se uma melhora na estabilidade do sinal da sonda após 40 min da sua preparação. Essa concentração encontra-se próxima a da CMC desse surfactante em água ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, Javadian *et al.*, 2013). Portanto, isso foi um indício de que a organização do meio tenha auxiliado no alcance da estabilidade de sinal emitido pelos QDs. Isso foi confirmado ao se medir o sinal da dispersão contendo CTAB na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, que permaneceu praticamente invariável a partir de 20 min da preparação da mesma. No teste realizado com a concentração de CTAB de $1,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, também foi observada boa estabilidade do sinal fotoluminescente. O mesmo foi constatado para a dispersão que continha CTAB na concentração de $4,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, contudo, nesse caso, ocorreu um pequeno decréscimo na intensidade do sinal que provavelmente foi causado pela elevada concentração do surfactante.

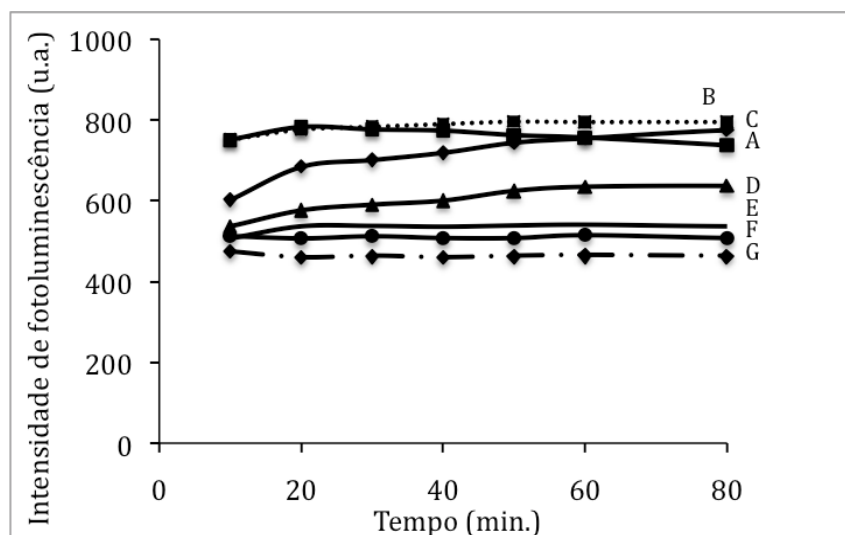


Figura 52 – Resposta fotoluminescente da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso, na presença de tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e surfactante CTAB nas concentrações (A) $8,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (B) $1,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (C) $4,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (D) $8,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (E) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (F) $1,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (G) $4,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

A estabilidade da fotoluminescência emitida pela sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio organizado com CTAB também foi avaliada em dispersões contendo $1,0 \text{ mL}$ ($10\% \text{ v/v}$ do volume total) de tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) com pH ajustada na faixa entre $5,0$ e $8,0$. Os resultados dessa avaliação, mostrados na Figura 53, indicaram que o sinal da sonda com tampão em pH $5,0$ e $6,0$ tornou-se estável após 20 min do preparo das dispersões, porém a intensidade de fotoluminescência foi bem menor que a observada nos sistemas preparados com tampão em pH acima de $7,0$. Este comportamento se deve provavelmente à remoção dos grupos tiol da superfície dos QDs (favorecida em meio ácido) e à protonação das hidroxilas dos grupos carboxilato do 3MPA, que por sua vez, favorece a agregação das nanopartículas, e consequentemente afetam a integridade do sinal analítico. Os resultados obtidos para as dispersões com tampão ajustados com valores de pH $7,0$; $7,4$ e $8,0$ mostraram a robustez nesta faixa de pH, onde o sinal analítico foi similar e permaneceu estável a partir de 20 min de preparo da dispersão até 80 min (tempo final do experimento).

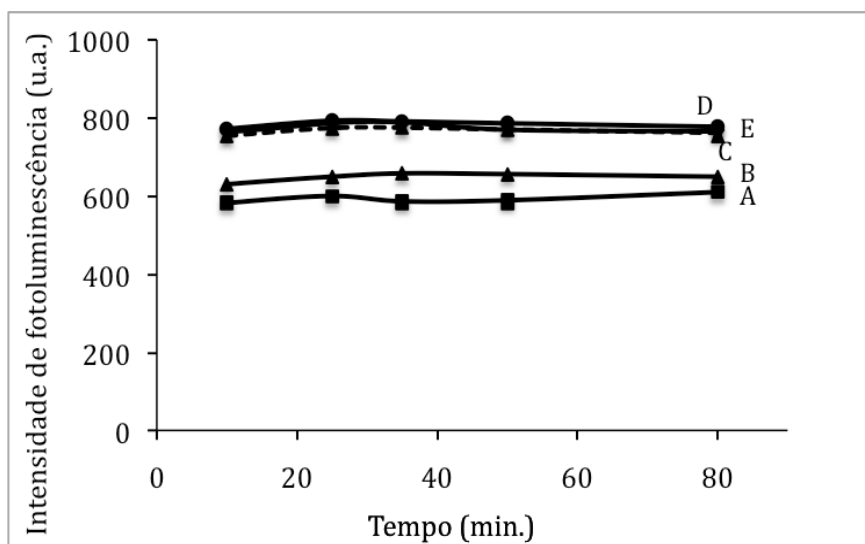


Figura 53 – Resposta da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe ($1,2 \times 10^{-9}$ mol L $^{-1}$) em função do pH do meio organizado tamponado com tampão fosfato 0,01 mol L $^{-1}$ (A) pH 5,0; (B) pH 6,0; (C) pH 7,0; (D) pH 7,4 e (E) pH 8,0.

Finalmente, a escolha da alíquota de tampão fosfato (0,01 mol L $^{-1}$; pH 7,4) a ser incorporada nas dispersões dos QDs de 3MPA-CdTe ($1,2 \times 10^{-9}$ mol L $^{-1}$) contendo CTAB ($1,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$) foi realizada com base em experimentos nos quais as alíquotas de tampão foram ajustadas em três concentrações (0,5; 1,0 e 1,5 mL, equivalentes a 5; 10 e 15% do volume total da dispersão). Após o preparo das dispersões, os sinais analíticos das mesmas foram monitorados por 80 min e, de acordo com os resultados apresentados na Figura 54, todas as alíquotas testadas garantiram a estabilidade do sinal da sonda a partir de 20 min da preparação. As dispersões contendo alíquotas de 1,0 e 1,5 mL de tampão fosfato apresentaram praticamente a mesma intensidade de sinal ao longo do tempo (variação máxima de 11 u.a.).

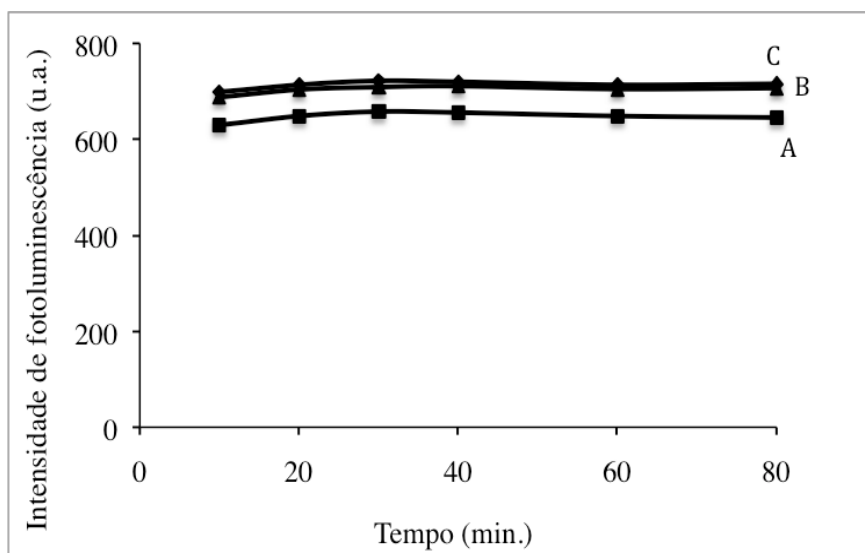


Figura 54 - Estabilidade da fotoluminescência da sonda em função do tempo em dispersões contendo alíquotas de (A) 0,5; (B) 1,0 e (C) 1,5 mL do tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹, pH 7,4.

Por fim, o efeito da presença de um flavonóide (no caso a quercetina) no valor de pH da dispersão tamponada com 0,5, 1,0 e 1,5 mL de tampão fosfato (pH 7,4; 0,01 mol L⁻¹) foi avaliado. Para tal, o valor de pH das dispersões onde se adicionou uma alíquota de 50 µL de solução estoque de quercetina (1,0 x 10⁻² mol L⁻¹) foi comparada ao pH da dispersão sem adição do flavonóide. A comparação foi realizada em duas dispersões contendo mesmo volume de tampão, perfazendo um total de seis dispersões, (três contendo quercetina e três sem adição de quercetina). Como esperado, os resultados indicaram que nas dispersões contendo alíquotas de 1,0 e 1,5 mL de tampão, a variação no pH foi insignificante. Portanto a alíquota de 1,0 mL de tampão fosfato foi escolhida para compor as dispersões de trabalho.

O uso de CTAB facilita a solubilização dos flavonóides em solução aquosa, o que por sua vez, elimina a necessidade da adição de quantidades significativas de solvente orgânico na composição da sonda. Porém, solventes orgânicos são sempre usados para dissolver os flavonoides presentes nas amostras, e com isso, uma quantidade de solvente orgânico é sempre incorporada na sonda de trabalho no momento da adição das amostras e padrões. Assim, um estudo para avaliar o efeito da adição de pequenas quantidades de metanol (até 150 µL ou 1,5% do volume final da sonda) foi realizado. Como resultado, não

houve alteração de sinal relevante da sonda na presença de metanol quando se comparou com o sinal na ausência de solvente.

Ao término da etapa de otimização, foi determinado que as dispersões de trabalho em meio organizado com CTAB teriam um volume final de 10,00 mL que seriam constituídas por 1,0 mL de tampão fosfato (pH 7,4; $0,01 \text{ mol L}^{-1}$), 80 μL de dispersão estoque dos QDs de 3MPA-CdTe ($1,54 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$), 8,82 mL de dispersão estoque de CTAB ($1,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) sendo o complemento ajustado pela adição de alíquotas (de 0 a 100 μL) de solução estoque de flavonóides e/ou água ultrapura. Desta maneira todas as dispersões de trabalho tinham as concentrações fixas de $1,2 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ dos QDs de 3MPA-CdTe, $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato e $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de CTAB.

5.6.

Avaliação dos perfis de luminescência e absorção dos flavonóides em meio organizado com CTAB

Além dos flavonóides utilizados nos testes com a sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso (sem surfactante), nesta parte do trabalho foram usadas também as substâncias 3-hidroxi-flavona (3Hf), 5-hidroxi-flavona (5Hf), 6-hidroxi-flavona (6Hf) e 7-hidroxi-flavona (7Hf), cujas estruturas químicas são mostradas na Figura 55.

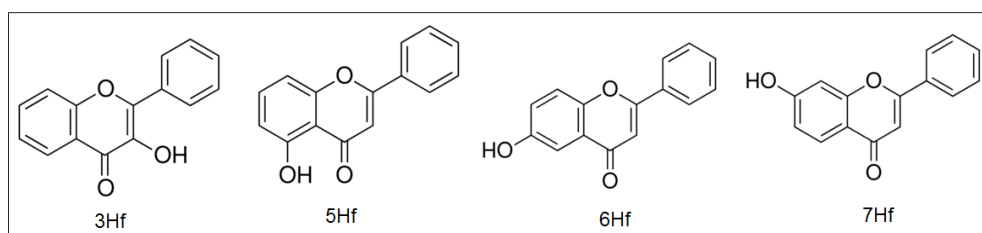


Figura 55 - Estruturas químicas das substâncias 3-hidroxi-flavona (3Hf), 5-hidroxi-flavona (5Hf), 6-hidroxi-flavona (6Hf) e 7-hidroxi-flavona (7Hf).

Um estudo para investigar a existência de fluorescência natural dos flavonóides foi realizado em soluções (10,00 mL de volume final) constituídas por alíquotas de 100 μL de solução estoque do flavonóide ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), 1,0 mL de tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,4) e 8,9 mL de solução estoque de

CTAB ($1,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Nessas soluções, a concentração final de flavonóide foi $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. As análises foram feitas com excitação em 460 nm (λ_{exc}), coletando-se a emissão máxima em 529 nm (comprimentos de onda característicos para a sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio organizado com CTAB). Os resultados apresentados na Tabela 18 (que indicam as intensidades máximas de fluorescência em 529 nm e absorvâncias em 460 nm) mostram que dentre todos os flavonóides testados, o único que apresentou fluorescência significativa em 460/529 nm foi a morina (226 u.a.). Como essa contribuição afetaria o monitoramento adequado do sinal fotoluminescente da sonda 3MPA-CdTe, esse flavonóide foi eliminado dos estudos seguintes.

Tabela 18 - Intensidades de fluorescência de soluções de flavonoides $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de CTAB e tampão fosfato, ambos na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Flavonóide	Intensidade de fluorescência em 529 nm	Absorvância em 460 nm
Naringenina	2,6	0,0040
Catequina	6,0	0,001
Hesperitina	2,1	0,0013
Rutina	61,0	0,0251
Miricetina	3,9	0,0318
Morina	226	0,0219
Canferol	29,4	0,0182
Quercetina	27,9	0,0287
Taxifolin	3,8	0,0048
Galangina	5,7	0,0098
Flavona	2,6	0,0033
3-Hidroxi-flavona	3,1	0,0099
5-Hidroxi-flavona	2,9	0,0045
6-Hidroxi-flavona	4,0	0,0065
7-Hidroxi-flavona	3,8	0,0111

Os perfis de absorção, na região do UV-vis, dessas soluções também foram monitorados, a fim de verificar se nos comprimentos de onda de 460 e 529 nm existiriam contribuições elevadas de absorvância. Os resultados obtidos para o comprimento de onda de 460 nm estão apresentados na Tabela 18. Os valores mais elevados de absorvância foram de 0,03181 e 0,02879 para as soluções de morina e quercetina ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), respectivamente. Contudo, esses valores não foram considerados relevantes para uma contribuição efetiva de efeito de filtro interno no sinal medido da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe. Já os valores de absorvância obtidos em 529 nm foram muito menores que os encontrados em 460 nm. Em geral os perfis de absorção dos flavonóides em meio contendo CTAB não foram muito diferente daqueles obtidos em meio aquoso sem CTAB. A fim de ilustrar o perfil de absorção dos novos flavonóides incluído nesta parte do trabalho, apresenta-se na Figura 56 os espectros de absorção da 3-hidroxi-flavona (3Hf), da 5-hidroxi-flavona (5Hf), da 6-hidroxi-flavona (6Hf) e da 7-hidroxi-flavona (7Hf).

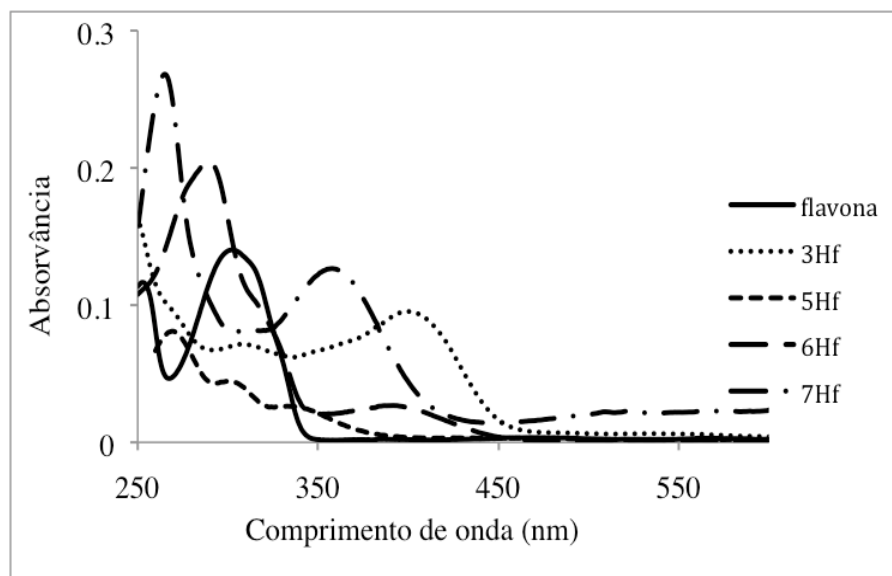


Figura 56 - Espectro de absorção de soluções $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4 e dos flavonóides flavona, 3Hf, 5Hf, 6Hf E 7Hf em meio organizado.

5.7.

Avaliação do efeito causado pelos flavonóides na fotoluminescência da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio organizado com CTAB

Nessa etapa foi realizado um estudo preliminar para avaliar o efeito causado pela presença de flavonóides (14 flavonóides foram testados) no sinal da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio organizado com CTAB. Os testes foram realizados usando as condições otimizadas para a sonda de trabalho contendo CTAB, porém com tampão fosfato com pH na faixa entre 6,0 a 8,0. Avaliou-se a interação QDs-flavonóide a partir da variação na magnitude do sinal da sonda, com resultados expressos pela razão L_0/L com ambos, L e L_0 monitorados em 529 nm. A fim de evitar efeito de filtro interno, a excitação foi realizada no comprimento de onda de 460 nm, uma vez que a maioria dos flavonóides estudados não absorvem significativamente a partir de 450 nm. As concentrações finais de cada flavonóide presente nas dispersões em meio organizado com CTAB foram fixadas em $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Como estabelecido anteriormente, a variação da razão L_0/L entre 0,95 e 1,05 não caracterizou interação entre QDs e flavonóide. A fim de garantir que a diminuição de sinal da sonda fosse identificada como decorrente apenas do contato entre QDs e flavonóide, isto é, sem contribuição de efeito de filtro interno, os valores de L foram corrigidos nos comprimentos de onda de 460 e 529 nm.

Na Tabela 19 encontram-se os resultados dos testes feitos com as substâncias flavona, 3-hidroxi-flavona, 5-hidroxi-flavona, 6-hidroxi-flavona, 7-hidroxi-flavona, catequina, hesperetina, taxifolin e naringenina. Observou-se que não houve nenhuma variação significativa dos valores de L_0/L que pudessem indicar uma interação entre catequina, hesperetina, taxifolin e naringenina com os QDs, considerando a faixa de concentração entre $1,0 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Esse comportamento foi igual ao observado no estudo em meio aquoso sem CTAB e indicam a falta de interação desses flavonóides com os nanocristais independentemente do meio em que se encontram.

Por outro lado, em meio organizado com CTAB a flavona proporcionou um significativo decréscimo na intensidade da fotoluminescência da sonda.

Sendo que em dispersões contendo tampão com pH 8,0, a supressão foi muito forte (razão L_0/L que variou de 1,16 a 1,85) na faixa de concentração de flavona de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Esse resultado é surpreendente quando se considera o obtido em meio aquoso sem CTAB, no qual a flavona não apresentou interação com a sonda. Foi a partir do resultado com a flavona obtido em meio organizado com CTAB que se decidiu estudar o comportamento, das substâncias 3-hidroxi-flavona, 5-hidroxi-flavona, 6-hidroxi-flavona, 7-hidroxi-flavona. Esses flavonóides possuem apenas um substituinte hidroxila em um dos anéis A, B ou C da estrutura base dos flavonóides, ao passo que flavona não apresenta nenhuma hidroxila na sua estrutura química. Conforme imaginado, essas três flavonas hidroxiladas interagiram com a sonda em meio organizado com CTAB e se tornaram alvo de estudos subsequentes. A 3-hidroxi-flavona apresentou um resultado intrigante em relação a faixa de pH testada, pois a supressão de sinal da sonda foi observada somente em dispersões contendo tampão com pH 6,0. Em dispersões contendo tampão com pH 7,0 e 8,0 prevaleceu o incremento na intensidade do sinal da sonda, já que as razões de L_0/L variaram entre 0,98 e 0,68.

A 5-hidroxi-flavona exibiu um perfil de supressão de fotoluminescência da sonda nas dispersões contendo tampão nos três valores de pH. O mesmo ocorreu para as dispersões contendo 6-hidroxi-flavona. Para a 7-hidroxi-flavona, a supressão de sinal da sonda foi muito significativa somente em pH 6,0, sendo discreta nos demais valores de pH.

Tabela 19 - Resposta da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio organizado em relação a presença das substâncias flavona, 3-hidroxi-flavona, 5-hidroxi-flavona, 6-hidroxi-flavona, 7-hidroxi-flavona, catequina, hesperetina, taxifolin e naringenina, expressa pela razão L_0/L .

Flavonoide	Concentração do flavonóide na sonda (mol L^{-1})	L_0/L em pH 6,0	L_0/L em pH 7,0	L_0/L em pH 8,0
Flavona	$1,0 \times 10^{-6}$	1,08	1,06	1,16
	$5,0 \times 10^{-6}$	1,28	1,22	1,48
	$1,0 \times 10^{-5}$	1,38	1,46	1,85
3Hf	$1,0 \times 10^{-6}$	1,09	0,98	1,00
	$5,0 \times 10^{-6}$	1,34	0,89	0,82
	$1,0 \times 10^{-5}$	1,54	0,80	0,68
5Hf	$1,0 \times 10^{-6}$	1,09	1,10	1,02
	$5,0 \times 10^{-6}$	1,39	1,32	1,24
	$1,0 \times 10^{-5}$	1,45	1,57	1,48
6Hf	$1,0 \times 10^{-6}$	1,18	1,08	1,15
	$5,0 \times 10^{-6}$	1,71	1,39	1,35
	$1,0 \times 10^{-5}$	2,30	1,94	1,51
7Hf	$1,0 \times 10^{-6}$	1,08	1,04	1,07
	$5,0 \times 10^{-6}$	1,17	1,05	1,07
	$1,0 \times 10^{-5}$	1,30	1,05	1,08
Catequina	$1,0 \times 10^{-6}$	1,01	1,00	1,05
	$5,0 \times 10^{-6}$	0,99	0,98	1,02
	$1,0 \times 10^{-5}$	0,98	0,98	1,03
Hesperetina	$1,0 \times 10^{-6}$	1,00	0,96	1,05
	$5,0 \times 10^{-6}$	1,00	0,95	1,08
	$1,0 \times 10^{-5}$	1,00	0,97	0,99
Taxifolin	$1,0 \times 10^{-6}$	1,02	0,99	1,03
	$5,0 \times 10^{-6}$	1,00	0,98	0,99
	$1,0 \times 10^{-5}$	1,02	0,97	0,99
Naringenina	$1,0 \times 10^{-6}$	1,03	1,02	1,01
	$5,0 \times 10^{-6}$	1,02	1,03	1,02
	$1,0 \times 10^{-5}$	1,03	1,02	1,02

Na avaliação dos resultados sumarizados na Tabela 20 observou-se que os flavonóides quercetina e canferol não interagiram eficientemente com a sonda no meio contendo CTAB, uma vez que não foi observado incremento ou supressão relevantes das razões L_0/L . Esses resultados foram completamente distintos daqueles obtidos em meio aquoso sem CTAB. Por sua vez, constatou-se que a galangina, que não havia interagido com a sonda em meio sem CTAB, continuou sem interagir no meio com CTAB. Já, no caso da miricetina, houve promoção de supressão no sinal da sonda em dispersões contendo tampão com pH 7,0 e 8,0. Isso era esperado já que a interação havia sido intensa e sem controle em meio aquoso sem CTAB. Por fim, a rutina provocou a supressão na

magnitude do sinal dos QDs em dispersões contendo tampão com pH ajustado tanto em 6,0 quanto em 7,0.

A partir dessa triagem foram escolhidas as substâncias flavona, 3-hidroxi-flavona, 5-hidroxi-flavona, 6-hidroxi-flavona, 7-hidroxi-flavona, rutina e miricetina, para dar continuidade aos estudos em meio organizado com agregados de CTAB.

Tabela 20 – Resposta da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio organizado em relação à presença das substâncias galangina, quercetina, rutina, miricetina e canferol, expressa pela razão L_0/L .

Flavonoide	Concentração do flavonóide na sonda (mol L^{-1})	L_0/L em pH 6	L_0/L em pH 7	L_0/L em pH 8
Galangina	$1,0 \times 10^{-6}$	1,01	1,00	1,00
	$5,0 \times 10^{-6}$	1,04	1,00	1,02
	$1,0 \times 10^{-5}$	1,03	1,03	1,02
	$1,0 \times 10^{-6}$	1,04	0,99	1,02
Quercetina	$5,0 \times 10^{-6}$	1,04	0,96	1,05
	$1,0 \times 10^{-5}$	1,01	0,99	1,03
	$1,0 \times 10^{-6}$	1,07	1,03	1,01
	$5,0 \times 10^{-6}$	1,12	1,06	1,00
Rutina	$1,0 \times 10^{-5}$	1,20	1,13	1,02
	$1,0 \times 10^{-6}$	1,06	1,07	1,14
	$5,0 \times 10^{-6}$	1,09	1,21	1,80
	$1,0 \times 10^{-5}$	1,05	1,53	3,60
Miricetina	$1,0 \times 10^{-6}$	1,00	0,97	1,00
	$5,0 \times 10^{-6}$	1,03	0,94	0,98
	$1,0 \times 10^{-5}$	1,03	0,95	0,97

5.7.1.

Supressão de fotoluminescência e estudos de mecanismo de interação entre os flavonóides favona, 3-hidroxi-flavona, 5-hidroxi-flavona, 6-hidroxi-flavona, 7-hidroxi-flavona, rutina e miricetina e a sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio organizado com agregados de CTAB

Nas avaliações subsequentes, a estabilidade da fotoluminescência (em função do tempo) da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe, preparada em meio organizado com CTAB, foi avaliada na presença de flavona, 3-hidroxi-flavona, 5-hidroxi-flavona, 6-hidroxi-flavona, 7-hidroxi-flavona, rutina e miricetina. Seguindo o que foi estabelecido nos estudos em meio sem CTAB, a concentração

de flavonóide no meio organizado foi fixada em $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, e os valores de pH do tampão adicionado às dispersões foram 6,0; 7,0; 7,4 e 8,0. No monitoramento, foram realizadas cinco medições em um intervalo de tempo de 80 min, sendo a primeira feita em 10 min. após do preparo das dispersões. O flavonóide que induziu instabilidade no sinal fotoluminescente da sonda foi eliminado dos estudos seguintes. Para as dispersões contendo flavonóides que apresentaram estabilidade de sinal, foi utilizado o modelo de supressão de Stern-Volmer para estabelecer uma relação entre a variação do sinal fotoluminescente dos QDs de 3MPA-CdTe e o aumento da concentração dos flavonóides. Os parâmetros de constante de Stern-Volmer, constante de ligação e número de sítios foram calculados, e a partir deles foi possível identificar qual flavonóide apresentou maior interação com a sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio organizado com agregados de CTAB.

5.7.1.1. Flavona

Para a flavona (estrutura representada na Figura 57) os valores de L_0/L (valores corrigidos para efeito filtro), mostrados na Tabela 21, indicaram que a menor variação de sinal ao longo do tempo foi obtida na dispersão contendo tampão com pH 6,0. Para os demais valores de pH testados, a instabilidade de sinal foi marcante, com aumento do valor da razão L_0/L em função do tempo. Especificamente nas dispersões contendo tampão com pH 8,0, a magnitude da variação dos valores de L_0/L foi mais elevada, variando de 1,74 a 1,85 (no intervalo de entre 35 e 80 min). Tal comportamento indica que na presença de tampão com pH 8,0, o aumento da força iônica do meio possa ter favorecido o contato entre as espécies (aumentando a supressão de fotoluminescência). Contudo, esse não é um bom resultado para fins quantitativos, pois não é possível controlar essa variação causada no sinal da sonda com tampão em pH 8,0.

Tabela 21 – Resposta da sonda 3MPA-CdTe em meio organizado com CTAB (expressa pela razão L_0/L), na presença de flavona ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, nos valores de pH 6,0; 7,0; 7,4 e 8,0) e CTAB ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).

Tempo (min.)	L_0/L em pH 6,0	L_0/L em pH 7,0	L_0/L em pH 7,4	L_0/L em pH 8,0
10	1,40	1,46	1,32	1,64
25	1,38	1,48	1,37	1,73
35	1,41	1,51	1,36	1,74
50	1,41	1,54	1,41	1,80
80	1,40	1,53	1,41	1,85

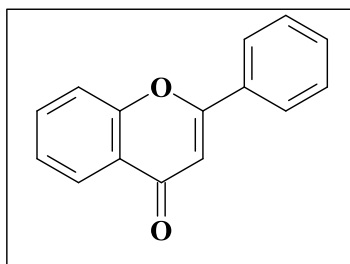


Figura 57 - Estrutura química da Flavona.

Por outro lado é interessante notar que na estrutura da flavona não existem substituintes com potencial para interagir com os QDs. Portanto, pode-se concluir que a interação flavona-3MPA-CdTe (que só ocorreu em meio organizado com CTAB) é favorecida no meio organizado com CTAB. Uma particularidade dos QDs dispersos em meio organizado é o aumento da sensibilidade, pois os flavonóides que interagiram através de contato promoveram supressão quando presentes em concentrações mais baixas que aquelas em meio aquoso sem CTAB, ou seja, não organizado por micelas.

O modelo de Stern-Volmer foi usado para estabelecer a relação entre a variação de intensidade de fotoluminescência medida (L) e a concentração de flavona presente nas dispersões dos QDs no meio organizado com CTAB contendo tampão em pH 6,0. A curva da flavona (Figura 58) apresentou uma resposta linear proporcional à concentração de flavona na faixa de $1,0 \times 10^{-6}$ e $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com equações para a curva, com correção de valores de absorvância, igual a $L_0/L = 35382 [\text{flavona}] + 1,025$ ($R^2 = 0,990$). Para a curva não corrigida para potencial efeito filtro, a equação foi $L_0/L = 35067 [\text{flavona}] + 1,025$ ($R^2 = 0,991$). Na Tabela 22 são exibidos os dados obtidos da razão L_0/L antes e após a correção com os valores de absorvância obtidos 460 nm e em 529

nm. As semelhanças das inclinações das duas curvas (diferença em torno de 1%) permite que se conclua que para a flavona a atenuação de sinal medido das dispersões dos QDs de 3MPA-CdTe por causa de efeito filtro não é significativa.

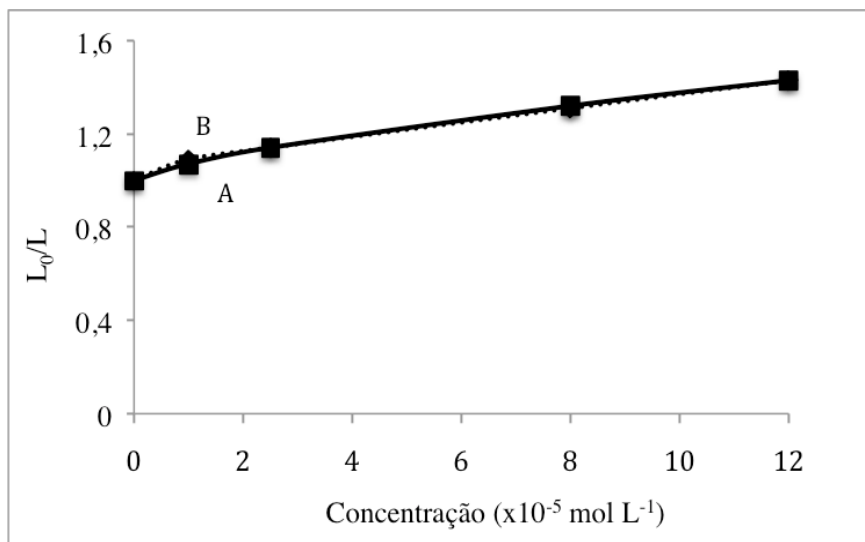


Figura 58 – Curva de supressão de fotoluminescência da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio organizado, na presença de flavona. (A) curva corrigida para potencial efeito filtro ($y = 35067x + 1,025$) e (B) curva não corrigida para potencial efeito filtro ($y = 35382x + 1,025$).

Tabela 22 - Dados das medições realizadas em dispersões dos QDs de 3MPA-CdTe em meio organizado com CTAB (na condição otimizada) na presença de flavona na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e com tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) com pH 6,0.

Concentração (mol L^{-1})	L_0/L	Absorvância em 460 nm	Absorvância em 520 nm	L_0/L_{corrig}
$1,0 \times 10^{-6}$	1,10	0,00593	-0,002452	1,10
$2,5 \times 10^{-6}$	1,14	0,005554	-0,003165	1,14
$5,0 \times 10^{-6}$	1,24	0,00529	-0,003468	1,24
$8,0 \times 10^{-6}$	1,31	0,007786	-0,00164	1,32
$1,2 \times 10^{-5}$	1,43	0,006181	-0,003648	1,43

5.7.1.2. 3-Hidroxi-flavona

Para a 3-hidroxi-flavona, o sinal da sonda monitorado ao longo de 80 min foi bastante estável em todas as condições de pH. Analisando-se as razões L_0/L , da Tabela 23, verifica-se que a supressão de fotoluminescência foi obtida somente

na dispersão contendo tampão com pH 6,0. Nas outras dispersões o comportamento foi inverso, isto é, os valores de L_0/L foram menores que 1, indicando o aumento da fotoluminescência da sonda na presença desse flavonóide. Embora curioso, este comportamento pode ser facilmente explicado pela ionização da única hidroxila presente na estrutura 3-hidroxi-flavona nas dispersões com valores de pH mais altos.

Tabela 23 – Resposta da sonda 3MPA-CdTe em meio organizado com CTAB (expressa pela razão L_0/L), na presença de 3-hidroxi-flavona ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, nos valores de pH 6,0; 7,0; 7,4 e 8,0) e CTAB ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).

Tempo (min.)	L_0/L em pH 6,0	L_0/L em pH 7,0	L_0/L em pH 7,4	L_0/L em pH 8,0
10	1,58	0,84	0,70	0,66
25	1,52	0,82	0,71	0,65
35	1,59	0,81	0,71	0,67
50	1,60	0,81	0,71	0,66
80	1,61	0,80	0,72	0,68

De acordo com Dávila *et al.*, (2013) o valor do pK_a para 3-hidroxi-flavona é 9,39 (em meio hidroalcoólico). Considerando a concentração de flavona presente nas dispersões, o pH de ionização calculado ficou em torno de 7,2. Como variações no meio aquoso promovem pequenas mudanças nos valores das constantes de ionização, propõe-se que a mudança no comportamento da sonda está diretamente relacionado com as estruturas presentes na Figura 59. Enquanto a estrutura protonada deve roubar energia dos QDs (em meio organizado) e com isso promover a supressão de fotoluminescência, o íon fenóxido deve contribuir para o aumento da intensidade do sinal da sonda, talvez por capear espaços vazios na superfície dos QDs aumentando a densidade eletrônica que por sua vez, amplifica a quantidade de elétrons disponíveis para a transição radiante entre banda de condução e banda de valência. É possível também que os íons fenóxidos interajam com os íons Cd^{2+} diminuindo defeitos de superfície. Além do íon fenóxido, outros híbridos de ressonância (não mostrados na Figura 59) podem contribuir para o aumento de densidade de carga negativa.

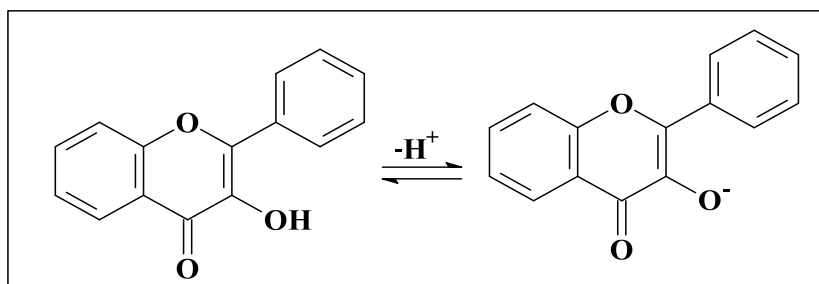


Figura 59 – Estrutura química da 3-hidroxi-flavona e do seu respectivo íon fenóxido.

O modelo de Stern-Volmer utilizado para correlacionar o decréscimo na intensidade de sinal da sonda com o aumento da concentração de 3-hidroxi-flavona só pôde ser usado para dispersões organizadas em pH 6,0. As curvas de supressão de sinal obtidas (Figura 60) indicam que a variação dos valores de L_0/L em meio organizado é linear na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A correção com os valores de absorvância (em 460 e 529 nm) foi feita e as equações obtidas para as curvas com e sem correção foram respectivamente iguais a $L_0/L = 56710 [\text{3-hidroxi-flavona}] + 1,032$ ($R^2 = 0,992$) e $L_0/L = 52849 [\text{3-hidroxi-flavona}] + 1,03$ ($R^2 = 0,990$). Na Tabela 24 são mostrados os dados obtidos para as razões L_0/L antes e após a correção para o potencial efeito filtro. Como a diferença das inclinações das curvas não foi superior a 7%, considerou-se que a contribuição do efeito filtro na diminuição do sinal da sonda foi pequena.

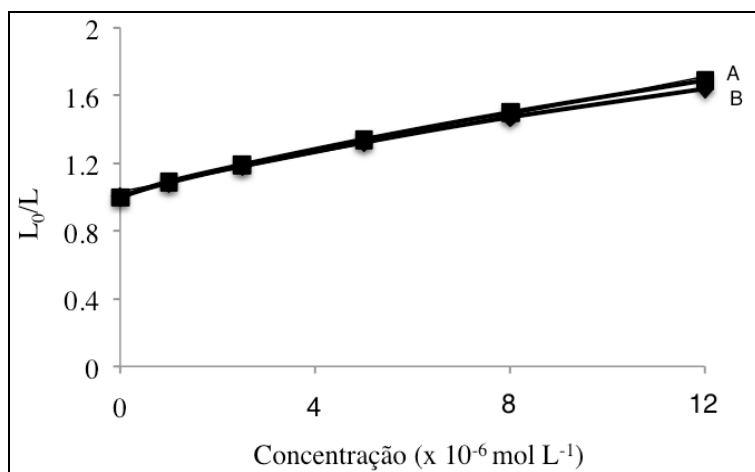


Figura 60 – Curva de supressão de fotoluminescência da sonda de 3MPA-CdTe em meio organizado com surfactante, na presença de 3-hidroxi-flavona. (A) curva corrigida para potencial efeito filtro ($y = 56710x + 1,032$) e (B) curva não corrigida para potencial efeito filtro ($y = 52849x + 1,030$).

Tabela 24 - Dados das medições realizadas nas dispersões de trabalho em meio organizado com CTAB na presença de 3-hidroxi-flavona ($1,0 \times 10^{-6}$ a $1,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹). Dispersões contendo tampão fosfato com pH 6,0.

Concentração (mol L ⁻¹)	L ₀ /L	Absorvância em 460 nm	Absorvância em 520 nm	L ₀ /L _{cor}
0	1,00			1,00
$1,0 \times 10^{-6}$	1,08	0,0077	0,001217	1,09
$2,5 \times 10^{-6}$	1,18	0,009232	0,001511	1,19
$5,0 \times 10^{-6}$	1,32	0,01387	0,000366	1,34
$8,0 \times 10^{-6}$	1,47	0,01924	0,00222	1,50
$1,2 \times 10^{-5}$	1,64	0,02591	0,005097	1,69

5.7.1.3.

5-Hidroxi-flavona

Para a 5-hidroxi-flavona, observou-se queda significativa de sinal em todos os sistemas independente do pH do tampão (Tabela 25). Em dispersões contendo tampão fosfato com pH 6,0 houve estabilização do sinal da sonda a partir de 35 min da adição do flavonóide. Nos sistemas contendo tampão com valores de pH maiores, o sinal foi instável ao longo do tempo monitorado (80 min). A tendência para a supressão de sinal foi maior com o aumento do pH. Porém não se acredita que isto tenha a ver com a ionização da 5-hidroxi-flavona, pois de acordo com o valor experimental para o seu pK_a, de 11,44 (Thompson e

Williams, 1976), no nível de concentração dos testes, a desprotonação só deveria começar a ocorrer em pH 8,2 (aproximadamente). Entretanto, analisando-se as estruturas da 5-hidroxi-flavona na Figura 61, percebe-se que a localização da hidroxila favorece a formação de ligação de hidrogênio via anel de seis membros. Tal ligação é termodinamicamente mais estável que a formada via anel de 5 membros, e por isso tem muita probabilidade de ocorrer. Se essa ligação de hidrogênio puder ser perturbada pela variação do pH (espécies H^+ ou OH^- predominando), não é impossível supor que em meios com pH levemente ácido a estrutura B predomine e em meio com pH neutro/básico a estrutura A predomine. De uma maneira geral (não especificamente para esse caso) quando grupos OH ou C=O estão livres, eles tornam-se mais suscetíveis para interagir com outras espécies. Por ventura se a estrutura A, em algum momento, predominar no meio organizado, os grupos mencionados (mais livres) podem ajudar a intensificar a interação com os QDs, justificando a tendência dos resultados sumarizados na Tabela 25. Deve-se chamar atenção também que na estrutura da flavona não há a possibilidade de ocorrer ligação de hidrogênio intramolecular, e em pH 8,0 a interação também foi mais intensa. Tal fato pode estar relacionado com uma característica intrínseca da sonda nesse pH, como por exemplo aumento da força iônica (favorecendo o contato entre as espécies).

Por fim, devida a falta de estabilidade nos testes com 5-hidroxi-flavona, não foi possível estabelecer uma correlação entre a concentração do analito e a supressão fotoluminescente fins quantitativos.

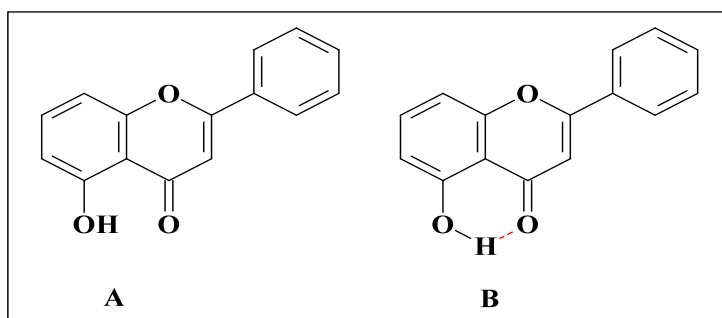


Figura 61 - Estrutura da 5-hidroxi-flavona sem ligação de hidrogênio (A) e com ligação de hidrogênio (B).

Tabela 15 - Resposta da sonda 3MPA-CdTe em meio organizado com CTAB (expressa pela razão L_0/L), na presença de 5-hidroxi-flavona ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, nos valores de pH 6,0; 7,0; 7,4 e 8,0) e CTAB ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).

Tempo	L_0/L em pH 6,0	L_0/L em pH 7,0	L_0/L em pH 7,4	L_0/L em pH 8,0
10	1,32	1,50	1,50	1,48
25	1,39	1,60	1,59	1,66
35	1,44	1,62	1,62	1,74
50	1,41	1,71	1,66	1,76
80	1,45	1,80	1,81	1,96

5.7.1.4.

6-Hidroxi-flavona

No caso da 6-Hidroxi-flavona os resultados expressos pela razão L_0/L (valores corrigidos) mostrados na Tabela 26 indicaram que em dispersões contendo tampão em pH 6,0 a supressão de fotoluminescência é muito significativa mas existe a tendência da magnitude da supressão diminuir com o aumento do valor do pH do meio. Na dispersão levemente ácida (preparada com tampão em pH 6,0) houve uma leve tendência de diminuição de sinal ao longo do tempo. Tal tendência foi muito mais significativa nas dispersões preparadas com tampão de valores de pH mais elevados. No intuito de tentar justificar a diminuição do efeito de quenching em meios preparados com tampão de pH 7,4 e 8,0, o pH de ionização da 6-hidroxi-flavona foi calculado, levando-se em consideração o pK_a de $9,34 \pm 0,4$ (ACD/Labs). O pH de ionização foi estimado em aproximadamente 7,2, o que indica que provavelmente a espécie B da Figura 58 predomine nas dispersões com pH superior a 7,0. De acordo com essa suposição e considerando os resultados experimentais da razão L_0/L (Tabela 26) sugere-se que a espécie A da Figura 62, seja a responsável pela supressão mais efetiva do sinal da sonda.

Tabela 26 - Resposta da sonda 3MPA-CdTe em meio organizado com CTAB (expressa pela razão L_0/L), na presença de 6-hidroxi-flavona ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, nos valores de pH 6,0; 7,0; 7,4 e 8,0) e CTAB ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).

Tempo	L_0/L em pH 6,0	L_0/L em pH 7,0	L_0/L em pH 7,4	L_0/L em pH 8,0
10	2,26	1,93	1,74	1,47
25	2,25	2,07	1,76	1,54
35	2,25	2,11	1,85	1,58
50	2,27	2,34	1,84	1,64
80	2,29	2,41	1,98	1,98

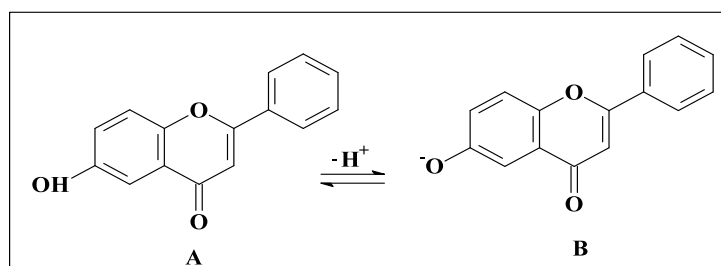


Figura 62 - Estrutura da 6-hidroxi-flavona e do seu respectivo íon fenóxido.

5.7.1.5. 7-Hidroxi-flavona

Para a 7-hidroxi-flavona os valores de L_0/L (valores corrigidos), mostrados na Tabela 27, indicaram que a supressão de fotoluminescência da sonda é mais pronunciado em pH 6,0 e que, de uma maneira geral, o sinal da sonda tende a se estabilizar ao longo do tempo, independentemente do valor do pH.

Tabela 27 – Resposta da sonda 3MPA-CdTe em meio organizado com CTAB (expressa pela razão L_0/L), na presença de 7-hidroxi-flavona ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, nos valores de pH 6,0; 7,0; 7,4 e 8,0) e CTAB ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).

Tempo (min.)	L_0/L em pH 6,0	L_0/L em pH 7,0	L_0/L em pH 7,4	L_0/L em pH 8,0
10	1,35	1,15	1,09	1,07
25	1,33	1,12	1,08	1,06
35	1,34	1,10	1,08	1,08
50	1,33	1,12	1,10	1,09
80	1,34	1,13	1,09	1,10

De acordo com Dávila *et al.* (2013), o pKa da 7-hidroxi-flavona é 7,8 (meio hidroalcoólico). Assim, considerando esse dado e a concentração do

flavonóide na dispersão, o pH de desprotonação da hidroxila, posicionada no carbono 7 do anel A, é aproximadamente 6,4. Portanto acredita-se que a forma protonada da 7-hidroxi-flavona, representada pela estrutura A na Figura 63, contribua mais para supressão da fotoluminescência dos QDs do que o seu íon fenóxido (estrutura B).

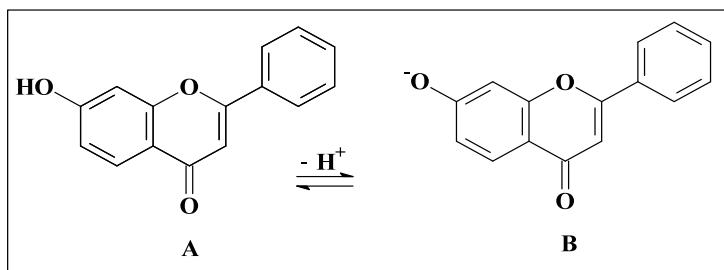


Figura 63 – Estrutura química da 7-hidroxi-flavona (A) e do seu respectivo íon fenóxido (B).

O modelo de Stern-Volmer para a 7-hidroxi-flavona, na faixa de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, nas dispersões preparadas com tampão com pH 6,0, produziram curvas com e sem correção de potencial efeito filtro (considerando os valores de absorvância em 460 e 529 nm) modeladas pelas equações $L_0/L = 36758 [7\text{-hidroxi-flavona}] + 1,015$ ($R^2 = 0,992$), para a curva corrigida, e $L_0/L = 35757 [7\text{-hidroxi-flavona}] + 1,016$ ($R^2 = 0,992$) para a curva não corrigida (Figura 64). Pela comparação das inclinações das curvas (36758 e 35757), praticamente não existiu contribuição de efeto filtro (diferença nas inclinações menor que 3%) sendo a supressão exclusivamente devido à interação ente 7-hidroxi-flavona e 3MPA-CdTe viabilizado pelo meio organizado com CTAB.

Na Tabela 28 estão expressas as razões L_0/L (em dispersões com tampão em pH 6,0) antes e após a correção pelos valores de absorvâncias nos comprimentos de onda de 460 nm e 529 nm.

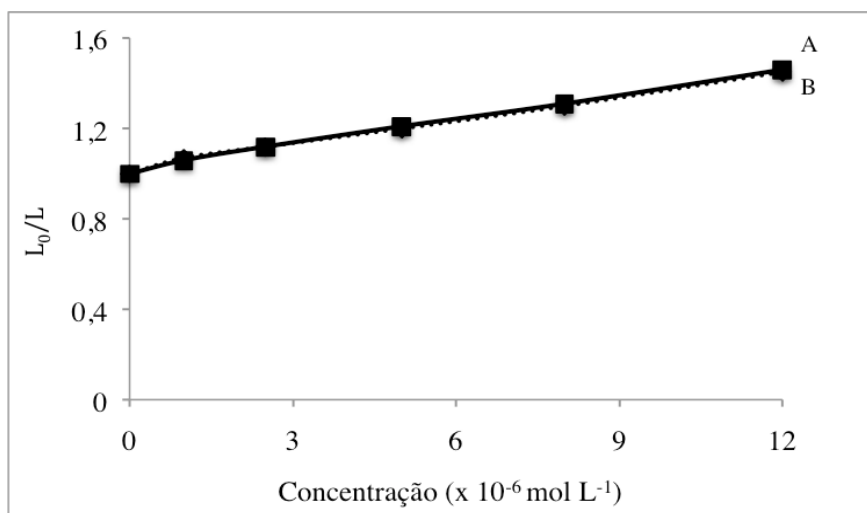


Figura 64 – Curva de supressão de fotoluminescência da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio organizado com CTAB, na presença de 7-hidroxi-flavona. (A) curva corrigida para potencial efeito filtro ($y = 36758x + 1,015$) e (B) curva não corrigida para potencial efeito filtro ($y = 35757x + 1,016$).

Tabela 28 – Dados das medições realizadas nas dispersões de trabalho em meio organizado com CTAB na presença de 7-hidroxi-flavona ($1,0 \times 10^{-6}$ a $1,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹). Dispersões contendo tampão fosfato com pH 6,0.

Concentração (mol L ⁻¹)	L_0/L	Absorvância em 460 nm	Absorvância em 520 nm	F_0/F_{cor}
0	1,00			1,00
$1,0 \times 10^{-6}$	1,07	0,07514	0,001465	1,07
$2,5 \times 10^{-6}$	1,12	0,006246	-0,00228	1,12
$5,0 \times 10^{-6}$	1,18	0,006083	-0,00221	1,18
$8,0 \times 10^{-6}$	1,30	0,01031	-0,000625	1,31
$1,2 \times 10^{-5}$	1,45	0,00767	-0,00163	1,46

Visando averiguar o comportamento da variação de sinal em função da concentração do supressor em dispersões básicas (no qual o íon fenóxido, proveniente da ionização da flavona, deveria prevalecer), a curva que relaciona L_0/L com a concentração do íon fenóxido foi construída. Para tal, as medições de sinal foram feitas nas dispersões preparadas com tampão em pH 8,0 onde foram adicionadas 7-hidroxi-flavona (na faixa de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹). Os dados experimentais obtidos (Tabela 29) mostraram que a resposta não seguiu o modelo de Stern-Volmer já que a variação dos valores da razão L_0/L foi insignificante, porém tendendo a um discreto crescimento, na faixa de concentração estabelecida. Portanto, conclui-se que, de fato, o ânion da 7-

hidroxi-flavona não favorece a interação com os QDs de maneira efetiva tanto quanto a estrutura protonada, que promoveu uma supressão onde a razão L_0/L variou de 1,07 a 1,45 na mesma faixa de concentração.

Tabela 29 – Dados das medições realizadas nas dispersões de trabalho em meio organizado com CTAB na presença de 7-hidroxi-flavona ($1,0 \times 10^{-6}$ a $1,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹). Dispersões contendo tampão fosfato com pH 8.0.

Concentração (mol L ⁻¹)	L_0/L	Absorvância em 460 nm	Absorvância em 520 nm	L_0/L_{corrig}
$1,0 \times 10^{-6}$	1,05	0,007636	0,001061	1,06
$2,5 \times 10^{-6}$	1,03	0,01067	0,00966	1,05
$5,0 \times 10^{-6}$	1,05	0,01007	0,00669	1,07
$8,0 \times 10^{-6}$	1,09	0,0085	0,000571	1,10
$1,2 \times 10^{-5}$	1,09	0,008385	0,001397	1,09

5.7.1.6. Rutina

No caso da rutina, os valores para as razões L_0/L , sumarizados na Tabela 30, mostraram que de uma maneira geral o sinal da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe é razoavelmente estável ao longo do tempo. Além disso, pode-se dizer que a interação entre QDs e rutina ocorre mais efetivamente nas dispersões com tampão na faixa de pH entre 6,0 e 7,4. Por outro lado, em pH 8,0 a supressão é discreta quando comparado com os demais resultados da faixa de pH testada. Os valores da razão L_0/L foram mais elevados em pH 6,0, o que significa que a supressão de fotoluminescência dos QDs é mais eficiente nesse meio levemente ácido (vide explicação para o comportamento causado na presença de 7-hidroxi-flavona). Conforme descrito nesse trabalho, as ionizações das três hidroxilas presentes na molécula de rutina começam a ocorrer em pHs 6,0; 7,1 e 8,3. Como observado nos resultados em meio organizado com CTAB, a formação de carga negativa nos flavonóides desfavorece a supressão de fotoluminescência dos QDs, desta forma, acredita-se que os íons fenóxidos, representados pelas estruturas B e C na Figura 65 devem prejudicar a supressão do sinal analítico.

Tabela 2 - Resposta da sonda 3MPA-CdTe em meio organizado com CTAB (expressa pela razão L_0/L), na presença de rutina ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, nos valores de pH 6,0; 7,0; 7,4 e 8,0) e CTAB ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).

Tempo (min.)	L_0/L em pH 6,0	L_0/L em pH 7,0	L_0/L em pH 7,4	L_0/L em pH 8,0
10	1,32	1,13	1,06	1,01
25	1,35	1,15	1,07	1,02
35	1,37	1,19	1,08	1,03
50	1,34	1,19	1,10	1,04
80	1,36	1,2	1,11	1,06

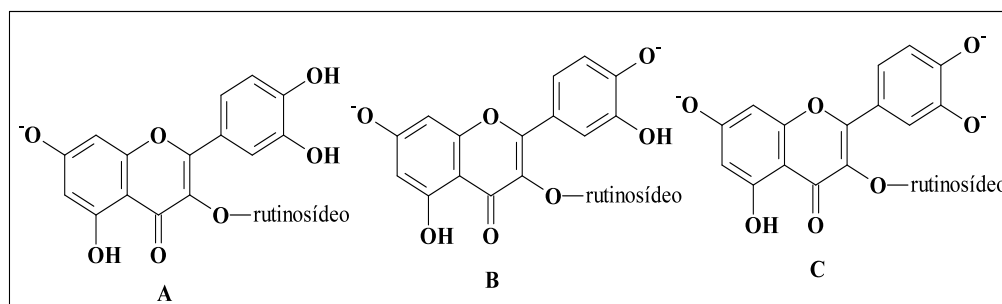


Figura 65 - Estruturas dos íons fenóxidos derivados da rutina provenientes a ionizações referentes a pK_{a1} (A), pK_{a2} (B) e pK_{a3} .

O comportamento contraditório em relação aos resultados observados com a rutina em relação aos das quercetina é evidente. A quercetina interage com os QDs em meio não organizado mais efetivamente que a rutina. Este fato é explicado pelo impedimento estérico causado pelo substituinte rutinosídeo presente na estrutura da rutina, como mencionado. Já em meio organizado com o surfactante, a rutina causa supressão de fotoluminescência mais efetiva que em meio sem CTAB. Por outro lado a quercetina parece não afetar o comportamento da sonda em meio organizado.

Essa comparação é importante, porque a única diferença entre rutina e quercetina é a presença do substituinte rutinosídeo ligado na posição 3 do anel C. Desta forma conclui-se que a parte da estrutura da rutina responsável pela interação com a sonda (em meio organizado com tampão em pH 6,0) não é a do flavonóide em si, e sim a do substituinte rutinosídeo.

O modelo de Stern-Volmer foi usado a fim de estabelecer a relação entre a diminuição da intensidade de fotoluminescência com o aumento da

concentração de rutina adicionada às dispersões com tampão em pH 6,0. As curvas de supressão obtidas (Figura 66) com e sem correção do efeito filtro foram respectivamente $L_0/L = 34626 [\text{rutina}] + 1,013$ ($R^2 = 0,989$) e $L_0/L = 33262 [\text{rutina}] + 1,008$ ($R^2 = 0,991$) na faixa linear de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina. Comparando as inclinações das curvas percebeu-se que efetivamente não existiu contribuição de atenuação por efeito filtro (diferença abaixo de 4%). Na Tabela 31 encontram-se as razões L_0/L antes e após a correção dos valores de absorvância.

Tabela 31 – Dados das medições realizadas nas dispersões de trabalho em meio organizado com CTAB na presença de rutina ($1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Dispersões contendo tampão fosfato com pH 6,0.

Concentração (mol L^{-1})	L_0/L	Absorvância em 460nm	Absorvância em (520nm)	L_0/L_{cor}
0	1,00			1,00
$1,0 \times 10^{-6}$	1,06	0,01329	0,003626	1,07
$5,0 \times 10^{-6}$	1,16	0,01974	0,003305	1,18
8×10^{-6}	1,27	0,01527	0,00401	1,28
$1,0 \times 10^{-5}$	1,35	0,01706	-0,00174	1,37

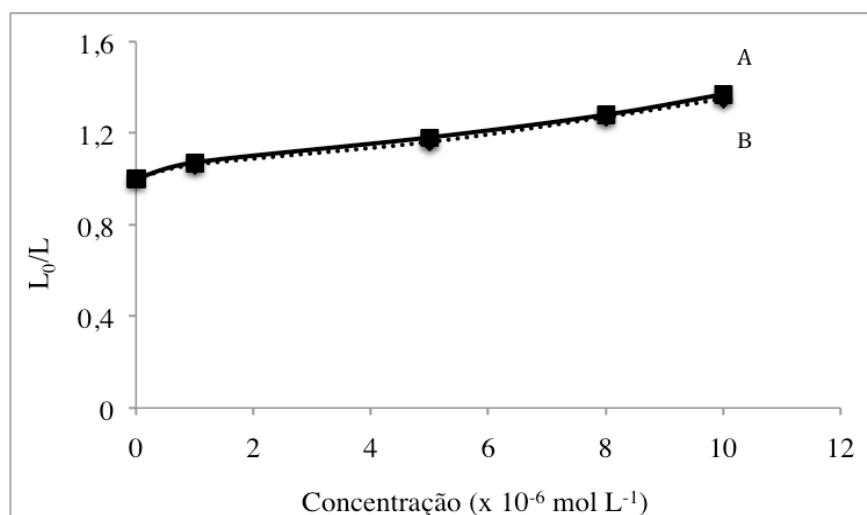


Figura 66 - Curva de supressão de fotoluminescência da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio organizado com CTAB, na presença de rutina. (A) curva corrigida para potencial efeito filtro ($y = 34626x + 1,013$) e (B) curva não corrigida para potencial efeito filtro ($y = 33262x + 1,008$).

5.7.1.7. Miricetina

Os resultados para as razões L_0/L das dispersões dos QDs em meio organizado com CTAB contendo miricetina mostraram que o sinal é altamente instável em função do tempo, assim como foi o caso observado em meio aquoso sem CTAB. A tendência de decréscimo de sinal ao longo do tempo ocorreu nas dispersões em todos os valores de pH testados. Contudo essa tendência foi mais pronunciada na medida em que ocorre elevação no pH das dispersões, conforme pode ser visto nos resultados sumarizados na Tabela 32.

Tabela 32 - Resposta da sonda 3MPA-CdTe em meio organizado com CTAB (expressa pela razão L_0/L), na presença de miricetina ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, nos valores de pH 6,0; 7,0; 7,4 e 8,0) e CTAB ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).

Tempo (min.)	L_0/L em pH 6,0	L_0/L em pH 7,0	L_0/L em pH 7,4	L_0/L em pH 8,0
10	1,01	1,07	1,65	2,85
25	1,06	1,26	2,00	3,30
35	1,12	1,44	2,46	3,58
50	1,19	1,60	2,74	3,62
80	1,24	1,87	3,02	3,84

Na Figura 67 são mostrados os gráficos de L_0/L (com valores corrigidos) em função do tempo e que confirmam que, assim como no meio sem CTAB, a miricetina provoca a instabilidade do sinal que tende a piorar em meio com pH mais elevado. Nos dois meios, os produtos de ionização da miricetina podem gerar intermediários excessivamente reativos que interagem com a sonda de maneira incontrolável.

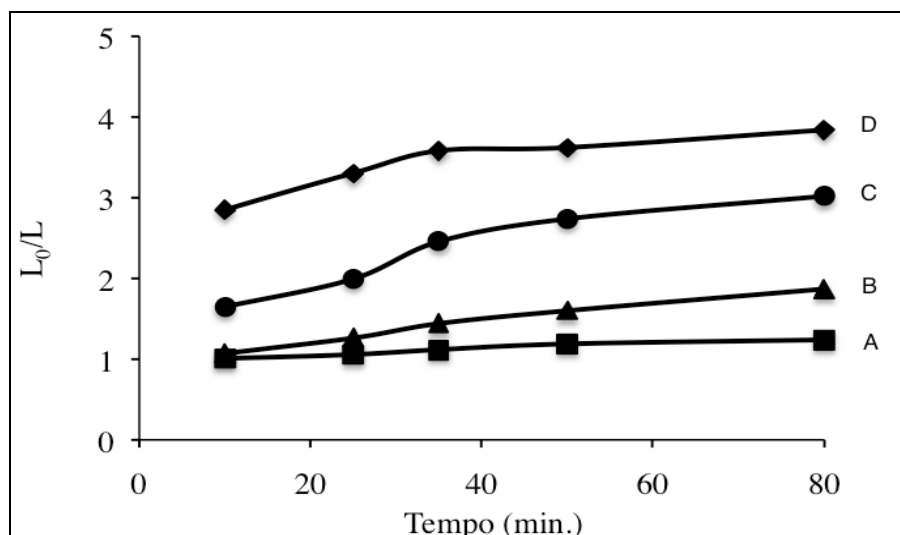


Figura 67 – Resposta da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio organizado com CTAB na presença de miricetina ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) nos valores de pH (A) 6,0, (B) 7,0, (C) 7,4 e (D) 8,0.

Alguns dos mecanismos existentes para avaliar o tipo de supressão de fotoluminescência causado na sonda são classificados como quenching dinâmico e quenching estático (Liu *et al.*, 2010). A obtenção de curvas de supressão com variações de temperatura, utilizando o modelo de Stern-Volmer é uma das maneiras para se avaliar tais supressões. Um estudo realizado com a sonda 3MPA-CdTe em meio contendo o surfactante CTAB na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e na presença de concentrações crescentes de rutina ($1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na faixa de temperatura de 20 a 35 °C, indicou uma diminuição nas inclinações das curvas, e consequentemente nos valores das constantes de Stern- Volmer (Figura 68). O aumento da temperatura provoca uma diminuição da estabilidade do complexo formado, caracterizando a supressão fotoluminescente como quenching estático.

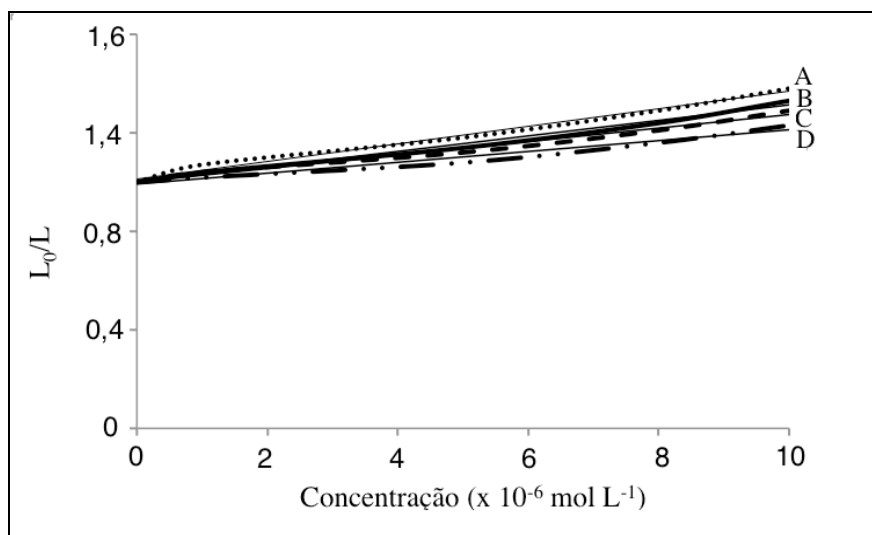


Figura 68 - Gráficos de curvas de supressão da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio organizado na presença de diferentes concentrações de rutina ($1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes temperatura: (A) 20°C ($y = 35749x + 1,012$); (B) 25°C ($y = 31551x + 0,998$); (C) 30°C ($y = 27433x + 1,000$) e (D) 35°C ($y = 22032x + 0,992$),

5.7.2.

Parâmetros de interação entre os flavonóides (flavona, 3-hidroxi-flavona, 7-hidroxi-flavona e rutina) e QDs de 3MPA-CdTe em meio organizado com agregados de CTAB: constantes de Stern-Volmer, constante de ligação e número de sítios

De acordo com os resultados obtidos nas seções anteriores, verificou-se que flavona, 3-hidroxi-flavona, 7-hidroxi-flavona e rutina promovem a supressão da fotoluminescência da sonda em meio organizado (contendo tampão ajustado em pH 6,0) proporcional à concentração do flavonóide presente nas dispersões. As faixas lineares de concentrações foram de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para flavona, 3-hidroxi-flavona e 7-hidroxi-flavona e de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para rutina. As equações das curvas analíticas com correção do efeito filtro assim como as da curva sem correção, e os valores de constantes de Stern Volmer (K_{SV}) estão sumarizadas na Tabela 33. Analisando os valores de K_{SV} das curvas corrigidas para efeito filtro dos quatro flavonóides, verificou-se que o efeito de supressão de sinal da sonda causada pela presença de rutina, flavona e 7-hidroxi-flavona é muito similar. Contudo, no caso da 3-hidroxi-flavona, o efeito de supressão é cerca de 1,5 vezes mais intenso que o dos outros flavonóides.

Tabela 33 – Equações das curvas de Stern-Volmer com e sem correção para potencial efeito filtro para os flavonóides flavona, 3-hidroxi-flavona, 7-hidroxi-flavona e rutina, em meio organizado contendo tampão ajustado em pH 6,0.

Flavonóide	Faixa linear (mol L ⁻¹)	R ²	Equação da curva	K _{sv} (L mol ⁻¹)
FLAV ^a	1,0 x 10 ⁻⁶ a 1,2 x 10 ⁻⁵	0,991	Y ^c = 35067 X ^d + 1,025	3,0 x 10 ⁴
3Hf ^a	1,0 x 10 ⁻⁶ a 1,2 x 10 ⁻⁵	0,990	Y ^c = 52849 X ^d + 1,03	4,8 x 10 ⁴
7Hf ^a	1,0 x 10 ⁻⁶ a 1,2 x 10 ⁻⁵	0,992	Y ^c = 35757 X ^d + 1,016	3,4 x 10 ⁴
RUT ^a	1,0 x 10 ⁻⁶ a 1,0 x 10 ⁻⁵	0,991	Y ^c = 33262 X ^d + 1,008	3,2 x 10 ⁴
FLAV ^b	1,0 x 10 ⁻⁶ a 1,2 x 10 ⁻⁵	0,990	Y ^c = 35382 X ^d + 1,025	3,1 x 10 ⁴
3Hf ^b	1,0 x 10 ⁻⁶ a 1,2 x 10 ⁻⁵	0,992	Y ^c = 56710 X ^d + 1,032	5,1 x 10 ⁴
7Hf ^b	1,0 x 10 ⁻⁶ a 1,2 x 10 ⁻⁵	0,992	Y ^c = 36758 X ^d + 1,015	3,5 x 10 ⁴
RUT ^b	1,0 x 10 ⁻⁶ a 1,0 x 10 ⁻⁵	0,989	Y ^c = 34629 X ^d + 1,013	3,3 x 10 ⁴

^a Curva sem correção do efeito filtro

^b Curva com correção do efeito filtro

^c Y = L₀/L

^d X = [flavonoide]

As constantes de ligação correlacionadas a interação entre os QDs de 3MPA-CdTe e os flavonóides foram obtidas através de gráficos log [(L₀-L)/L] em função do log [flavonóide] e de cálculos usando a Equação 12 que relaciona as intensidades de fotoluminescência da sonda na presença e na ausência do flavonóide com a concentração do flavonóide e o número de sítios de interação. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 34, 3-hidroxi-flavona teve a maior constante de ligação e o maior número de sítios, o que justifica a interação mais efetiva deste flavonóide com os QDs dentre os flavonóides testados no meio organizado com CTAB. Sua constante de ligação é cerca de quatro vezes maior que a da rutina, doze vezes maior que a da 7-hidroxi-flavona e cerca de 18 vezes maior que a da flavona.

Tabela 34 – Equações, constantes de ligação e número de sítios obtidos através de cálculos com os dados de RUT, FLA, 3Hf e 7Hf em meio organizado.

Flavonóide	Equação da curva	Constante de ligação	Número de sítios
Rutina	y = 0,646 x + 2,72	5,2 x 10 ²	0,646
Flavona	y = 0,596x + 2,547	3,5 x 10 ²	0,596
3HF	y = 0,805 + 3,798	6,3 x 10 ³	0,805
7Hf	y = 0,730 + 3,205	1,6 x 10 ³	0,730

5.7.3.

Comparação entre os resultados obtidos em meio aquoso e em meio aquosos organizado por CTAB

Constatou-se que na sonda preparada em meio aquoso sem surfactante o tempo requerido para estabilização da fotoluminescência é de aproximadamente 40 min após o preparo. A alíquota de 1,0 mL de metanol (10% v/v) presente nas dispersões promove um ganho de cerca de 20% na intensidade do sinal e assegura a total dissolução do flavonóides no meio aquoso. A alíquota de 1,0 mL (10% v/v) de tampão fosfato (pH 7,4 com concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) presente nas dispersões assegura a integridade do pH na faixa robusta entre 7,0 e 8,0, de maneira mais eficiente que o tampão Tris (pH 7,4; $0,01 \text{ mol L}^{-1}$). Para que ocorra a interação entre os QDs e os flavonóides dois fatores foram relevantes: (i) extensão da conjugação eletrônica entre os três anéis (A, B e C) que formam o esqueleto base dos flavonóides e (ii) substituintes hidroxila no anel B. Os flavonóides que geraram supressão efetiva de fotoluminescência em meio aquoso (propocional ao aumento de concentração seguindo o modelo de Stern-Volmer) foram quercetina, canferol, rutina e morina cujos valores de K_{SV} foram $1,2 \times 10^4$, $5,5 \times 10^3$, $3,8 \times 10^3$ e $2,9 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ respectivamente (para curvas corrigidas para efeito filtro). A quercetina apresentou maior interação com a sonda devido à presença dos dois substituintes hidroxila em posição *orto* no anel B. A faixa linear de resposta variou de $5,0 \times 10^{-6}$ a $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para os flavonóides quercetina, rutina e morina e de $1,0 \times 10^{-5}$ a $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para o flavonóide canferol. Para rutina, quercetina e canferol (na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) a supressão de fotoluminescência teve um comportamento que não variou no intervalo de pH de 7,0 a 8,0. Correção dos valores de absorvância nos comprimentos de onda de 460 e 527 nm é recomendada a fim de se evitar a pequena contribuição de efeito filtro na resposta óptica da sonda.

Em meio organizado com CTAB, os surfactantes testados foram o CTAB, Triton X-100 e Triton X-114, dentre estes, o que habilitou melhor estabilização do sinal da sonda foi surfactante catiônico CTAB. Na concentração de CTAB de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (concentração acima da CMC) o sinal da sonda apresentou baixíssima variação de intensidade a partir de 20 min da sua preparação, tempo este que é metade do observado em meio aquoso sem surfactante e que, por isso, é vantajoso do ponto de vista prático de uso da sonda. Em relação à capacidade

tamponante do sistema, o uso do tampão fosfato (pH 7,4; 0,01 mol L⁻¹, compondo 10% do volume total de cada dispersão) continuou sendo mais eficiente que o Tris. Devido à presença de surfactante no meio, não houve a necessidade de se adicionar metanol para assegurar a completa dissolução dos flavonóides na dispersão de trabalho. O sinal da sonda foi estável nas dispersões que continham tampão na faixa de pH de 6,0 a 8,0, contudo a magnitude de fotoluminescência da sonda foi maior na faixa de pH entre 7,0 e 8,0. Dentre os flavonóides testados, os que interagiram com a sonda, suprimindo a fotoluminescência foram: flavona, 3-hidroxi-flavona, 5-hidroxi-flavona, 6-hidroxi-flavona, 7-hidroxi-flavona, rutina e miricetina. Esse último interagiu com a sonda de maneira errática (independente da presença de surfactante) devido as sucessivas ionizações de três hidroxilas e oxidação das espécies formadas, provavelmente muito reativas em relação aos QDs. Descobriu-se também que a rutina interage preferencialmente através do substituinte rutinosídeo (em contradição com o resultado obtido em meio aquoso não organizado com surfactante). Dentre as flavonas, as que produzem maior efeito de supressão proporcionalmente ao aumento de concentração foram flavona, 3-hidroxi-flavona e 7-hidroxi-flavona. Para essa última, a supressão somente foi confirmada em dispersões contendo tampão em pH 6,0. Já em dispersões contendo tampão em pH 8,0 (na mesma faixa de concentração do efeito produzido em pH 6,0) não houve supressão proporcional ao aumento de concentração de 7-hidroxi-flavona. Este fato, associado ao comportamento observado na presença de 3-hidroxi-flavona, 6-hidroxi-flavona e rutina indicaram que carga(s) negativa(s) presente(s) nas moléculas dos flavonóides desfavorecem a interação com os QDs em meio organizado com surfactante. Todas as curvas de supressão (em meio organizado com CTAB) de 3-hidroxi-flavona, 7-hidroxi-flavona, rutina e flavona foram obtidas em dispersões contendo tampão ajustado em pH 6,0, e as respectivas constantes de Stern-Volmer foram $5,1 \times 10^4$, $3,5 \times 10^4$, $3,4 \times 10^4$ e $3,1 \times 10^4$. O maior efeito de supressão de fotoluminescência foi o causado pelo 3-hidroxi-flavona (maior K_{SV}). A faixa de concentração das curvas de Stern-Volmer na presença de flavona, 3-hidroxi-flavona e 7-hidroxi-flavona variou de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a $1,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e na presença de rutina variou de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Isto demonstrou que em meio organizado com surfactante, a sensibilidade da sonda à presença desses flavonóides aumenta, não sendo

necessário levar em conta a absorvância dos supressores para correção de efeito filtro.

A quercetina, que promoveu a supressão de fotoluminescência mais efetiva em meio aquoso sem surfactante, não foi capaz de suprimir o sinal da sonda em meio organizado. Já flavona que não interagiu em meio aquoso não organizado, devido a ausência de substituintes nos anéis A, B e C, promoveu uma considerável supressão no sinal analítico em meio organizado com CTAB. Dentre os flavonóides testados o único que promoveu supressão de sinal da sonda proporcional ao aumento da concentração nos dois meios (meio organizado com surfactante e meio sem surfactante) foi a rutina. No caso da quercetina e de outros flavonóides que se ionizam em solução, a interação com os QDs em meio contendo CTAB é prejudicada.

5.8.

Determinação de quercetina através da supressão de fotoluminescência da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso

Tirando proveito dos resultados obtidos com a sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso, que indicaram quercetina como um eficiente supressor de fotoluminescência, métodos para determinação desse flavonóide em amostras de suplemento alimentar e de extratos de cebola roxa e amarela foram propostos. As dispersões de trabalho (condição otimizada) foram constituídas de 60 μL de dispersão estoque dos QDs de 3MPA-CdTe ($1,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$), 1,0 mL de tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4), volumes apropriados de solução estoque de quercetina $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em metanol (volume total de metanol de 1,0 mL ou 10% v/v em volume) e água ultrapura para completar o volume final de 10,00 mL para cada dispersão.

Na Figura 69 encontram-se os espectros de fotoluminescência da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso, na ausência (a) e na presença de quercetina na faixa de $5,0 \times 10^{-6}$ a $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (linhas b a h). A magnitude do sinal da sonda diminuiu proporcionalmente com o aumento da concentração de quercetina sem deslocamento no λ_{em} de 527 nm.

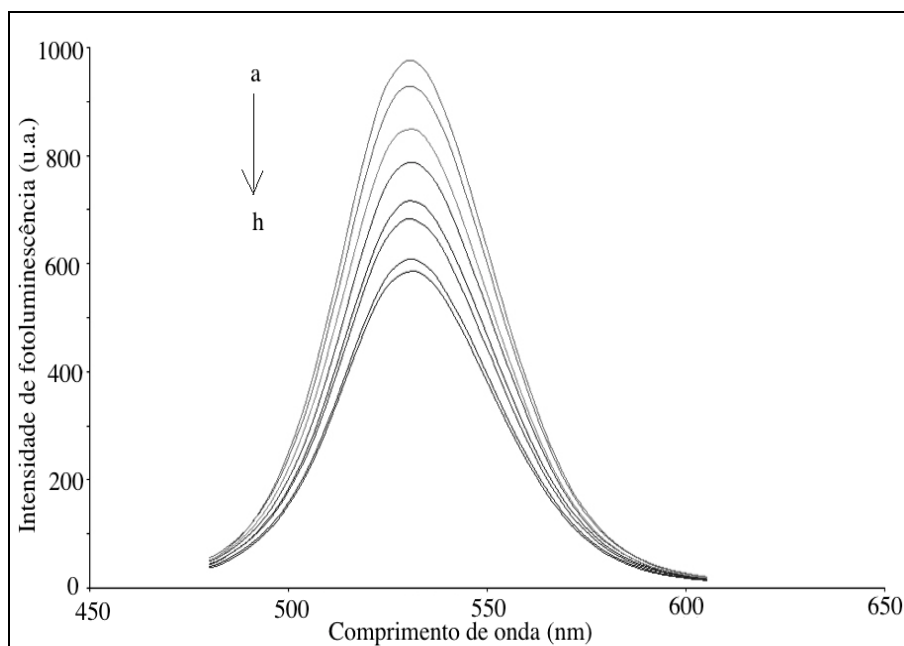


Figura 69 - Supressão de fotoluminescência da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso, na presença de quercetina nas concentrações de 0 (a); 0,5 (b); 1,0 (c); 2,0 (d); 3,0 (e); 4,0 (f); 5,0 (g) e 6,0 (h) $\times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

Os espectros de absorção das dispersões contendo quercetina na faixa de concentração de $5,0 \times 10^{-6}$ a $6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ são mostrados na Figura 70. Os valores de absorvância foram monitorados nos comprimentos de onda de 460 e 527 nm (respectivamente os λ_{exc} e λ_{em} da sonda), onde o máximo de 0,0476 foi obtido em 460 nm para a concentração de quercetina de $6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Devido a esse perfil de absorção, foi necessário corrigir os valores dos sinais (utilizando-se a Equação (7)) a fim de evitar a contribuição de efeito de filtro interno na supressão.

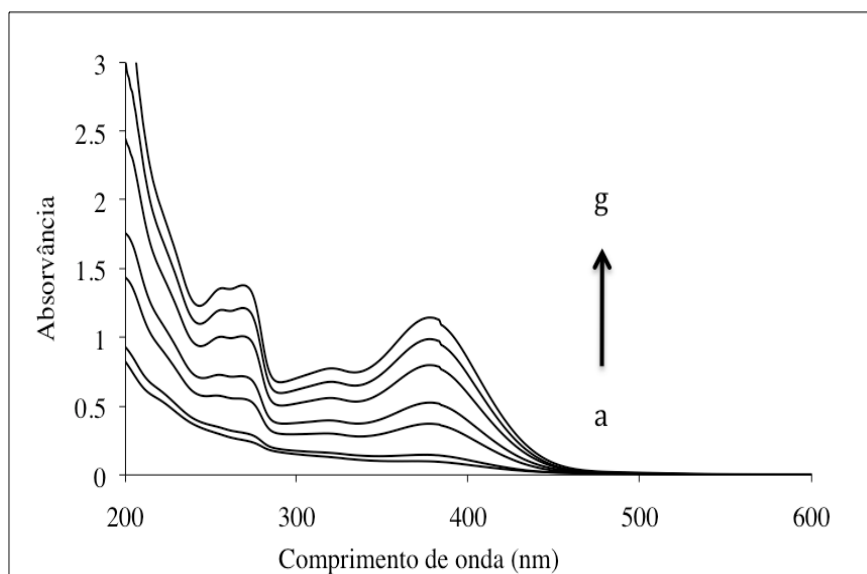


Figura 70 - Espectros de absorção de dispersões aquosas dos QDs de 3MPA-CdTe contendo quercetina na faixa de concentração de 0,5 (a); 1,0 (b) ; 2,0 (c); 3,0 (d); 4,0 (e); 5,0 (f) e 6,0 $\times 10^{-5}$ mol L⁻¹(g).

Na Tabela 35 encontram-se os dados referentes à razão L_0/L e os valores de L_0 e L corrigidos e não corrigidos, bem como os valores de absorvância em 460 e 527 nm do sistema QDs de 3MPA-CdTe-quercetina. A partir desses dados, foram obtidas as curvas com correção para efeito filtro ($L_0/L = 1,0 \times 10^4$ [quercetina] + 1,0084 com $R^2 = 0,9907$) e sem correção para efeito filtro ($L_0/L = 1,1 \times 10^4$ [quercetina] + 1,0105 com $R^2 = 0,9938$) através do modelo de supressão de Stern-Volmer. Conforme descrito e observado na Figura 71, uma pequena contribuição de efeito filtro foi observada.

Tabela 35 – Dados das medições realizadas em dispersões de trabalho em meio aquoso na presença de quercetina ($5,0 \times 10^{-6}$ a $6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹).

Concentração (mol L ⁻¹)	L_0 e L sem correção	L_0/L sem correção	Absorvância em 460nm	Absorvância em 527nm	L_0 e L corrigidos	L_0/L corrigido
0	973	-	0,020434	0,005970	1002	-
$5,0 \times 10^{-6}$	928	1,05	0,023700	0,006647	961	1,04
$1,0 \times 10^{-5}$	850	1,14	0,025378	0,055560	830	1,14
$2,0 \times 10^{-5}$	778	1,25	0,031580	0,009778	806	1,24
$3,0 \times 10^{-5}$	727	1,34	0,038126	0,007277	766	1,31
$4,0 \times 10^{-5}$	686	1,42	0,042820	0,006505	723	1,39
$5,0 \times 10^{-5}$	614	1,58	0,044060	0,006410	651	1,53
$6,0 \times 10^{-5}$	587	1,66	0,047600	0,012335	636	1,60

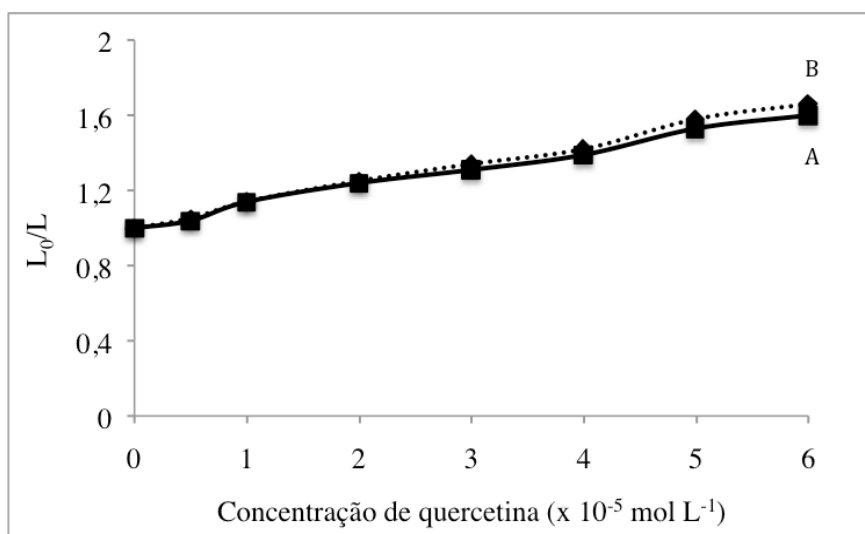


Figura 71 - (A) Curva de supressão de fotoluminescência da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe corrigida para potencial efeito filtro ($y = 10060x + 1,008$; $R^2 = 0,99$) e (B) curva de supressão de fotoluminescência da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe não corrigida para potencial efeito filtro ($y = 10958x + 1,01$; $R^2 = 0,993$).

Uma maneira de avaliar o tipo de supressão de fotoluminescência é através da obtenção das curvas de supressão em diferentes temperaturas, utilizando o modelo de Stern-Volmer. Assim, um estudo foi realizado com a sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso na presença de concentrações crescentes de quercetina ($1,0 \times 10^{-5}$ a $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na faixa de temperatura de 20 a 32 °C (Figura 72). O resultado indicou um decréscimo na inclinação das curvas gerado pelo aumento da temperatura. Consequentemente os valores das constantes de Stern-Volmer também decresceram, caracterizando uma supressão de fotoluminescência de natureza estática (quenching estático). Portanto é possível afirmar que a interação entre as espécies se dá através da formação de um complexo estável.

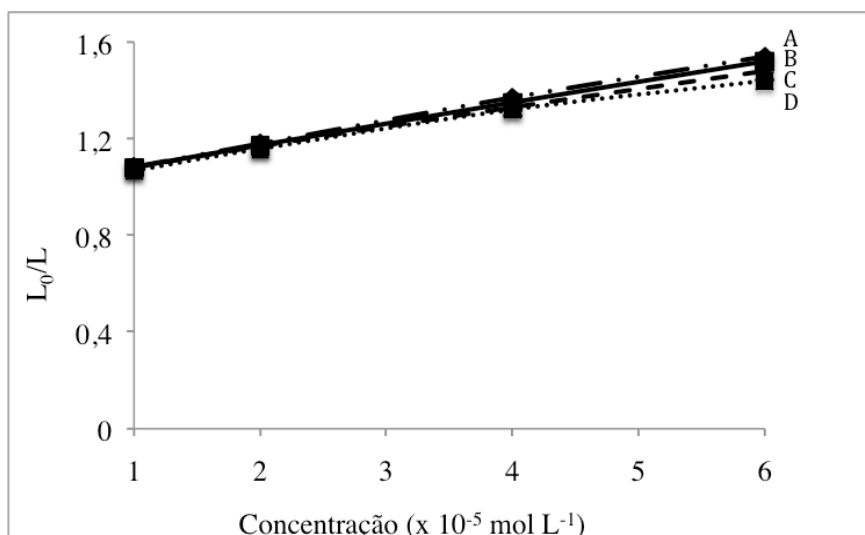


Figura 72 – Curvas de supressão da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso na presença de diferentes concentrações de quercetina em diferentes temperatura de medição: (A) 20; (B) 24; (C) 28 e (D) 32 °C.

5.8.1. Validação

O método desenvolvido foi validado a fim de promover confiabilidade nos resultados obtidos. A sensibilidade de $1,0 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ foi expressa através da inclinação da curva analítica. O limite de detecção de $3,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ foi calculado como a concentração de quercetina capaz de reduzir o sinal médio da sonda (x_b) para um valor igual a $x_b - 3_{sb}$, onde s_b representa o desvio padrão de 10 medições do branco. O limite de quantificação de $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foi calculado como a concentração de quercetina capaz de reduzir o sinal médio da sonda (x_b) para um valor igual a $x_b - 10_{sb}$.

O desvio padrão de 10 medições do branco foi de 16,4, com um coeficiente de variação percentual de 1,7%. Assim, a precisão das medições realizadas em dispersões contendo quercetina foi calculada a partir da equação $S_{(L_0/L)} = L_0/L \times [(S_{L/L})^2 + (S_{L_0/L_0})^2]^{1/2}$, como a variação de L_0/L para dez soluções independentes (em 2 níveis de concentração de quercetina, $2,0 \times 10^{-5}$ e $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Os resultados encontrados foram de 2,9% e 2,5%, para a concentração menor e concentração maior respectivamente. A precisão intermediária também foi avaliada e expressa pelos valores de desvio padrão relativo (DPR) ou de coeficientes de variação (CV) dos resultados obtidos. Foram preparadas dez dispersões independentes contendo quercetina na

concentração de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e outras dez dispersões independentes na concentração de $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com os resultados das medições de fotoluminescência interpoladas na curva analítica. Dois dias depois foram realizadas novas análises nos mesmos níveis de concentração de quercetina com interpolação dos sinais fotoluminescentes na curva analítica preparada no mesmo dia. No primeiro teste, a concentração média de quercetina encontrada foi de $2,02 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com variância (s^2) de $4,6 \times 10^{-12}$, desvio padrão (s) de $2,1 \times 10^{-6}$ e CV de 0,106%). No teste do segundo dia foi encontrada uma concentração média de quercetina de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (s^2 de $3,0 \times 10^{-12}$; s^2 de $1,7 \times 10^{-6}$, e DPR de 0,086%). A similaridade das variâncias entre os dois dias foi provada utilizando-se o teste F ($s^2_{\text{maior}}/s^2_{\text{menor}}$) ($n_1 = n_2 = 10$, grau de liberdade do numerador e denominador = 9), onde o valor de F_{calc} foi de 2,7 (com F_{tab} de 3,18 (Anexo 3). Para a concentração estimada de $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, os resultados dos testes realizados no primeiro dia indicaram uma concentração média de $4,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (s^2 de $3,0 \times 10^{-12}$, s de $1,7 \times 10^{-6}$ e DPR de 0,041%). A concentração média encontrada no segundo dia foi de $3,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (s^2 de $6,9 \times 10^{-12}$, s de $2,6 \times 10^{-6}$ e DPR de 0,09%). A similaridade de variância dos dois dias foi provada utilizando-se o teste F ($s^2_{\text{maior}}/s^2_{\text{menor}}$) ($n_1=n_2=10$, grau de liberdade do numerador e denominador =9), e o valor de F_{calc} foi de 2,3 enquanto a do F_{tab} é 3,18. Portanto, pode-se concluir que como o valor de F_{tab} é maior que o do F_{calc} , as variâncias das medições realizadas nos dias são compatíveis e o método proposto possui precisão intermediária satisfatória para os dois níveis de concentração testados. A precisão da curva analítica também foi verificada utilizando o desvio padrão das inclinações de curvas de supressão obtidas em três dias diferentes. As inclinações das curvas foram 10958, 10370 e 11293 L mol^{-1} . A média obtida foi de 10874, ou $1,1 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$, com desvio padrão de 467 e coeficiente de variação percentual de 4,3%.

A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação. Foram preparadas dez dispersões independentes contendo quercetina nos níveis de concentração de $2,0 \times 10^{-5}$ e $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, calculadas a partir dos valores indicados em uma amostra de suplemento alimentar constituída de quercetina e ácido ascórbico. A média dos sinais da sonda para dez medições das amostras, para cada nível de quercetina, foram interpoladas na curva analítica de supressão. Os valores encontrados foram comparados com os valores das concentrações

estimadas ($2,0 \times 10^{-5}$ e $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹). As porcentagens de recuperação foram de $100 \pm 1,7\%$ e $103 \pm 1,5\%$ para as concentrações de $2,0 \times 10^{-5}$ e $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de quercetina respectivamente.

5.8.2.

Estudos de interferentes em dispersões dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso na presença de quercetina

Os testes de interferência foram realizados a fim de avaliar a seletividade de resposta da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso na presença de quercetina em relação à presença de outros flavonóides (como hesperetina, naringenina, galangina, rutina, flavona, morina, canferol, catequina e taxifolin) e na presença de ácido ascórbico. Para interpretação dos resultados foi considerada a razão entre a atenuação de fotoluminescência da sonda na presença de quercetina (I_{QUE}) e a atenuação de fotoluminescência da sonda na presença da quercetina e um flavonóide ($I_{QUE+FLAVONÓIDE}$), onde as proporções molares testadas (QUE:FLAVONÓIDE) foram de 1:1 e 1:2, em dispersões aquosas contendo quercetina em três níveis de concentração de $5,0 \times 10^{-6}$; $3,0 \times 10^{-5}$ e $6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Recuperações maiores que 105% e menores de 95% caracterizaram interferência. Os resultados mostrados na Tabela 36 indicaram que no primeiro nível de concentração de quercetina (onde os níveis de concentração dos flavonóides foram de $5,0 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹), a catequina, hesperitina e rutina não foram considerados interferentes. Os testes realizados com os outros dois níveis de concentração de quercetina ($3,0 \times 10^{-5}$ e $6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) indicaram que todos os flavonóides (na faixa de concentração de $3,0 \times 10^{-5}$ a $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) tornam-se interferentes, contudo é importante ressaltar que a interferência limita-se a uma variação máxima de 16%, e que provavelmente, como a interação dos QDs com a quercetina é mais forte, quando dobra-se ou quadruplica-se a concentração do interferente, o valor da recuperação não varia de maneira equivalente com o aumento da concentração do flavonóide intereferente. Isto indicou que deve existir uma concentração tal de quercetina que impede a interação dos demais flavonóides com a sonda. Por exemplo, podem-se citar os resultados obtidos na presença do flavonóide naringenina, referentes à faixa de concentração de $3,0 \times 10^{-5}$ a $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹,

onde os valores de recuperação para as dispersões contendo quercetina ($3,0 \times 10^{-5}$ e $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) variaram somente de 92,5 a 95,1%.

Tabela 36 - Testes de interferência em dispersões contendo quercetina ($5,0 \times 10^{-6}$, $3,0 \times 10^{-5}$ e $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em função da presença dos demais flavonoides nas proporções quercetina:flavonóide de 1:1 e 1:2, expressos pelas recuperações de quercetina na sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso.

Flavonóide	Concentração de QUE $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$		Concentração de QUE $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$		Concentração de QUE $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	
	Recuperação (%) (1:1)	Recuperação (%) (1:2)	Recuperação (%) (1:1)	Recuperação (%) (1:2)	Recuperação (%) (1:1)	Recuperação (%) (1:2)
CAT	99,2	98,6	92,5	94,7	93,2	94,2
FLA	98,0	94,7	94,1	86,4	95,8	88,4
GAL	98,1	95,5	92	85,3	94,8	87,1
HSPT	98,1	98,7	92,6	84,0	92,5	85,8
CAN	94,4	91,7	94	83,7	93,6	86,1
MOR	96,7	92,8	95	92,4	95,8	91,5
NAR	95,1	89,5	95,1	92,8	96,1	92,5
RUT	98,8	97,2	93,3	84,9	93,2	87,8
TAX	95,7	90,9	93,9	92,3	94,7	91,9

Foi necessário realizar também testes de interferência em dispersões aquosas contendo quercetina e ácido ascórbico, uma vez que, esse último encontra-se presente em suplementos alimentares contendo quercetina, com a função de potencializar a ação antioxidante do suplemento. Para este estudo foram preparadas soluções de quercetina e de ácido ascórbico nas concentrações de $1,0 \times 10^{-2}$ e $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente (tomando-se como referencial a massas declaradas pelo fabricante do suplemento, de 250 e 100 mg/cápsula de quercetina e ácido ascórbico). A concentração de quercetina presentes nas dispersões aquosas foi de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e os testes foram realizados nas proporções molares de 1:1; 1:2; 1:5; 1:10 e 1:20 (quercetina:ácido ascórbico). Para interpretação dos resultados foi considerada a razão entre a atenuação do sinal da sonda na presença de quercetina (I_{QUE}) e a atenuação do sinal da sonda na presença de quercetina e ácido ascórbico ($I_{\text{QUE+AA}}$). De acordo os resultados sumarizados na Tabela 37, concluiu-se que o ácido ascórbico não interfere na intensidade do sinal da sonda quando encontra-se presente até a concentração limítrofe de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (proporção 1:5). Nas proporções de 1:10 e 1:20 a

interferência foi elevada. Devido a acidez do ácido ascórbico, os valores de pH das dispersões foram monitorados, e os resultados indicaram que até a proporção de 1:5 a variação é muito pequena. A variação do pH da solução se torna mais elevada nas proporções de 1:10 e 1:20, afetando a fotoluminescência dos QDs. Contudo, essas duas últimas proporções do ácido ascórbico são elevadíssimas em relação a proporção encontrada no suplemento, que é de 2,5:1 para quercetina:ácido ascórbico.

Na Figura 73 encontram-se os espectros de absorção de dispersões de quercetina ($2,0 \times 10^{-5}$ mol) na ausência e na presença de ácido ascórbico ($2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹). Como pode ser observado, não há modificação no espectro da dispersão na presença de ácido ascórbico quando comparado com espectro da dispersão na presença de quercetina.

Tabela 37 - Resultados dos testes de interferência em dispersões contendo quercetina $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e ácido ascórbico, nas proporções molares de 1:1; 1:2; 1:5; 1:10 e 1:20 (quercetina:ácido ascórbico), expressos em termos de recuperação.

Proporção molar quercetina:ácido ascórbico	Recuperação (%)	pH
1: 1	100	7,45
1: 2	99,6	7,46
1:5	104,3	7,36
1:10	164	7,22
1:20	224	6,97

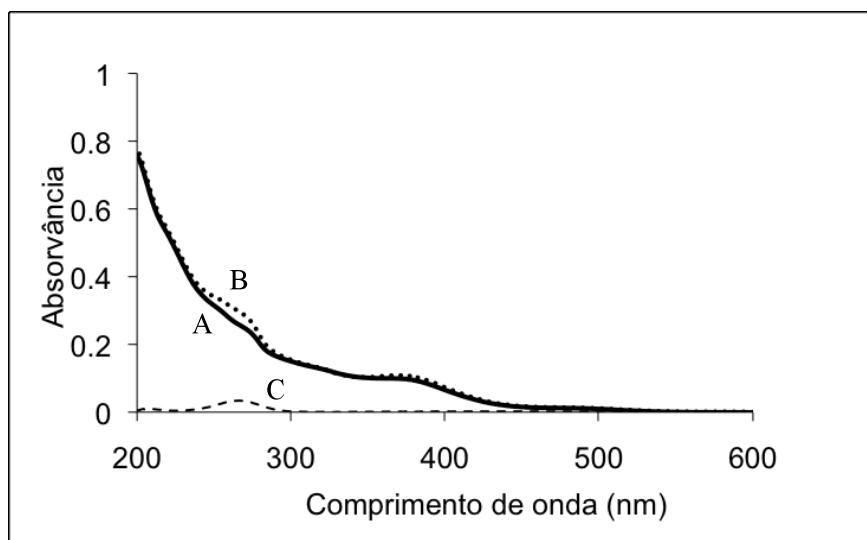


Figura 73 – Espectros de absorção de dispersões dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso na presença de (A) quercetina $2,0 \times 10^{-5}$ mol, (B) quercetina e ácido ascórbico, ambos na concentração de $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e (C) na ausência de quercetina e de ácido ascórbico (dispersão branco).

5.8.3.

Separação e isolamento de quercetina através de cromatografia em camada fina

A separação e isolamento de quercetina foram requeridos levando-se em consideração a complexidade das matrizes das amostras de extratos de cebola. Portanto, foi proposta uma abordagem simples usando TLC. Primeiramente, as condições dessa cromatografia foram ajustadas usando padrões de quercetina, para que depois a abordagem fosse aplicada na separação de quercetina presente em extratos de cebola.

A fim de se avaliar o efeito causado pela matriz de sílica gel (fase estacionária sem indicador de fluorescência) na intensidade do sinal da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe, um teste preliminar foi realizado com quantidades entre 0,01 a 0,07 g de fase estacionária removida (raspada) da placa de TLC. Essas massas foram colocadas em copos Becker de 10 mL, onde se adicionou 4,0 mL de metanol para que fossem levados ao banho de ultrassom por 5 min. Posteriormente, a filtração foi realizada com auxílio de seringas de plástico acopladas a filtros de PTFE com membrana de 0,45 µm. A fase líquida foi recolhida em balões volumétricos de 10,00 mL e o solvente orgânico foi evaporado sob fluxo de nitrogênio (N₂). Por fim, o conteúdo de cada balão

volumétrico foi reconstituído com a dispersão aquosa dos QDs de 3MPA-CdTe (na condição de trabalho da sonda sem surfactante) para realização das medições. Os resultados indicaram que as dispersões preparadas com a reconstituição dos extratos contendo massas até 0,05 g de fase sólida tiveram uma atenuação na intensidade do sinal da sonda que variou de 5 a 8%. Portanto, para o procedimento, fixou-se a massa de sílica gel, raspada da placa, menores que 0,05 g. Desse modo, em todas as medições realizadas a partir de extrações da placa de TLC, monitorou-se a atenuação causada no sinal da sonda por um “branco” da placa de TLC (branco TLC) a fim de compensar a interferência imposta pela matriz de sílica gel nas medições com as fases estacionárias contendo quercetina.

A eluição dos padrões de quercetina foi realizada em copos Becker de 250 mL (cuba de eluição) contendo uma mistura eluente constituída por acetato de etila/hexano/ácido acético 20/19/1 v/v/v. Após a fase móvel alcançar o topo da placa, o fator de retenção da quercetina foi calculado, obtendo-se um valor de 0,35, identificada visualmente pela coloração amarelada da mancha. A remoção dos padrões de quercetina da fase estacionária e a reconstituição na condição de trabalho foram realizadas conforme descrito para matriz de sílica gel.

A avaliação da resposta das curvas analíticas preparadas com padrões de quercetina recolhidos na TLC foi realizada em dias diferentes (cada dia foi construída uma curva analítica, totalizando cinco dias). As curvas foram preparadas com a amostragem de diferentes volumes de solução padrão de quercetina $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (5; 10; 15 e 20 μL) na placa de TLC de modo a se ter respectivamente massas adicionadas de 30, 60, 91 e 120 μg . O modelo de Stern-Volmer foi usado de modo a obter uma relação entre a intensidade da fotoluminescência e a quantidade de quercetina reconstituída na dispersão dos QDs. As curvas analíticas apresentaram faixas lineares entre $1,0$ e $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (ou entre 30 a 120 μg) com modelos de equação para as curvas e coeficientes de determinação indicados na Tabela 38. Os parâmetros das curvas de supressão indicaram que a correção do efeito de filtro interno praticamente não alterou os valores das razões L_0/L , sendo as inclinações praticamente às mesmas, para as curvas não corrigida e corrigida, respectivamente. A diferença das médias das sensibilidades entre a curva corrigida e não corrigida para efeito filtro foi de 4,1%.

Tabela 38 - Modelos matemáticos para as curvas analíticas de quercetina não corrigidas e curvas com correção do efeito filtro, e coeficientes de determinação, para os cinco dias de análise.

	Curva corrigida	R2	Curva sem correção	R2
dia 1	$y = 8100x + 1,002$	0,998	$y = 8500x + 1,003$	0,996
dia 2	$y = 7700x + 1,004$	0,993	$y = 7950x + 1,006$	0,993
dia 3	$y = 8600x + 0,992$	0,992	$y = 8990x + 0,997$	0,993
dia 4	$y = 7600x + 1,002$	0,997	$y = 7900x + 1,003$	0,995
dia 5	$y = 7800x + 1,008$	0,995	$y = 8100x + 1,007$	0,995

Antes do procedimento de extração da quercetina presente em cascas de cebola, foram realizados experimentos a fim de garantir que a perda desse analito na TLC fosse pequena, viabilizando a técnica de cromatografia de camada fina para separação, isolamento e quantificação de quercetina. Para isto, foram construídas curvas analíticas para quercetina (sem adição na placa de TLC) a fim de comparar com a inclinação obtida com a curva analítica obtida com os padrões previamente adicionados à placa de TLC.

As curvas dos padrões que não foram aplicados na placa de TLC foram construídas com a adição de diferentes volumes (5, 10, 15 e 20 μL) de uma solução $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ quercetina a balões volumétricos de 10,00 mL contendo dispersões aquosas dos QDs de 3MPA-CdTe, 1,0 mL metanol, 1,0 mL tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,4) e água ultrapura. O modelo de Stern-Volmer foi usado de modo a obter uma relação entre a intensidade de fotoluminescência da sonda e a concentração de quercetina adicionada no meio. Na Tabela 39 e na Tabela 40 são mostrados os valores de L_0/L calculados a partir dos sinais medidos nas dispersões dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso na presença das diferentes concentrações de quercetina.

Tabela 39 – Valores de L_0/L obtidos para a curva analítica de supressão de fotoluminescência após adição de solução de quercetina diretamente nas dispersões dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso (cinco dias diferentes).

Concentração ($\times 10^{-5}$ mol L ⁻¹)	L_0/L dia 1	L_0/L dia 2	L_0/L dia 3	L_0/L dia 4	L_0/L dia 5
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1,0	1,07	1,07	1,08	1,07	1,07
2,0	1,18	1,18	1,16	1,15	1,16
3,0	1,27	1,27	1,24	1,25	1,23
4,0	1,35	1,33	1,34	1,32	1,30

Tabela 40 – Valores de L_0/L obtidos para a curva analítica de supressão de fotoluminescência após adição de quercetina, previamente adicionadas na placa de TLC, nas dispersões dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso (cinco dias diferentes).

Concentração ($\times 10^{-5}$ mol L ⁻¹)	L_0/L dia 1	L_0/L dia 2	L_0/L dia 3	L_0/L dia 4	L_0/L dia 5
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1,0	1,08	1,08	1,06	1,08	1,09
2,0	1,17	1,16	1,17	1,15	1,17
3,0	1,25	1,25	1,25	1,24	1,25
4,0	1,32	1,30	1,33	1,30	1,31

Na Figura 74 e na Figura 75 são mostradas as curvas analíticas obtidas com adição de soluções de quercetina na sonda diretamente ou usando material recolhido da placa de TLC após a adição de padrão de quercetina. Ao se comparar as razões L_0/L obtidas para os dois tipos de curva, para todos os níveis de concentração de quercetina adicionados nas dispersões, verificou-se que estes valores são praticamente iguais, sendo a perda de sinal, que deve ser equivalente à perda de quercetina na placa TLC, equivalente a no máximo 7,3% para a concentração de $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ do analito. Esta diferença pode ser considerada satisfatória frente ao transtorno da preparação de curvas de calibração usando padrões previamente adicionados à cromatoplaca.

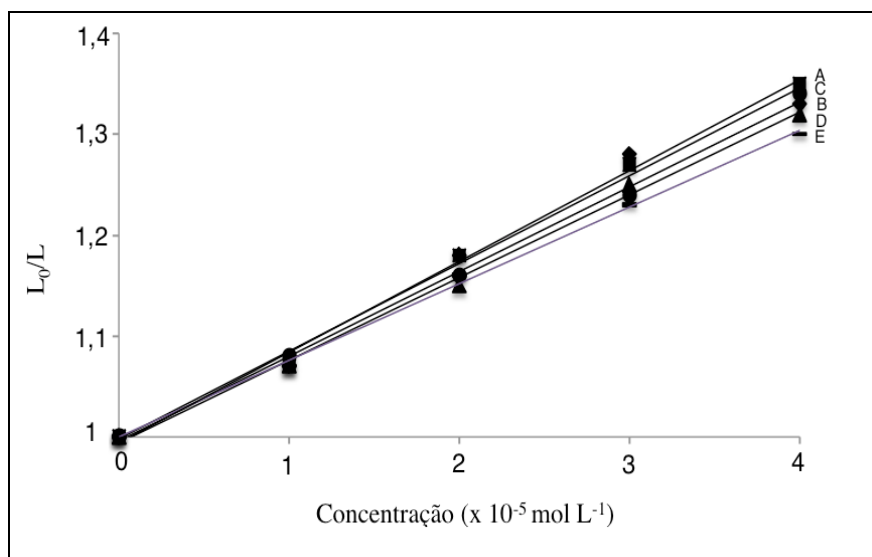


Figura 74 - Curvas de supressão de fotoluminescência da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso após adição direta da solução de quercetina: (A) dia 1; (B) dia 2; (C) dia 3; (D) dia 4 e (E) dia 5.

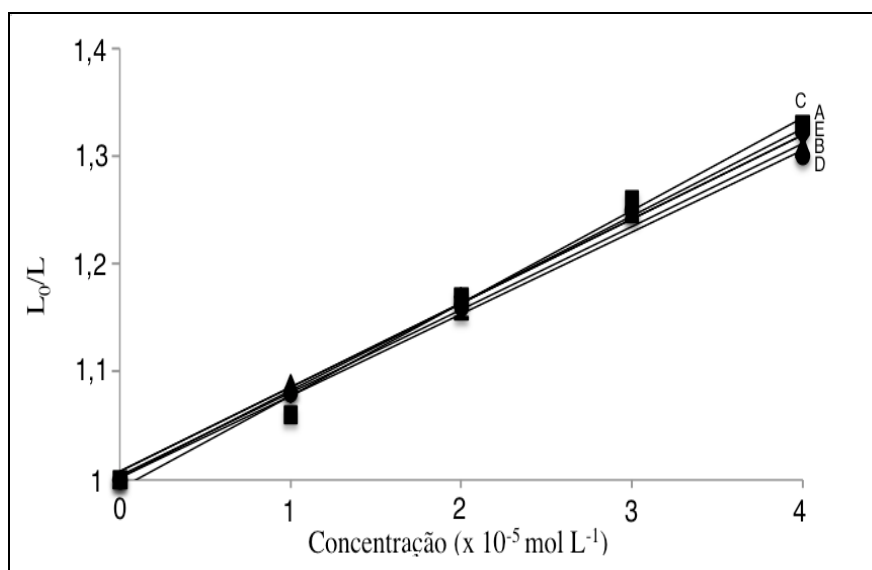


Figura 75 - Curvas de supressão de fotoluminescência da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso, após adição de quercetina recuperada das placas de TLC: (A) dia 1; (B) dia 2; (C) dia 3; (D) dia 4 e (E) dia 5.

Na Tabela 41 se encontram as inclinações das curvas analíticas (cinco curvas, cada uma em um dia diferente) obtidas usando adição direta da solução de quercetina e usando a adição de solução de quercetina recuperada das placas de TLC. A média das inclinações das curvas TLC foi de 7960 ($s = 403$ e $CV = 5,1\%$) e a média das inclinações das curvas sem TLC foi de 8380 ($s = 531$ e CV

= 6,1%), sendo a diferença entre as inclinações das duas curvas de apenas 5,3%. O teste estatístico t de Student foi realizado indicando que não houve diferença significativa entre os dois métodos de obtenção das curvas analíticas de quercetina ($t_{\text{experimental}} = 1,42$ e $t_{\text{tabelado}} = 2,78$). Este resultado confirma que a perda de quercetina na placa de TLC foi pequena, viabilizando a TLC para separação da quercetina dos constituintes da cebola prévia à quantificação. O efeito da matriz da sílica causada na intensidade fotoluminescente da sonda variou entre 6 e 8% nos cinco dias.

Tabela 41 - Modelos matemáticos obtidos a partir de curvas analíticas de quercetina por TLC e sem TLC, em diferentes dias

	Curva TLC	Curva sem TLC
dia 1	$y = 8100 + 1,002$	$y = 9000 + 0,994$
dia 2	$y = 7700x + 1,004$	$y = 8700x + 0,998$
dia 3	$y = 8600x + 0,992$	$y = 8400x + 0,996$
dia 4	$y = 7600x + 1,002$	$y = 8200x + 0,994$
dia 5	$y = 7800x + 1,008$	$y = 7600x + 1$

5.8.4.

Determinação de quercetina em amostras de extratos de cebola utilizando-se a abordagem TLC por detecção com sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio aquoso sem surfactante

A sonda dos QDs 3MPA-CdTe foi utilizada para quantificação de quercetina em amostras de extratos de cebola amarela, roxa e branca.

Na Figura 76 tem-se uma fotografia da cromatoplaca após a aplicação das condições para a separação da quercetina, onde são indicados os resultados da cromatografia de: (amostragem A) um padrão de quercetina ($2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$); (amostragem B) amostra de extrato de cebola amarela; (amostragem C) amostra de extrato de cebola roxa; (amostragem D) amostra de extrato de cebola branca. A eluição foi feita conforme descrita no item 3.8.3, e a mesma foi considerada, a princípio, bem sucedida, uma vez que foi possível observar claramente a separação efetiva da quercetina (R_f de 0,35) dos demais componentes dos extratos. Foi constatado também que visualmente não se observou a presença de quercetina no extrato de cebola branca.

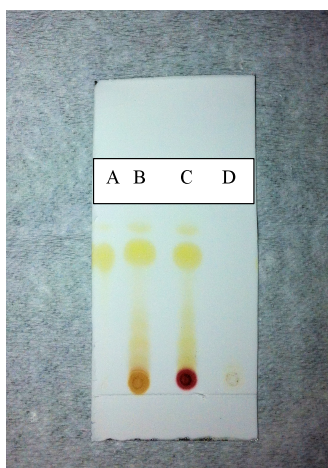


Figura 76 - Cromatograma da separação por TLC de 15 μL de uma solução padrão de quercetina $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (A), 15 μL de uma amostra de extrato de cebola amarela (B), 15 μL de uma amostra de extrato de cebola roxa (C) e 15 μL de uma amostra de extrato de cebola branca (D).

Na Figura 77 estão representados espectros de absorção da sonda de trabalho dos QDs de 3MPA-CdTe (branco da sonda), de soluções padrões de quercetina (concentração final de $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) preparadas com alíquotas da solução estoque diluídas em metanol ou extraídas da cromatoplaca e dissolvidos em metanol, espectros de soluções contendo os extratos de cebolas, espectros da quercetina separadas dos extratos das cebolas por meio de TLC, espectros de uma solução preparada após adição de sílica da cromatoplaca (sem passagem de amostra).

Constatou-se que o perfil de absorção da amostra do extrato de cebola branca, tanto antes quanto após recolhimento da mancha em R_f de 0,35 na cromatoplaca, é completamente distinto do perfil obtido para as amostras de cebola amarela e roxa (que contém quercetina) e do padrão de quercetina. O resultado indicou que a cebola branca não tem quercetina ou a tem presente em quantidades não detectáveis pelo método. Verificou-se também que as absorvâncias obtidas para extratos de cebola amarela e roxa antes da eluição na TLC foram bem maiores que as observadas para a solução dos extratos preparadas usando material extraído da cromatoplaca, da mancha característica da quercetina. Esse resultado indicou que a técnica é fundamental para se evitar um falso resultado na dosagem pela sonda (em

função do efeito filtro). Percebe-se, de acordo com os perfis de absorção de soluções padrão de quercetina que após a eluição pela placa cromatográfica há uma diminuição no valor da absorvância medida, que é associada às perdas de material na placa (9%).

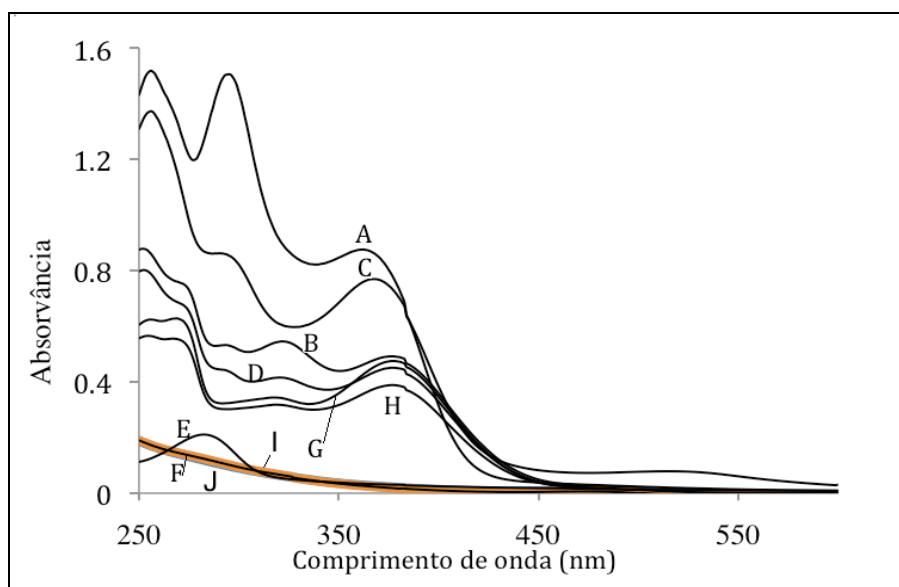


Figura 77 - Espectros de absorção de extratos de cebola (15 μL de extrato de cebola em 10,00 mL de solução) e de solução padrão de quercetina: (A) cebola amarela sem separação prévia por TLC; (B) cebola amarela após separação prévia por TLC; (C) cebola roxa sem separação prévia por TLC; (D) cebola roxa após separação prévia por TLC; (E) cebola branca sem separação prévia por TLC; (F) cebola branca após separação prévia por TLC; (G) solução padrão de quercetina $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sem passar na placa de TLC; (H) solução padrão de quercetina $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ após passagem na placa de TLC; (I) dispersão dos QDs de 3MPA-CdTe sem passar na placa de TLC; (J) branco da placa TLC reconstituída na dispersão dos QDs de 3MPA-CdTe.

As absorvâncias das dispersões preparadas com a extração da mancha coletada da cromatoplaça (em R_f 0,35) foram medidas para efeito de correção de efeito filtro, sendo as razões L_0/L obtidas interpoladas em curvas analíticas preparadas com padrões de quercetina previamente aplicadas na cromatoplaça. O experimento foi realizado em dois dias diferentes cujas curvas analíticas foram $y = 7600x + 1,002$ para o primeiro dia e $y = 7800x + 1,008$ para o segundo dia. Para cada extrato (de cebola amarela e de cebola roxa) foram obtidas três soluções independentes preparadas com a mancha

coletada da cromatoplaca. A dosagem de quercetina foi expressa tanto em mol L^{-1} quanto em mg de quercetina por 10 g de amostra (considerando a massa inicial das cascas de cebola utilizadas para preparar os extratos).

Os resultados mostrados na Tabela 42 indicaram a presença de quercetina nos extratos de cebola roxa na concentração média de $3,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (equivalentes a 10,7 mg por 10 g de amostra). A concentração média de quercetina presente nas amostras dos extratos de cebola amarela foi de $2,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (equivalentes a 8,1 mg por 10 g de casca de cebola). O teste estatístico t de Student foi realizado a fim de avaliar qualquer diferença significativa nas concentrações de quercetina encontradas nos extratos de cebolas nos dois dias diferentes de análise. Os resultados indicaram que não houve diferença significativa entre os resultados das determinações (valores de $t_{\text{experimental}}$ de 0,93 e 0,44 para cebolas roxa e amarela, respectivamente, que são menores que o valor crítico do teste ($t_{\text{tabelado}}=2,78$).

Tabela 42 – Recuperações de quercetina em amostras de extratos de cebola roxa e amarela através da sonda 3MPA-CdTe em meio aquoso.

cebola	Concentração ($\times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$)			Concentração (mg/10g)		
	dia 1	Dia 2	média	dia 1	dia 2	média
roxa	$3,30 \pm 0,65$	$3,80 \pm 0,66$	3,60	$9,90 \pm 1,95$	$11,50 \pm 2,00$	10,70
amarela	$2,60 \pm 0,55$	$2,80 \pm 0,57$	2,70	$7,90 \pm 1,65$	$8,30 \pm 1,70$	8,10

As análises dos extratos de cebola também foram feitas com interpolação dos resultados em curvas analíticas preparadas com padrões adicionados diretamente nas sondas sem passá-las previamente na cromatoplaca. Isso foi feito para se avaliar a existência de qualquer diferença significativa quando comparado com os resultados obtidos com curva analítica preparadas com padrões que foram previamente aplicados na cromatoplaca e posteriormente reconstituídos em solução. As curvas analíticas (duas, sendo cada uma delas feita em um dia diferente) foram representadas pelas equações: $y = 8200x + 0,994$ (dia 1) e $y = 7600x + 1$ (dia 2).

As concentrações de quercetina encontradas em extratos de cebolas roxa e de cebola amarela usando as duas abordagens de curva analítica - (i)

com padrões de calibração adicionados diretamente na sonda e (ii) com adição dos padrões de calibração após reconstituídas da cromatoplaca - estão indicados na Tabela 43 (cebola roxa) e na Tabela 44 (cebola amarela). O teste estatístico indicou que não houve diferença significativa nas concentrações de quercetina obtidas pelas duas abordagens de curva analítica. Isto evidenciou que a quercetina pode ser isolada e separada dos outros componentes da cebola por TLC e quantificada por uma curva analítica simples, construída pela adição de diferentes volumes de quercetina em dispersões aquosas dos QDs. No entanto, a utilização da TLC é necessária para a separação e isolamento da quercetina da amostra, devido a complexidade da matriz da cebola.

Tabela 43- Concentrações de quercetina (mol L^{-1} e em mg por 10 g de casca de cebola) presentes em extratos de cebola roxa usando duas abordagens diferentes para as curvas analíticas do tipo Stern-Volmer: (i) com padrões de calibração adicionados diretamente na sonda e (ii) com adição dos padrões de calibração após reconstituídas da cromatoplaca.

	Curva sem TLC			Curva com TLC		
	Concentração ($\times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$)	Concentração (mg/10g)	DPR	Concentração ($\times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$)	Concentração (mg/10g)	DPR
dia 1	$3,10 \pm 6,60$	$9,40 \pm 2,00$	21,00	$3,30 \pm 0,65$	$9,90 \pm 1,95$	20,00
dia 2	$4,00 \pm 6,60$	$12,00 \pm 1,98$	16,50	$3,80 \pm 0,65$	$11,50 \pm 2,00$	17,00
Média	3,50	10,70		3,50	10,70	

Tabela 44 - Concentrações de quercetina (mol L^{-1} e em mg por 10 g de amostra) presentes em extratos de cebola amarela usando duas abordagens diferentes para as curvas analíticas do tipo Stern-Volmer: (i) com padrões de calibração adicionados diretamente na sonda e (ii) com adição dos padrões de calibração após reconstituídas da cromatoplaca.

	Curva sem TLC			Curva com TLC		
	Concentração ($\times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$)	Concentração (mg/10g)	DPR (%)	Concentração ($\times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$)	Concentração (mg/10g)	DPR (%)
dia 1	$2,50 \pm 0,46$	$7,60 \pm 1,40$	19,00	$2,60 \pm 0,54$	$7,90 \pm 1,65$	20,00
dia 2	$2,00 \pm 0,52$	$8,90 \pm 1,60$	18,30	$2,70 \pm 0,55$	$8,30 \pm 1,70$	17,00
Média	2,70	8,20		2,60	8,10	

5.8.5.

Determinação de quercetina em suplemento alimentar contendo quercetina e ácido ascórbico

A sonda dos QDs de 3MPA-CdTe também foi utilizada para dosagem de quercetina em amostras de suplemento alimentar contendo quercetina (250 mg por tablete) e ácido ascórbico (100 mg por tablete). A fim de validar o método proposto, utilizou-se a técnica de HPLC para analisar as mesmas amostras e com isso permitir a comparação de desempenho do método proposto neste trabalho.

O fluxograma apresentado na Figura 78 indica o preparo das amostras para as análises tanto por HPLC quanto pela abordagem com sonda dos QDs de 3MPA-CdTe. Os resultados obtidos pelas duas abordagens analíticas são apresentados na Tabela 45.

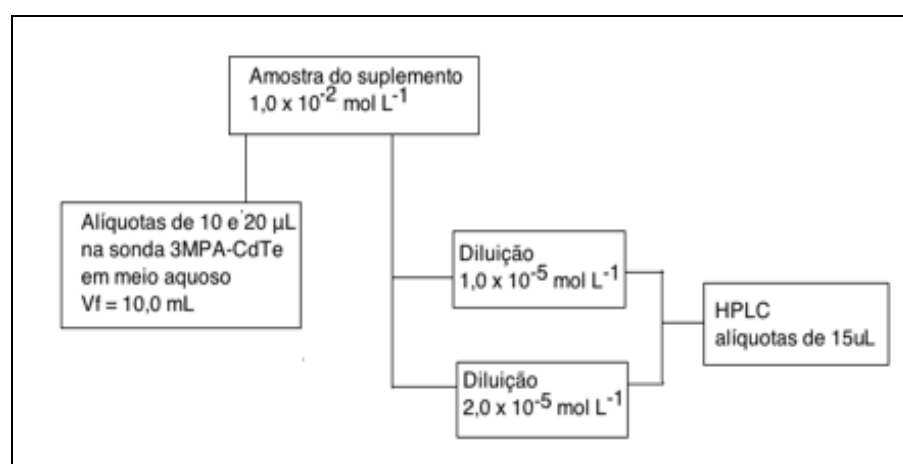


Figura 78 - Fluxograma de preparação de amostras de suplemento alimentar, e análises através da sonda 3MPA-CdTe em meio aquoso e HPLC.

Tabela 45 – Recuperações (Rec) obtidas para quantificação de quercetina em amostras de suplemento alimentar através do método da sonda dos QDs de 3MPA-CdTe por HPLC.

3MPA-CdTe em meio aquoso				HPLC		
Concentr. quercetina (mol L ⁻¹)	Concentr. encontrada (mol L ⁻¹)	DP	Rec. (%)	Concentr. encontrada (mol L ⁻¹)	DP	Rec (%)
1,0 x 10 ⁻⁵	1,03 x 10 ⁻⁵	7,14 x 10 ⁻⁷	103	1,06 x 10 ⁻⁵	5,37 x 10 ⁻⁷	106
2,0 x 10 ⁻⁵	1,98 x 10 ⁻⁵	1,35 x 10 ⁻⁶	99	2,02 x 10 ⁻⁵	1,24 x 10 ⁻⁶	101

As recuperações obtidas pelo método proposto foram próximas a 100% e foram estatisticamente iguais aos resultados obtidos por HPLC ($n = 3$; nível de confiança de 95%). Os testes F e t de Student foram feitos para avaliar as análises para cada nível de concentração de quercetina. O teste F indicou valores de $F_{\text{experimental}}$ de 1,8 e de 1,2 respectivamente para as soluções de amostra contendo os valores esperados de quercetina de $1,0 \times 10^{-5}$ e $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Esses valores foram menores que o valor crítico ($F_{\text{tab}} = 19$) indicando que as variâncias dos resultados obtidos com os dois métodos são similares. O teste t de Student mostrou que não há diferença significativa entre as concentrações médias de quercetina (em soluções de amostra nos dois níveis de concentração escolhidos) obtidas com ambos os métodos já que os valores de $t_{\text{experimental}}$ (0,67 e 0,44 para as soluções amostra contendo quercetina nas concentrações de $1,0 \times 10^{-5}$ e $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) foram menores que o valor crítico ($t_{\text{tabelado}} = 2,78$). Na Figura 79, estão representados os cromatogramas de uma solução padrão de quercetina $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e da amostra de suplemento contendo quercetina na concentração de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

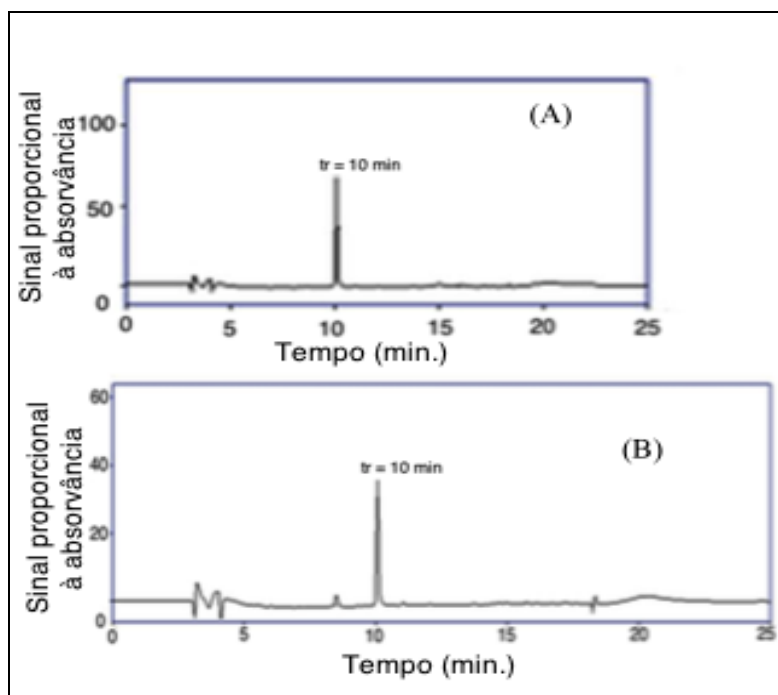


Figura 79 – Cromatogramas obtidos por HPLC mostrando os picos da quercetina e seus tempos de retenção (t_R) de (A) solução padrão de quercetina $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (em metanol) e (B) amostra do suplemento alimentar $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (em metanol).