



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Dissertação de Mestrado

**Pontos de carbono de *Spondias Dulcis Parkinson*
aplicados à determinação fluorimétrica de ácido
ascórbico em medicamentos**

Wallis Cavalcante do Nascimento

JOÃO PESSOA – PB

Fevereiro de 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Dissertação de Mestrado

**Pontos de carbono de *Spondias Dulcis* Parkinson
aplicados à determinação fluorimétrica de ácido
ascórbico em medicamentos**

Wallis Cavalcante do Nascimento

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração em Química Analítica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Kátia Messias Bichinho

JOÃO PESSOA – PB

Fevereiro de 2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

N244p Nascimento, Wallis Cavalcante do.

Pontos de carbono de Spondias dulcis Parkinson aplicados à determinação fluorimétrica de ácido ascórbico em medicamentos / Wallis Cavalcante do Nascimento. - João Pessoa, 2019.
85 f.

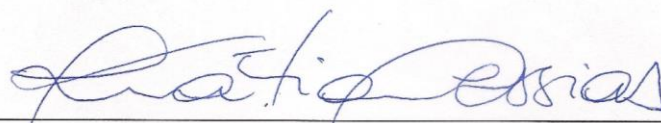
Orientação: Kátia Messias Bichinho.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. pontos de carbono. 2. ácido ascórbico. 3. efeito de filtro interno. 4. fluorescência. 5. medicamentos. I. Bichinho, Kátia Messias. II. Título.

UFPB/CCEN

Pontos de carbono de *Spondias dulcis* Parkinson aplicados à determinação fluorimétrica de ácido ascórbico em medicamentos.

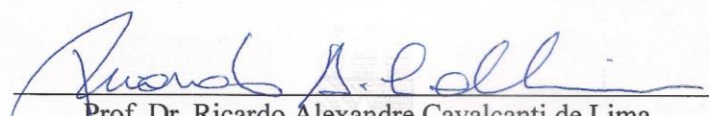
Dissertação de Mestrado apresentada pelo aluno Wallis Cavalcante do Nascimento e aprovada pela banca examinadora em 25 de fevereiro de 2019.



Prof.ª. Dra. Kátia Messias Bichinho
Orientadora/Presidente



Prof. Dr. Marcelo Batista de Lima
Examinador



Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima
Examinador

Dedico este trabalho,

*A Deus, a Jesus e aos anjos de luz e amor que estão sempre me ajudando a superar barreiras
e continuar acreditando que tudo é possível quando nos esforçamos para conquistar o
impossível; A minha família, em especial, Manoel e Edineide, por terem feito o impossível
para me criar neste mundo tão diversificado e cheio de desafios;
A Jaciele Alves, minha amiga e companheira de todos os momentos, que sempre me fez sorrir
e desviar dos pensamentos tempestuosos que a vida nos envia;
A todos os meus amigos e amigas que nunca esqueceram de me fazer sorrir.*

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pelo presente da vida e por me fazer superar as fraquezas que apareceram no mestrado, além da transformação moral que acontece todos os dias.

Aos anjos de luz, pelo auxílio dado todos os dias, seja fazendo análise ou durante os períodos de aprendizagens lendo os artigos e escrevendo os detalhes principais da dissertação.

A minha família, Manoel, Edineide, Willianne, Claudio, Tamires, Fellype e Ana Beatriz, que sempre me incentivaram a ultrapassar os desafios que a vida oferece, seja oferecendo um sorriso ou uma palavra de conforto.

A minha querida Jaciele Alves, que mostrou seu lindo sorriso e afeto a partir do momento que apareceu na minha vida. Sempre auxiliando na minha jornada diária de estudos e convivência. Eu te amo muito, minha querida Eleicaj!

A Prof.^a Dr.^a Kátia Messias Bichinho, além de orientadora uma amiga, que me oferece oportunidades diárias de aprender novas condutas, com o intuito de ser uma pessoa mais qualificada para as atividades futuras.

Ao Dr. Stéfani Iury Evangelista de Andrade, por ser um grande amigo e disponibilizar um pouco de tempo para me ajudar no desenvolvimento da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida, examinador da pré-banca, “o homem desenrolado” que me fez sorrir inúmeras vezes.

Ao Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima, que esteve sempre me dando uma palavra amiga.

Ao Prof. Dr. Marcelo Batista de Lima, pela disposição em participar da banca de defesa como um amigo e avaliador, e ao Prof. Dr. Márcio José Coelho de Pontes, que mesmo com apenas breves diálogos, considero como amigo.

A todos meus professores do PPGQ, em especial, ao Prof. Dr. Mário César Ugulino.

À turma da salinha, Ana Rosa, Juliana, Kelly, Daniella, João, Tassio, Thyago, Rosinaldo, Nayara, Jainny, Laila, Samanta e Matheus, que me fazem sorrir todos os dias.

Aos meus amigos da graduação, em especial: Alisson, André, Wallison, João, Adelino, Danielle, Jetro, Mariano, Diego Andrade e Edson, pelo companheirismo.

A todos os amigos e amigas que conheci na família LAQA, em especial, Flaviano, Monte, Flaviana, Socorro, Amanda, Anabel, Sófacles, Welligton, Alcides, Welma, Kevla, Mayara, Willy, Railson, Valber, Denise, Jaqueline, Suely e Katiusca (LEQA).

A CAPES, pela oportunidade de cursar o mestrado com bolsa de estudos.

Enfim, a todas as pessoas que fazem parte da minha vida seja direta ou indiretamente.

Resumo

Pontos de carbono de *Spondias dulcis Parkinson* aplicados à determinação de ácido ascórbico em medicamentos

Este trabalho apresenta um novo método fluorimétrico para determinação de ácido ascórbico em medicamentos utilizando pontos de carbono (PCs) e um espectrômetro miniaturizado portátil. Os PCs foram sintetizados por carbonização hidrotérmica em fase única, empregando o suco *Spondias dulcis Parkinson* como bioprecursor e etanolamina para dopagem com nitrogênio (NPCs). As nanopartículas apresentaram alta fluorescência de coloração azul ciano ($\lambda_{\text{MÁX.emis.}} = 488 \text{ nm}$) quando expostas à radiação ultravioleta ($\lambda_{\text{MÁX.exc.}} = 380 \text{ nm}$), com rendimento quântico de 12,0 %. Devido ao efeito de filtro interno, foi evidenciada forte supressão da fluorescência dos NPCs por íons cromo(VI), recuperada na presença de ácido ascórbico, decorrente da redução a íon cromo(III). As medidas quantitativas foram realizadas com 40 μL da solução de trabalho de NPCs e concentração de 10 mg L^{-1} de íon cromo(VI), em pH 6,9 (solução tampão fosfato). Com faixa linear entre 0,5 a 80 mg L^{-1} de ácido ascórbico ($R^2 = 0,998$), foram calculados os limites de detecção e quantificação de 0,15 e 0,46 mg L^{-1} , respectivamente. Os resultados da análise de variância, para um nível de confiança de 95 %, evidenciaram que não há falta de ajuste do modelo linear e a regressão é significativa. Uma recuperação de ácido ascórbico entre 90,6 e 107 % foi obtida, aceitável para análise de medicamentos. A média dos teores de ácido ascórbico das quatro amostras sólidas ficou próxima dos valores nominais rotulados (500 mg e 1.000 mg), diferentemente das cinco amostras líquidas, pois todos os resultados calculados ficaram abaixo do valor nominal de 200 mg mL^{-1} , tanto para o método proposto quanto o de referência (161,0 mg mL^{-1} a 170,5 mg mL^{-1}), evidenciando provável degradação do analito.

Palavras-chave: pontos de carbono; ácido ascórbico; efeito do filtro interno; fluorescência; medicamentos.

Abstract

Carbon dot from *SPONDIAS DULCIS PARKINSON* applied to the fluorimetric determination of ascorbic acid in medicines

This work presents a new fluorimetric method for determination of ascorbic acid in medicaments using carbon points (PCs) and a portable miniaturized spectrometer. The PCs were synthesized by hydrothermal carbonization in a single phase, using *Spondias dulcis Parkinson* as a bioprecursor and ethanolamine for doping with nitrogen (NPCs). The nanoparticles showed high cyan blue fluorescence ($\lambda_{\text{Max.emis.}} = 488 \text{ nm}$) when exposed to ultraviolet radiation ($\lambda_{\text{Max.exc.}} = 380 \text{ nm}$), with a quantum yield of 12.0%. Due to the internal filter effect, strong suppression of the fluorescence of the NPCs by chromium(VI) ions, recovered in the presence of ascorbic acid, due to the reduction to chromium(III) ion, was evidenced. The quantitative measurements were performed with 40 μL of the working solution of NPCs and concentration of 10 mg L^{-1} of chromium (VI) ion solution at pH 6.9 (phosphate buffer solution). With a linear range between 0.50 and 80,0 mg L^{-1} of ascorbic acid ($R^2 = 0.998$), the detection and quantification limits of 0.15 and 0.46 mg L^{-1} , respectively, were calculated. The results of the analysis of variance, for a confidence level of 95%, showed that there is no lack of fit of the linear model and the regression is significant. An ascorbic acid recovery between 90.6 and 107 % was obtained, acceptable for drug analysis. The average of the ascorbic acid contents of the four solid samples was close to the nominal values labeled (500 mg and 1,000 mg), differently from the five liquid samples, since all the calculated results were below the nominal value of 200 mg mL^{-1} , both for (161.0 mg mL^{-1} to 170.5 mg mL^{-1}), evidencing probable degradation of the analyte in this presentation form of medicines.

Keywords: carbon dots; ascorbic acid; internal filter effect; fluorescence; medicines.

Lista de figuras

Figura 3.1 – Representação esquemática das diferentes nanoestruturas de carbono: (a) grafite; (b) nanodiamante; (c) fulereno; (d) nanotubo de carbono de parede simples; (e) pontos quânticos de carbono; (f) grafeno. 22

Figura 3.2 – Efeito de supressão da fluorescência das nanopartículas na presença uma espécie supressora. 24

Figura 3.3 – Diagrama esquemático dos métodos de síntese de PCs, *top-down* e *bottom-up*. 25

Figura 3.4 – Fórmula estrutural do ácido ascórbico (AA) 28

Figura 3.5 – Diagrama de níveis de energia de uma espécie molecular durante absorção, relaxamento não radiativo e fluorescência; E_0 = estado fundamental; E_1 = estado fundamental excitado; E_2 = estado excitado de alta energia 31

Figura 4.1– Esquema ilustrativo das etapas de síntese dos NPCs por carbonização hidrotérmica. Fotografia da solução de trabalho dos NPCs sob: (1) luz visível; (2) luz ultravioleta, $\lambda_{\text{máx.exc}} = 350 \text{ nm}$. 43

Figura 4.2 – Fotografia do sistema de detecção *Ocean Optics*: (1) detector fluorescente; (2) acessório de fixação da cubeta de quartzo; (3) LED-UV montado em dissipador de calor e (4) placa Arduíno®. 52

Figura 4.3 Fotografia da placa de Arduíno® com i) GND pinos de referência ou terra e ii) fonte de tensão de 3,3 V para alimentação de LED UV com corrente máxima de 50 mA 53

Figura 5.1 – Fotografia dos NPCs sintetizados: a) material carbonizado; b) NPCs diluídos em água ultrapura. 55

Figura 5.2 – Espectros de fluorescência molecular obtidos para a solução de trabalho dos NPCs, excitados em: a) $\lambda = 280 \text{ nm}$ (); b) $\lambda = 290 \text{ nm}$ (); $\lambda = 300 \text{ nm}$ (); $\lambda = 310 \text{ nm}$ ()

); $\lambda = 320 \text{ nm}$ (■); $\lambda = 330 \text{ nm}$ (■); $\lambda = 340 \text{ nm}$ (■); $\lambda = 350 \text{ nm}$ (■); $\lambda = 360 \text{ nm}$ (■); $\lambda = 370 \text{ nm}$ (■); $\lambda = 380 \text{ nm}$ (■); $\lambda = 390 \text{ nm}$ (■); $\lambda = 400 \text{ nm}$ (■); $\lambda = 410 \text{ nm}$ (■); $\lambda = 420 \text{ nm}$ (■); $\lambda = 430 \text{ nm}$ (■). Medidas feitas no espectrofluorímetro Agilent Cary Eclipse

56

Figura 5.3 – Espectros de fluorescência da solução de trabalho dos NPCs sintetizados; $\lambda_{\text{máx.exc}} = 380 \text{ nm}$; e concentrações de etanolamina: a) síntese 1: $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ (■); síntese 2: $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (■); síntese 3: $1,4 \text{ mol L}^{-1}$ (■); síntese 4: $1,8 \text{ mol L}^{-1}$ (■).

57

Figura 5.4 – Espectros de absorbância molecular dos quatro tipos de NPCs sintetizados: a) NPC1 (■); b) NPC 2 (■); c) NPC 3 (■); d) NPC 4 (■).

58

Figura 5.5 – Variação da concentração da solução de trabalho de NPCs em água ultrapura. Aliquotas da solução de trabalho de NPCs: $20 \mu\text{L}$ (■); $30 \mu\text{L}$ (■); $40 \mu\text{L}$ (■); $50 \mu\text{L}$ (■); $100 \mu\text{L}$ (■); $150 \mu\text{L}$ (■); $200 \mu\text{L}$ (■); $250 \mu\text{L}$ (■); $300 \mu\text{L}$ (■); $\lambda_{\text{máx.exc}} = 370 \text{ nm}$.

60

Figura 5.6 – (a) Supressão da fluorescência da solução de trabalho dos NPCs em função do aumento da concentração do íon cromo(VI): solução trabalho dos NPCs (■); $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ (■); $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (■); 1 mg L^{-1} (■); 3 mg L^{-1} (■); 5 mg L^{-1} (■); 10 mg L^{-1} (■); 20 mg L^{-1} (■); 40 mg L^{-1} (■); 60 mg L^{-1} (■). (b) A relação entre a equação $(F_0 - F) / F_0$ e as concentrações de cromo(VI) de $0,25$ - 60 mg L^{-1} .

61

Figura 5.7 – Fotografia da supressão da fluorescência dos NPCs em função do aumento da concentração do íon Cr(VI) sob luz UV em $\lambda_{\text{máx.exc.}} = 350 \text{ nm}$

62

Figura 5.8 – Variação da recuperação da fluorescência dos NPCs em função do pH

63

Figura 5.9 – Variação da recuperação da fluorescência dos NPCs em função do pH

64

Figura 5.10 – Recuperação da fluorescência dos NPCs em função do aumento da concentração do AA: 40 μL de solução trabalho de NPCs (); NPC/Cr(VI) 10 mg L^{-1} (); 0,5 mg L^{-1} (); 1 mg L^{-1} (); 2 mg L^{-1} (); 4 mg L^{-1} (); 10 mg L^{-1} (); 20 mg L^{-1} (); 30 mg L^{-1} (); 40 mg L^{-1} (); 60 mg L^{-1} (); 80 mg L^{-1} (). Cada mistura foi tamponada em pH 6,9 (solução tampão fosfato)

65

Figura 5.11 Fotografia dos frascos das soluções utilizadas para a construção da curva analítica, mostrando as diferentes tonalidades de cor azul ciano, que evidenciam a recuperação de intensidade de fluorescência dos NPCs na presença do aumento da concentração do AA, sob luz UV em $\lambda_{\text{máx.xc.}} = 350 \text{ nm}$

66

Figura 5.12 – Curva analítica da recuperação da fluorescência do NPC com concentrações crescentes de AA: 0,5, 1, 2, 4, 10, 30, 60 e 80 mg L^{-1}

66

Figura 5.13 – Gráfico de resíduos deixados pelo modelo univariado de calibração.

67

Figura 5.14 Estudo de estabilidade para (i) a solução de trabalho dos NPCs (); (ii) o sensor NPCs/Cr(VI) () e (iii) recuperação da intensidade de fluorescência NPCs/Cr(VI) + AA () em diferentes tempo: 1, 5, 10, 20, 30 e 60 min.

71

Figura 5.15 – Estudo de interferentes inorgânicos para averiguar o efeito IFE dos seguintes cátions na presença da solução trabalho de NPCs: Ca^{2+} , Na^{+} , Cu^{2+} , K^{+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Fe^{2+} e Fe^{3+} em comparação com o cátion Cr^{6+}

72

Lista de tabelas

Tabela 3.1 – Características dos diferentes métodos de síntese de PCs.	26
Tabela 3.2 – Equações matemáticas para análise de variância – ANOVA	36
Tabela 4.1 – Descrição das amostras de medicamentos contidas nas respectivas bulas.	41
Tabela 5.1 – Valores de pH das quatro soluções de PCs sintetizados com concentrações crescentes de etanolamina	55
Tabela 5.2 – Dados da absorbância versus fluorescência dos NPCs sintetizados e padrão de referência sulfato de quinina com seus respectivos rendimentos quânticos, em porcentagem.	59
Tabela 5.3 – Valores de recuperação da fluorescência (F_r -F) para as diferentes concentrações de íon cromo(VI)	62
Tabela 5.4 – Resultados da ANOVA calculados para validação do modelo de calibração univariado do método proposto	67
Tabela 5.5 – Resultado dos testes de falta de ajuste e significância de regressão – ANOVA	68
Tabela 5.6 – Resultados do estudo da recuperação do AA em 3 amostras comerciais distintas utilizando o espectrômetro portátil	68
Tabela 5.7 – Resultados de teor de AA das análises feitas com amostras sólidas de medicamentos, através do método proposto e de referência	69
Tabela 5.8 – Resultados do teor de AA das análises realizadas com amostras líquidas de medicamentos pelo método proposto e de referência para fins de comparação. Os teores de AA rotulados também sob apresentação	70

Tabela 5.9 – Resultados da precisão intradia avaliada para soluções de AA nas concentrações de 10, 30 e 60 mg L⁻¹.

Lista de abreviaturas

AA – Ácido ascórbico

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

ANOVA – Análise de variância

IFE – Efeito de filtro interno

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

NPCs – Pontos quânticos de carbono funcionalizados com nitrogênio

RQF – Rendimento quântico de fluorescência

UV – Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

Resumo	v
Abstract.....	vi
Lista de figuras.....	vii
Lista de tabelas.....	x
Lista de abreviaturas	xii
SUMÁRIO	xiii
1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
3.1 Pontos quânticos de carbono	23
3.1.1 Propriedades ópticas dos PCs	24
3.2 Métodos de sínteses dos PCs.....	25
3.2.1 Síntese por carbonização hidrotérmica.....	27
3.2.2 Spondias dulcis Parkinson como bioprecursor	28
3.2.2 Funcionalização da superfície dos PCs	29
3.3 O ácido ascórbico	29
3.3.1 PCs na determinação de ácido ascórbico.....	30
3.4 Fluorescência molecular	31
3.5 Parâmetros de desempenho analítico.....	33
3.5.1 Curva analítica, linearidade, limites de detecção e quantificação	33
3.5.2 Precisão.....	35
3.5.3 Exatidão	35
3.5.4 Análise de variância.....	37
4 PARTE EXPERIMENTAL	40
4.1 Instrumentação.....	40
4.2 Limpeza de vidrarias	40
4.3 Reagentes e soluções	41

4.4 Amostras	41
4.5 Preparo de soluções	42
4.6 Obtenção do suco de cajá-manga	44
4.7 Síntese, funcionalização e purificação dos NPCs.....	44
4.8 Caracterização espectroscópica dos NPCs	45
4.8.1 Medidas espectrométricas.....	45
4.8.2 Cálculo do rendimento quântico de fluorescência.....	45
4.9 Otimização das condições experimentais	46
4.10 Otimização da recuperação da fluorescência.....	47
4.11 Curva analítica	47
4.12 Validação do modelo linear	48
4.13 Testes de recuperação	48
4.14 Determinação de ácido ascórbico em medicamentos	48
4.14.1 Método de referência	48
4.14.2 Método proposto.....	50
4.14.4 Estudos de interferentes.....	50
4.16 Estudo de estabilidade das soluções	51
4.17 Equações de supressão e retorno da fluorescência	52
4.18 Sistema de detecção fluorescente	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1 Síntese, funcionalização e purificação dos NPC	56
5.1.1 Estratégia da síntese.....	56
5.2 Medidas espectrométricas dos NPC	57
5.2.1 Medidas de fluorescência molecular na região ultravioleta-visível	57
5.2.2 Medidas de absorção molecular na região ultravioleta-visível	59
5.2.3 Rendimento quântico.....	60
5.3 Otimização das condições experimentais	61
5.3.1 Estudo de diluição dos NPCs.....	61
5.3.2 Efeito da concentração do íon cromo(VI)	62
5.3.3 Otimização da recuperação da fluorescência.....	63
5.3.4 Efeito do pH do meio reacional.....	64

5.3.4.1 Solução tampão acetato	64
5.3.4.2 Solução tampão fosfato	65
5.4 Curva analítica	66
5.4.1 Validação do modelo linear	67
5.4.2 Análise de variância	68
5.5 Testes de recuperação	69
5.6 Determinação de ácido ascórbico em medicamentos	70
5.7 Precisão	71
5.8 Estudo de estabilidade	72
5.9 Estudo de interferentes	72
6 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	76

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os pontos de carbono (PCs) constituem uma classe de materiais nanométricos luminescentes que foram descobertos em 2004 durante a realização de procedimentos de purificação de nanotubos de carbono (XU et al., 2004). Essas nanopartículas possuem tamanhos inferiores a 10 nm e apresentam fotoestabilidade química, solubilidade em água especialmente quando funcionalizadas, biocompatibilidade, baixa toxicidade e intensa fluorescência (YANG et al., 2018). Estas propriedades demonstram um amplo potencial para diferentes aplicações em bioimagens, biossensores, diagnósticos médicos e fotocatalise (SUN et al., 2017), incluindo aplicações em análises químicas (JAYAWEERA et al., 2019; MUTHUSANKAR et al., 2019; TIAN et al., 2018).

Os PCs podem ser sintetizados por (i) métodos físicos, que provocam a desagregação da matéria, como arco voltaico, ablação a laser e processos eletroquímicos e (ii) químicos, definidos como agregadores, como combustão térmica, irradiação por micro-ondas, método ultrassônicos e carbonização hidrotérmica (XU et al., 2016). Em comparação com as demais rotas de síntese, o processo de carbonização hidrotérmica tem uma série de vantagens práticas que favorecem sua ampla utilização devido à sua simplicidade, versatilidade e baixo custo (XU et al., 2016; BARATI et al., 2015).

Uma estratégia de síntese de PCs ambientalmente interessante consiste na escolha dos bioprecursores amplamente disponíveis, sendo exemplos o pimentão, melancia, pimenta, cascas de laranjas, biomassa de origem animal, entre outras, que podem ser encontradas na natureza (DAS et al., 2018), e funcionalizantes que possibilitam mudanças nas propriedades estruturais e físico-químicas das nanopartículas como tamanho, cristalinidade, teor do oxigênio e heteroátomos como nitrogênio, enxofre e fósforo, fluorescência, rendimento quântico e solubilidade (HOLA et al., 2014).

As propriedades luminescentes aplicadas para determinações analíticas são geralmente baseadas no princípio de interação dos analitos com os PCs, que podem suprimir a fluorescência das nanopartículas, descritas por diferentes mecanismos de supressão encontrados na literatura, como o efeito do filtro interno (ZHANG et al., 2018).

O ácido ascórbico (AA) é popularmente conhecido como vitamina C e foi isolado pela primeira vez pelo cientista Albert Szent-Gyorgyi, durante estudos com glândulas suprarrenais, repolhos e laranjas, sendo considerado um importante antioxidante natural. Em 1937, foi laureado com o Prêmio Nobel em Química por esses estudos.

O AA é um composto hidrossolúvel com características redutoras, amplamente encontrado em frutas, vegetais e legumes (VANNUCCHI e ROCHA, 2012). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, a ingestão recomendada de vitamina C para adultos é de 45 mg/dia, dose diária que auxilia na prevenção de diversas doenças, incluindo o escorbuto, além de fortalecer o sistema imunológico (ANVISA, 2005; VIDAL et al., 2015). Por esse motivo, compõe a formulação de medicamentos e suplementos vitamínicos.

Até os dias atuais, diferentes métodos foram utilizados para determinação de AA como iodometria (ARYA et al., 2000), eletroanalítica (FU et al., 2018), espectrometria (OZYUREK et al., 2007), cromatografia em fase líquida de alto desempenho (KOBLOVÁ et al., 2012) e quimioluminescência (WANG et al., 2012). Apesar disso, ainda existem dificuldades na determinação de AA, dependendo da complexidade das matrizes, mesmo quando os métodos oficiais são utilizados (Farmacopeia Brasileira, Instituto Adolfo Lutz). Segundo Gong e colaboradores (2017), o AA é um agente redutor que pode ser determinado por reação com íon cromo(VI), que é reduzido a íon cromo(III), na presença de PCs, com base no efeito de filtro interno.

Assim, no presente estudo foi desenvolvido um método alternativo, rápido e de baixo custo para a determinação fluorimétrica de ácido ascórbico em medicamentos na presença de íon cromo(VI) e PCs dopados com nitrogênio (NPCs), sintetizados por carbonização hidrotérmica a partir de suco de *Spondias dulcis Parkinson*, utilizando um espectrômetro miniaturizado comercial.

Capítulo 2

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um método analítico simples, rápido e de baixo custo utilizando pontos quânticos de carbono de *Spondias dulcis Parkinson* dopados com nitrogênio para determinação fluorimétrica de ácido ascórbico em medicamentos, empregando espectrômetro miniaturizado portátil e LED UV como fonte de excitação.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Sintetizar os NPCs a partir do suco de cajá-manga por tratamento de carbonização hidrotérmica, na presença de etanolamina como agente funcionalizante.
- ✓ Caracterizar os NPCs quanto as suas propriedades ópticas.
- ✓ Otimizar parâmetros analíticos como: concentração da solução de NPCs, concentração da solução de íon cromo(VI), pH, supressão e recuperação da intensidade fluorescente dos NPCs.
- ✓ Validar e aplicar o método desenvolvido para a determinação de ácido ascórbico em medicamentos utilizando um espectrômetro portátil e um LED UV como fonte de excitação.
- ✓ Avaliar o desempenho analítico do método em relação ao método de referência.

Capítulo 3

**FUNDAMENTAÇÃO
TEÓRICA**

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Pontos quânticos de carbono

A nanociência vem sendo desenvolvida e novos materiais nanoestruturados, que possuem dimensões da ordem de 1 a 100 nanômetros. Devido à variedade de tipos de materiais nanométricos, podem ser aplicadas em nanotecnologia nos campos da física, química, biologia, ciência dos materiais, engenharias e medicina. Entre esses, destacam-se os nanomateriais de carbono, que estão contribuindo de forma significativa para o desenvolvimento econômico, científico e tecnológico em nível mundial (VAZ et al., 2015).

Os materiais nanométricos de carbono têm atraído atenção de diversos pesquisadores devido as suas peculiares propriedades ópticas (IQBAL et al., 2016). O desenvolvimento tecnológico iniciou-se com a descoberta dos nanotubos de carbono por Lijima em 1991, em conjunto com o fulereno, o grafeno (KROTO et al., 1985; LIJIMA, 1991) e os nanodiamantes, ampliando as fronteiras na química e na física do carbono. Esses nanomateriais possuem propriedades eletrônicas, magnética e ópticas, além da versatilidade química, biocompatibilidade e fácil manipulação (BAPTISTA et al., 2015).

Uma nova classe de materiais nanométricos de carbono, denominada pontos de carbono (PCs), foi descoberta em 2004 durante processos de separação e purificação de nanotubos de carbono pelo método eletroforético (SUN et al., 2017). As diferentes estruturas dos materiais de carbono estão apresentadas na **Figura 3.1**.

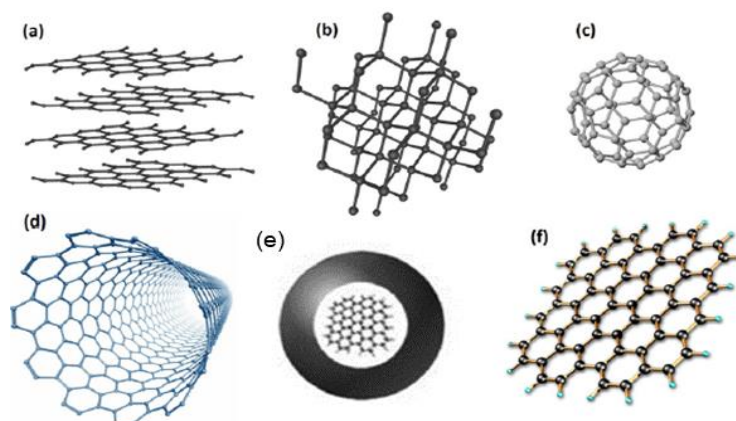


Figura 3.1 – Representação esquemática das diferentes nanoestruturas de carbono: (a) grafite; (b) nanodiamante; (c) fulereno; (d) nanotubo de carbono de parede simples; (e) pontos quânticos de carbono; (f) grafeno. Adaptado de Baptista et al., 2015; Zarbin et al., 2013.

Os PCs são nanopartículas fotoluminescentes menores do que 10 nm, que apresentam intensa fluorescência (MACHADO et al., 2015). Essas nanopartículas possuem excelentes propriedades como elevada solubilidade em água quando funcionalizadas com heteroátomos como oxigênio, nitrogênio, enxofre, estabilidade química quando expostas à luz ultravioleta, facilidade de síntese e funcionalização, resistência à fotodegradação, baixa toxicidade e biocompatibilidade. Essas propriedades justificam o amplo potencial para diversas aplicações em bioimagens, biossensores, diagnósticos médicos e fotocatalise, entre outras (ZHANG et al., 2018).

Com relação a sua estrutura, os PCs são nanopartículas quase esféricas com núcleos amorfos a nanocristalinos que consistem, predominantemente, de carbono grafítico com ligações π em carbonos sp^2 , podendo apresentar sítios quimicamente reativos contendo oxigênio, nitrogênio e/ou grupos carboxílicos (LIM et al., 2014). As propriedades fluorescentes dos PCs são dependentes do tamanho, dos grupos químicos de superfície e da presença de heteroátomos, que provocam mudanças nas propriedades das nanopartículas, como solubilidade e variação da sua fluorescência (SUN et al., 2015).

3.1.1 Propriedades ópticas dos PCs

As propriedades ópticas dos PCs referem-se à capacidade de absorção e emissão de radiação. O tamanho dos PCs influencia na absorção óptica e, por consequência, na fotoluminescência devido ao confinamento quântico em sua estrutura (LI et al., 2012). Os PCs apresentam absorção óptica na região ultravioleta, que pode se estender até a região do visível, dependendo dos diferentes métodos de sínteses e funcionalizantes aplicados (MACHADO et al., 2015). PCs possuem extensa conjugação de ligações duplas provenientes das ligações duplas entre os átomos de carbono, característica de compostos poliaromáticos. Dessa forma, observam-se bandas de absorção molecular correspondentes às transições $\pi-\pi^*$ na região de 250 a 300 nm (Li et al., 2011).

Com relação às propriedades fluorescentes, ainda está em discussão o processo de formação das nanopartículas, embora as emissões da fluorescência dos PCs possam ser estabelecidas pelo efeito de confinamento quântico e diferentes armadilhas encontradas na superfície das nanopartículas, incluindo imperfeições estruturais. Estes efeitos são explicados pelo tipo de mecanismo de supressão da fluorescência como: mecanismo de supressão estático,

mecanismo de supressão dinâmico, transferência de energia por ressonância Förster, transferência de energia fóton induzida, transferência de energia da superfície, transferência de energia Dexter e efeito de filtro interno (ZU et al., 2017).

O efeito do filtro interno (IFE, do inglês *Inner Filter Effect*) ocorre quando a região de absorção molecular do analito supressor sobrepõe a região de excitação ou emissão dos PCs,

Figura 3.2.

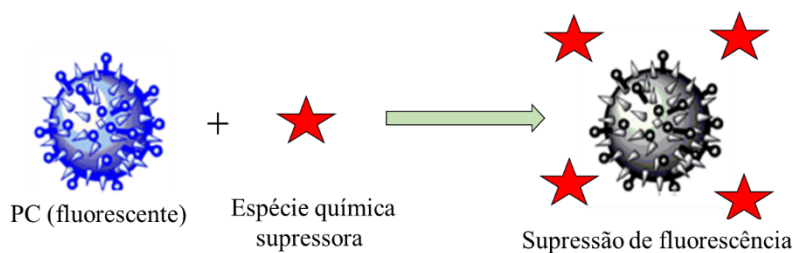


Figura 3.2 – Efeito de supressão da fluorescência das nanopartículas na presença uma espécie supressora.

O IFE é descrito como um efeito de extinção aparente, devido à atenuação do feixe de excitação ou absorção da radiação emitida por excesso de concentração de PCs ou por ação do analito supressor, levando à redução da intensidade (CHEN et al., 2010). O fenômeno por resultar na extinção completa da fluorescência, que depende da distância entre a nanopartícula fluorescente e a substância supressora, que deverá exceder 10 nm. Em comparação com o mecanismo de supressão estático ou dinâmico, o IFE não modifica a estrutura da nanopartícula e, conseqüentemente, possibilita a recuperação da intensidade inicial de fluorescência dos PCs quando na ausência do analito supressor (ZU et al., 2017; CHEN et al., 2010).

3.2 Métodos de sínteses dos PCs

Os dois métodos de sínteses dos PCs são:

➤ *Top-town*, que consiste na formação de pequenas nanopartículas de carbono a partir de materiais de carbono de maior massa, mantendo-se suas propriedades originais, ou seja, desconstruindo estruturas maiores em nanométricas como nanotubos de carbono, grafeno e nanodiamante (XU et al., 2016);

➤ *Bottom-up*, que consiste em utilizar moléculas orgânicas pequenas sintetizadas sob condições adequadas, que devem ser purificadas por meio de filtração, centrifugação, diálise ou separação em coluna cromatográfica preparativa (SANCHEZ et al., 2010).

Uma representação esquemática desses métodos está mostrada na **Figura 3.3**

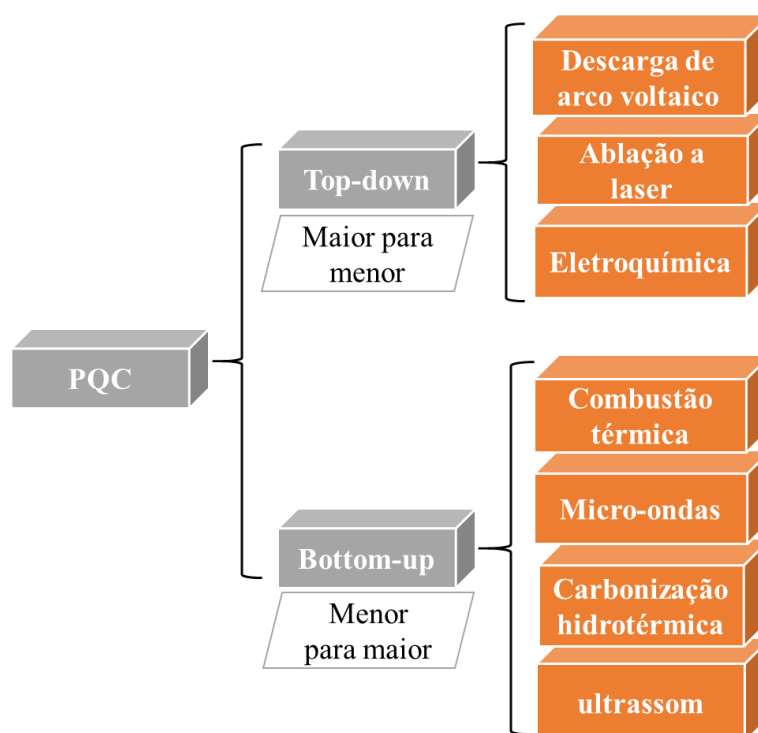


Figura 3.3 – Diagrama esquemático dos métodos de síntese de PCs, *top-down* e *bottom-up*. Adaptado de XU et al., 2016.

Os PCs obtidos pelo método *top-down* são sintetizados pelos seguintes tratamentos: ablação a laser, eletroquímica e descarga de arco voltaico. Esses métodos geralmente produzem estruturas sp^2 , mas não possuem propriedades luminescentes intensas, sendo preciso tratamentos químicos para aumentar o rendimento quântico (XU et al., 2016).

Com relação ao método *bottom-up*, as nanoestruturas são preparadas com menores defeitos e possuem composição química mais homogênea, sendo sintetizados pelos tratamentos de irradiação por micro-ondas, combustão térmica, ultrassom e carbonização hidrotérmica. Contudo, a síntese *bottom-up* apresenta algumas desvantagens que afetam a formação de PCs,

como tempo da síntese, consumo de energia, além de instrumentação apropriada. No entanto, essas desvantagens são mais importantes quando se utiliza a abordagem *top-down* (MACHADO et al., 2015). Uma comparação das características dos diferentes métodos de síntese é apresentada na **Tabela 3.1**.

Tabela 3.1 – Características dos diferentes métodos de sínteses de PCs. Adaptado de ANDRADE, 2016.

Métodos sintéticos	Vantagens	Desvantagens	Referência
Eletroquímico	Tamanho controlável; etapa única.	Poucos precursores de baixa massa molecular.	ZHANG et al, 2015
Ablação a laser	Rápido; superfície ajustável dos PCs.	Baixo rendimento quântico; difícil controle sobre o tamanho das nanopartículas.	SINGH et al., 2019
Tratamento ultrassônico	Rápido; ambientalmente amigável; custo reduzido.	Baixo controle sobre o tamanho das nanopartículas.	HUANG et al., 2018
Combustão térmica	Instrumentação simples; vários precursores.	Baixo controle sobre o tamanho das nanopartículas; processos lentos.	LI et al., 2012
Tratamento hidrotérmico	Baixo custo; ambientalmente amigável; não tóxico.	Baixo controle sobre o tamanho das nanopartículas.	CAO et al., 2019

3.2.1 Síntese por carbonização hidrotérmica

O tratamento de carbonização hidrotérmica de etapa única surgiu em 2010 quando Zhang e colaboradores sintetizaram PCs usando o precursor ácido ascórbico em etanol, mantido em mufla a 180 °C por 4 h. As nanopartículas obtidas apresentaram um rendimento quântico de fluorescência (RQF) de 6,79 % sem a adição de agente funcionalizante (ZHANG et al., 2010).

Em comparação com outras rotas de síntese, o processo hidrotérmico tem se destacado como um método apropriado para o desenvolvimento de nanopartículas empregando diferentes bioprecusores como morango, melancia, casca de laranja, pimentão, caldo da cana-de-açúcar, etc., além de precursores orgânicos incluindo ácido cítrico, glicose, proteínas, etanolamina, entre outros (DAS et al., 2018). Os bioprecusores geralmente são tratados termicamente entre 150 e 200 °C, sob pressão, utilizando uma autoclave de aço inoxidável com recipiente cilíndrico em politetrafluoretileno. O resultando da carbonização fornece um sólido carbonáceo que possui grupamentos orgânicos que auxiliam na solubilidade das nanopartículas em água (DAS et al., 2018; XU et al., 2016).

A carbonização hidrotérmica possui uma série de vantagens práticas, incluindo baixa toxicidade de reagentes e solventes, bem como a utilização de recursos renováveis, procedimentos simplificados de síntese com utilização de instrumentação básica disponível na grande maioria dos laboratórios, além de baixo consumo de energia elétrica, em comparação com os demais métodos de síntese.

3.2.2 *Spondias dulcis* Parkinson como bioprecursor

A escolha de um bioprecursor pode ser feita em função da sua disponibilidade regional. Na região Nordeste, diferentes plantas típicas do bioma caatinga como as cactáceas xique-rique, mandacaru e palma forrageira são potenciais bioprecusores, além de frutas como manga, caju, umbu-cajá e cajá-manga, entre outras (SILVA, 2018; MADRONA, et al. 2018).

O cajá-manga (*Spondias dulcis* Parkinson) contém fontes de carbono como carboidratos, carotenoides, compostos fenólicos e vitaminas (MADRONA et al., 2018), essências para a formação da estrutura dos PCs. Essas fontes possuem grupos orgânicos, como hidroxilas e carboxilas, que podem ser encontradas na superfície da nanoestrutura de carbono (YAN et. al., 2018), após a síntese. Dessa forma, são modificadas as propriedades dos PCs, sendo exemplo a solubilidade: a presença de funcionalizações polares aumenta significativamente a solubilidade das nanopartículas em água, característica que facilita a utilização em aplicações analíticas, especialmente quando se tem interesse na análise de matrizes ambientais, alimentos e medicamentos (YAN et al., 2018; XU et al, 2016)

3.2.2 Funcionalização da superfície dos PCs

A possibilidade de modificação da estrutura dos PCs com agentes dopantes contendo heteroátomos é bastante relevante. São exemplos a cisteína, etanolamina, ácido bórico, ácido fosfórico e cianocobalamina, que disponibilizam enxofre, nitrogênio, boro, fósforo e cobalto, respectivamente. A presença de heteroátomos contribui para o aumento da intensidade da fluorescência, que resulta em aumento da sensibilidade analítica, aspecto de interesse quando se trata de aplicações em sensores químicos, além de propiciar interações com os mais diferentes analitos como íon mercúrio, dopamina, glicose, ácido ascórbico, entre outros. (LIM et al., 2015; XU et al., 2016).

3.3 O ácido ascórbico

O ácido ascórbico – AA, (2R)-2-[(1S)-1,2-dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxy-2H-furan-5-one, é conhecido como vitamina C e foi isolado pelo cientista Albert Szent-gyorgyi ao realizar estudos com glândulas suprarrenais, repolho e laranjas (VANNUCCHI e ROCHA, 2012). A estrutura química do AA está representada pela **Figura 3.4**.

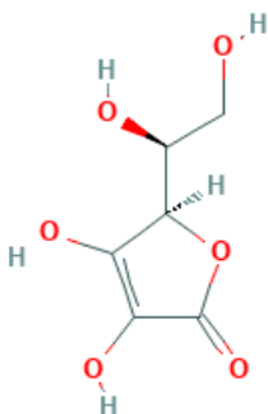


Figura 3.4 – Estrutura química do ácido ascórbico. Fonte: Pubchem, 2019.

Trata-se de um composto hidrossolúvel com características redutoras, amplamente encontrado em frutas, legumes e vegetais, principalmente. O AA é classificado como um antioxidante natural, pois possui baixo potencial de redução, sendo capaz de reagir com radicais

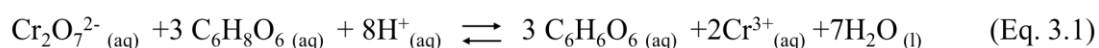
livres presentes no organismo, como superóxidos, hidroperoxilas, hidroxilas e óxido nítrico (VIDAL e FREITAS, 2015). Doses normais de AA auxiliam na prevenção de escorbuto, na defesa do organismo contra infecções, previne o envelhecimento precoce, além de auxiliar no tratamento de doenças cardiovasculares, AIDS, depressão e câncer. Segundo a ANVISA, a ingestão recomendada de vitamina C para adultos é de 45 mg/dia. Estudos também revelam que doses abaixo do normal podem causar escorbuto, doença provocada por significativa deficiência de vitamina C no organismo, podendo causar petéquias, equimose, anemia e diarreia, e seu excesso provoca hemorragia na gengiva, distúrbios gastrointestinais, cálculos renais, entre outros (VANNUCCHI e ROCHA, 2012; VIDAL e FREITAS, 2015).

Embora existam diferentes métodos analíticos para a determinação de vitamina C, o desenvolvimento de uma metodologia alternativa com baixa geração de resíduos é importante, pois facilita o controle da qualidade de medicamentos e alimentos em termos de teor de AA (GONG et al., 2017).

3.3.1 PCs na determinação de ácido ascórbico

Dependendo do tipo de PCs sintetizado, o AA não produzirá efeitos de supressão da fluorescência, mas pode ser determinado na presença de íon cromo(VI), que é uma espécie química supressora de fluorescência. O AA é uma substância redutora capaz de promover a redução do íon cromo(VI) a íon cromo(III).

A equação química que representa a reação de oxidação-redução é a seguinte:



O íon cromo(III) reduzido não suprime ou recupera a fluorescência dos PCs. Desta forma, a reação de oxidação-redução resulta no retorno da intensidade de fluorescência dos PCs pela redução do íon cromo(VI) na presença do AA, possibilitando medidas quantitativas baseadas nesse sinal analítico. (ZHANG et al., 2018).

Como as propriedades dos PCs são dependentes da tipo de síntese, os grupos funcionais em sua superfície podem ser modificados dependendo dos precursores e funcionalizantes utilizados. Desta forma, os PCs dopados com nitrogênio fornecido por reagentes como etanolamina são eficientes em promover aumento do RQF e minimizar o efeito IFE. Além disso,

as nanopartículas funcionalizadas podem aumentar a fluorescência, resultando em aumento da sensibilidade analítica (LI et al., 2017).

Outro aspecto importante é o pH do meio reacional. Existem diferentes estudos que evidenciam o efeito do pH sobre a fluorescência das nanopartículas, auxiliando na interação com o agente supressor.

De acordo com Yang e colaboradores (2018), a variação de pH em uma solução tampão Britton-Robinson na faixa de 2,0 a 12 na presença de íon cromo(VI) e AA evidenciou um aumento gradual da supressão de fluorescência até pH 8,0, mantendo-se constante a partir deste valor. O pH também influencia a transferência de elétrons na reação de oxidação-redução entre o AA e íon cromo(VI).

Singh e colaboradores (2018) determinaram AA em células de rim embionário. Para tanto, utilizaram diferentes volumes de soluções de HCl 0,1 mol L⁻¹ e NaOH 0,01 mol L⁻¹ promovendo a variação de pH na faixa de 2,0 a 12. Verificaram que, em soluções de PCs em meios extremamente ácidos ou básicos, houve decréscimo de intensidade do sinal com valores maiores na região de pH entre 4,0 e 8,0.

3.4 Fluorescência molecular

A fluorescência é um processo fotoluminescente no qual átomos ou moléculas são excitadas por absorção de radiação eletromagnética. Desta forma, a espécie excitada relaxa e retorna ao estado fundamental, liberando energia na forma de fótons. A espécie excitada possui um tempo de vida curto e existem diferentes mecanismos para um átomo ou molécula excitada liberar o excesso de energia e retornar ao estado fundamental (SKOOG, 2015).

Os principais mecanismos de relaxamento não radiativos são: (i) desativação vibracional ou relaxamento, que ocorre durante colisões entre as moléculas excitadas e as moléculas do solvente; (ii) conversão interna, que consiste do relaxamento não radiativo entre o nível vibracional mais baixo do estado excitado e o nível superior de outro estado eletrônico. Por fim, ocorrem relaxamentos radiativos com a emissão fluorescente ou fosforescente, caracterizados pela perda de energia do estado excitado para o estado fundamental na forma de fótons (LAKOWICZ, 2006).

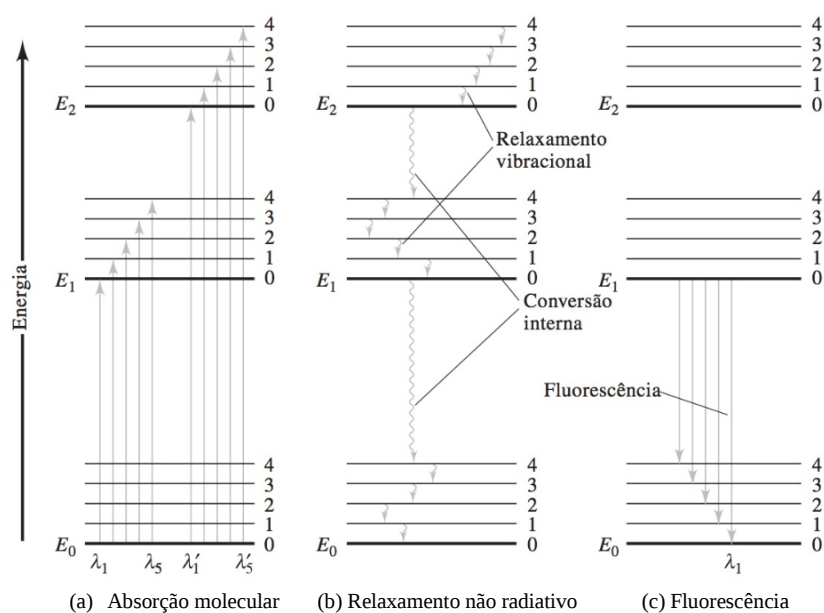


Figura 3.5 – Diagrama de níveis de energia de uma espécie molecular durante absorção, relaxamento não radiativo e fluorescência; E_0 = estado fundamental; E_1 = estado fundamental excitado; E_2 = estado excitado de alta energia. Fonte: SKOOG, 2015.

A molécula no estado fundamental de menor energia, E_0 , absorve energia incidente, onde um elétron é promovido para um estado excitado de maior energia, E_2 . O retorno ao estado fundamental ocorre por relaxamento vibracional e a conversão interna da molécula para um nível vibracional fundamental do estado excitado, E_1 . O retorno ao estado fundamental ocorre por emissão de radiação eletromagnética, que corresponde à fluorescência da molécula, E_0 (SKOOG, 2015).

Sir G. G. Stokes observou, pela primeira vez, que a energia fluorescente emitida por uma espécie era geralmente menor do que a energia incidente, concluindo que o fenômeno de fluorescência ocorre em comprimentos de onda maior, de menor energia (LAKOWICZ, 2006). A justificativa dessa diferença de energia é a perda de energia por processos não radioativos como a conversão interna. Essa diferença de comprimento de onda entre a radiação incidente e a emitida é chamado de deslocamento de Stokes (SKOOG, 2015).

3.5 Parâmetros de desempenho analítico

Os parâmetros de desempenho garantem, por meio de estudos sistemáticos, que determinado método seja cientificamente coerente sob as condições em que é aplicado. Desta forma, a confirmação do método é dada pelo fornecimento de provas objetivas que demonstram o cumprimento de critérios que levam à aceitação da proposta. A validação centra-se em parâmetros que influenciam o resultado final e possibilita o julgamento quanto à consistência e qualidade dos resultados analíticos (PETERS et al, 2007; INMETRO, 2016).

3.5.1 Curva analítica, linearidade, limites de detecção e quantificação

A curva analítica é definida por uma reta que intercepta ou se aproxima de todos os pontos experimentais gerados pelos resultados do sinal analítico, sendo é empregada pelo método dos mínimos quadrados (MMQ). O MMQ fornece resultados não tendenciosos e com variância mínima que corresponde a natureza estatística. Na **Equação 3.4** observa-se a descrição de um modelo linear entre uma variável dependente (y) a uma variável independente (x).

$$y = \beta_o + \beta_i x + \varepsilon \quad (\text{Eq. 3.4})$$

Onde o β_o e β_i são os parâmetros do modelo e ε é o erro associado à determinação de y. Normalmente, y é a resposta instrumental e x é a concentração da espécie química que se deseja determinar. A estimativa dada pela **Equação 3.5** fornece um sinal para cada y_i observado no padrão analítico da concentração de x_i .

$$(y_e)_i = b_o + b_1 x_i \quad (\text{Eq.3.5})$$

Onde b_o e b_1 representam as estimativas dos parâmetros de β_o e β_i . As diferenças entre os valores observados e os valores estimados são os resíduos e_i de acordo com a **Equação 3.6**:

$$e_i = y_i - (y_e)_i = y_i - b_o - b_1 x_i \quad (\text{Eq. 3.6})$$

Para o tratamento estatístico dos resultados encontrados utilizando o MMQ é preciso levar em consideração alguns pontos importantes como: os únicos erros nas medidas estão

associados a flutuações no sinal analítico (y) e, caso a concentração (x) estiver sujeita a erros, estes deverão ser desprezíveis quando comparados com os erros em y; o erro dos resíduos (e_i) não são correlacionados e devem ter variância constante e média zero (PIMENTEL et al., 1996; NETO et al., 2010).

A linearidade é a região ou o intervalo de uma curva analítica em que soluções de diferentes concentrações conhecidas de um analito geram sinais analíticos linearmente proporcionais às concentrações. Para se obter uma curva analítica, empregam-se valores distintos de massas ou concentrações do analito com o intuito de adquirir uma resposta ou um valor quantificado do sinal analítico, onde os mesmos são plotados nos eixos cartesianos. O principal ponto para avaliar a linearidade do resultado é por regressão por mínimos quadrados, também denominado de regressão linear. Os coeficientes de uma curva são indicadores de linearidade (LEITE, 2008).

Toda técnica responde com sinal analítico para uma determinada quantidade de amostra, exposta direta ou indiretamente ao sistema. A quantidade mínima da espécie de interesse pode ser detectada com certo nível de confiança, pode ser entendida como limite de detecção (LOD) (LEITE 2008).

O limite de detecção foi calculado conforme **Equação 3.2**.

$$LOD = \frac{3s}{S} \quad (\text{Eq. 3.2})$$

Onde: s é o desvio padrão do sinal do branco analítico; S é o coeficiente angular da curva analítica dos PCs

O limite de quantificação (LOQ) é definido como a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas (EURACHEM, 2014), sendo calculado conforme **Equação 3.3**.

$$LOQ = \frac{10s}{S} \quad (\text{Eq. 3.3})$$

Onde: s é o desvio padrão do sinal do branco analítico; S o coeficiente angular da curva analítica.

3.5.2 Precisão

A precisão representa a concordância entre replicatas de uma mesma amostra. Pode ser expressa como desvio padrão e variância. Também se pode expressar a precisão de medidas como coeficiente de variação (CV) ou RSD% (do inglês, *relative standard deviation*), que informa a dispersão dos valores medidos em torno de um valor médio e pode ser calculado conforme **Equação 3.7** (RIBEIRO E FERREIRA, 2008).

$$RSD (\%) = \frac{s}{x} \times 100 \quad (\text{Eq. 3.7})$$

Onde *s* representa o desvio padrão amostral e *x* corresponde ao valor médio do número total das medidas.

A precisão pode ser estimada em termos de precisão intradia, precisão intermediária e reprodutibilidade. A precisão intradia é calculada quando a variabilidade dos resultados é medida por um único analista, empregando o mesmo equipamento e em curto período de tempo. Desta forma, o analista deverá realizar determinações contemplando o intervalo de resposta linear do método analítico, em três níveis de concentrações, baixa, média e alta, em triplicatas, no mínimo. A precisão intermediária pode ser feita no mesmo laboratório, mas sob condições experimentais diferentes da precisão intradia, em dias diferentes, por exemplo. A reprodutibilidade é uma medida da variabilidade dos resultados entre laboratórios (ANVISA, 2017; EURACHEM, 2014).

3.5.3 Exatidão

A exatidão representa a proximidade entre o valor medido e um valor de referência considerado verdadeiro e relaciona-se com o erro absoluto de uma medida (INMETRO, 2016). Para expressar a exatidão do método analítico existem três abordagens distintas: análise de materiais de referência, testes de recuperação utilizando amostras fortificadas com níveis de concentrações conhecidas do analito ou comparação dos resultados obtidos com método de referência (EURACHEM, 2014).

A exatidão pode ser calculada por meio do teste de recuperação, que consiste da análise de amostras fortificadas com concentrações conhecidas do analito. As amostras devem ser fortificadas contemplando o intervalo encontrado na faixa linear de trabalho em, ao menos, três diferentes concentrações: baixa, média e alta, com triplicatas em cada nível (INMETRO, 2016; ANVISA, 2017).

A recuperação é calculada segundo a **Equação 3.8**.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (\text{Eq. 3.8})$$

Onde: C_1 é a concentração do analito na amostra fortificada, C_2 é a concentração do analito na amostra não fortificada e C_3 é a concentração teórica do analito adicionado à amostra fortificada.

Outro forma importante de avaliação da exatidão é por meio da comparação de médias de resultados obtidos para cada amostra pelo método proposto e o método de referência. Nesse caso, usa-se o teste t pareado. A aplicação do teste t pareado, fundamentado no conceito de intervalo de confiança, utiliza os dados obtidos no cálculo da média das diferenças entre os valores de concentração, adquiridos por dois métodos distintos, para cada par de resultados. Com base na **Equação 3.9**, o intervalo de confiança é estimado para Δ que consiste na diferença média verdadeira entre os resultados dos dois métodos.

$$\Delta = d \pm t_v \frac{S_d}{\sqrt{n}} \quad (\text{Eq.3.9})$$

Sendo, n é o número de amostras, S_d é o desvio padrão da média das diferenças, t_v é o ponto de distribuição t correspondente ao número de graus de liberdade (v) no nível de confiança desejado e d é a média das diferenças.

Com base no intervalo de confiança construído, seu valor deverá conter o valor zero para que a hipótese nula não seja rejeitada e a média das diferenças possua um ponto de distribuição t com $\Delta = 0$. Com isto, não existe diferença sistemática significativa entre os resultados dos dois métodos. Caso contrário, existe uma diferença sistemática entre os resultados dos métodos ao nível adotado de confiança estatística. (NETO et al., 2010).

3.5.4 Análise de variância

A validação do modelo de calibração somente é possível quando as estimativas dos cálculos matemáticos e seus intervalos de confiança aplicados no modelo estiverem corretos, ou seja, se forem capazes de descrever satisfatoriamente o comportamento dos valores experimentais. Para que o modelo seja aceito, não deverá ter falta de ajuste e ainda deve apresentar regressão estatística significativa. A validade do modelo e a significância estatística da curva ajustada podem ser testadas pela ANOVA (do inglês, *analysis of variance*), tendo como restrição a aplicação a modelos lineares (PIMENTEL et al., 1996). Na **Tabela 3.2** estão apresentadas nas equações ANOVA do modelo ajustado aos dados experimentais empregando o método dos mínimos quadrados (MMQ).

Tabela 3.2 – Equações matemáticas para análise de variância – ANOVA. Adaptado de Pimentel et al., 1996.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática
Regressão	$p - 1$	$SQ_{reg} = \sum n_i [(y_e)_i - y_m]^2$	$MQ_{reg} = \frac{SQ_{reg}}{p - 1}$
Resíduo	$n - p$	$SQ_r = \sum [y_{ij} - (y_e)_i]^2$	$MQ_r = \frac{SQ_r}{n - p}$
Falta de ajuste	$m - p$	$SQ_{faj} = \sum n_i [(y_e)_i - y_{im}]^2$	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m - p}$
Erro puro	$n - m$	$SQ_{ep} = \sum [y_{ij} - y_{im}]^2$	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n - m}$
Total	$n - 1$	$SQ_t = \sum (y_{ij} - y_m)^2$	

O índice *i* indica o nível da variável X; o índice *j* refere-se às medidas repetidas da variável Y em um dado nível de X; **p** = número de parâmetros do polinômio do modelo de calibração; **n** = número total de medidas; **m** = número de níveis da variável independente X.

A validação de modelos lineares por MMQ consiste em analisar os resíduos, o teste de significância da regressão e o teste de falta de ajuste. Para avaliar a qualidade do modelo é preciso comparar as médias quadráticas que são obtidas na divisão das somas por seus respectivos graus de liberdade, onde quanto maior o valor da média quadrática da regressão MQ_{reg}/MQ_r , melhor o ajuste do modelo (NETO et al., 2002).

O teste da falta de ajuste compara os resultados da média quadrática da falta de ajuste (MQ_{faj}) com a média quadrática devido ao erro puro (MQ_{ep}), por estimarem os erros aleatórios. Desta forma, se valor da razão MQ_{faj}/MQ_{ep} obtiver uma resposta menor que a distribuição F, referentes aos graus de liberdade de MQ_{faj} e MQ_{ep} para um nível de 95% de confiança, teremos um modelo sem falta de ajuste, caso contrário, o modelo deverá ser reajustado (PIMENTEL et al., 1996).

O teste de significância da regressão é atribuído para verificar a relação funcional (linear, quadrática, polinomial etc.) entre as variáveis que possa ser descrita pelo modelo. Para avaliar a significância da regressão compara-se a razão entre a média quadrática da regressão (MQ_{reg}) e a média quadrática do resíduo (MQ_r) com o valor tabelado da distribuição F referentes ao grau de liberdade da MQ_{reg} e MQ_r a um nível de 95% de confiança. Desta forma, se a razão MQ_{reg}/MQ_r obter um valor significativamente maior que a distribuição F, indicará que existe uma relação linear entre as duas variáveis. O gráfico dos resíduos deve está distribuído aleatoriamente, refletindo apenas erros aleatórios, ou seja, sem apresentar heteroscedasticidade ou tendências residuais. Além dos testes acima, o coeficiente de determinação (R^2) auxilia no resultado para avaliar o ajuste do modelo. Portanto, quanto mais próximo de 1 estiver o R^2 , melhor terá sido o ajuste do modelo às respostas observadas (NETO et al., 2010; PIMENTEL et al., 1996).

Capítulo 4

PARTE EXPERIMENTAL

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Instrumentação

Para o procedimento de preparo do suco da fruta de cajá-manga (bioprecursor) foi usado um miniprocessador da marca Black&Decker® modelo HC31X 220V 100W, China.

A síntese dos PCs foi desenvolvida utilizando um recipiente de aço inoxidável com copo interno e tampa em Teflon® denominado de autoclave ou reator, com volume máximo de 100 mL. Para o tratamento hidrotérmico do suco de cajá-manga foi utilizado um forno tipo mufla (EDG, modelo 7000), disponível no LACOM/DQ/UFPB. Para separação dos materiais em suspensão foi utilizada uma centrífuga compacta HERMLE, modelo Z206A, com velocidade de rotação de 6.000 rpm.

Com o intuito de verificar as propriedades ópticas dos PCs e registrar seus espectros de fluorescência molecular, foi utilizado um espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse Agilent, modelo G9800A, disponível no LEQA/DQ/UFPB, utilizando-se fendas de emissão e excitação na largura de 10 nm, cubeta de quartzo com dimensões de $1 \times 0,2 \times 3,5$ cm, com caminho óptico de 1 cm e capacidade volumétrica de 500 μ L. Para registro dos espectros de absorção molecular foi utilizado o espectrofotômetro UV-Vis da Hewlett-Packard, modelo 8453, equipado com cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico, LAQA/DQ/UFPB.

As determinações analíticas foram realizadas em aparelho portátil com detecção fluorimétrica *Ocean Optics* modelo USB 4000 utilizando o software spectrasuite versão 2.0.162 de 64 bit, utilizando-se como fonte de emissão um LED ultravioleta com emissão máxima em 380 nm.

Uma balança analítica Shimadzu modelo AY220 foi utilizada para as medidas de massas das substâncias sólidas utilizadas nos diferentes procedimentos. As medidas de pH da solução tampão foram feitas em medidor de pH da Metrohm, modelo 713, disponível no LAQA/DQ/UFPB. Para medidas rápidas de pH 0-14 foi utilizado o papel indicador universal especial da marca Merck.

4.2 Limpeza de vidrarias

A descontaminação da vidraria foi feita por lavagem prévia com detergente seguido da imersão em recipiente com água e detergente por 24 h, sendo enxaguado todo o material sob

água corrente. Em seguida, o material foi imerso em solução de Triton X-100 1% (m v^{-1}) preparada com água destilada, por 24 h. Após, foi lavado com água ultrapura produzida por sistema Mili-Q Plus® (Milipore, Bedford, MA), com resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ a 25°C .

4.3 Reagentes e soluções

Os seguintes reagentes foram utilizados:

A solução de ácido ascórbico P.A. Nuclear (Brasil); dicromato de potássio (>98%) Sigma Aldrich (Brasil); dihidrogenofosfato de sódio P.A. Labsynth (Brasil); acetato de sódio P.A. Dinâmica (Brasil); hidróxido de sódio anidro P.A. Dinâmica (Brasil); etanolamina (>98%) Sigma-Aldrich (Brasil);

A solução dos sais inorgânicos utilizados para o estudo dos interferentes foram: cloreto de cromo(III) (>98%), cloreto de ferro(II) tetrahidratado (>99%), cloreto de ferro(III) hexahidratado (>98%) Sigma-Aldrich (Brasil); cloreto de cobre P.A. e cloreto de sódio P.A. da marca Labsynth (Brasil); cloreto de cálcio P.A. ECIBRA S.A (Brasil); cloreto de potássio P.A./ACS e cloreto de cobalto P.A. Êxodo (Brasil)

Para a iodometria foram utilizados iodato de potássio P.A. VETEC (Brasil); tiosulfato de sódio P.A. VETEC (Brasil); ácido clorídrico 37 % P.A./ACS; ácido sulfúrico 98 % P.A./ACS; amido solúvel P.A./ACS; iodeto de potássio P.A./ACS NEON (Brasil); carbonato de sódio anidro da Proquimios (Brasil).

Sulfato de quinina 54 % ACROS (Brasil) foi utilizado para cálculos de RQF das soluções de PCs.

4.4 Amostras

Amostras de medicamentos contendo ácido ascórbico (vitamina C) foram adquiridas no comércio local da cidade de João Pessoa/PB, correspondendo a quatro amostras na forma de comprimidos e cinco na forma líquida para ingestão por via oral. Na **Tabela 4.1** estão relacionadas informações adicionais sobre as amostras.

Tabela 4.1 – Descrição das amostras de medicamentos contidas nas respectivas bulas.

Identificação	Tipo	Teor de AA	Validade
1	Comprimidos	Ácido ascórbico, 500 mg	07/2020
2	Comprimidos	Ácido ascórbico, 500 mg	06/2019
3	Comprimidos efervescentes	Ácido ascórbico, 1 g	11/2019
4	Comprimidos efervescentes	Ácido ascórbico, 1 g	11/2019
5	Solução	Ácido ascórbico, 200 mg mL ⁻¹	08/2020
6	Solução	Ácido ascórbico, 200 mg mL ⁻¹	08/2020
7	Solução	Ácido ascórbico, 200 mg mL ⁻¹	07/2020
8	Solução	Ácido ascórbico, 200 mg mL ⁻¹	07/2020
9	Solução	Ácido ascórbico, 200 mg mL ⁻¹	09/2019

Para o preparo de amostras sólidas, quatro comprimidos de medicamentos foram macerados e homogeneizados em gral e pistilo de porcelana e armazenados em tubos tipo Eppendorf de 2 mL, os quais foram envolvidos com papel alumínio para análises posteriores. Na sequência, uma massa da amostra pulverizada com cerca de 121 mg foi exatamente medida e transferida para um balão volumétrico de 100 mL, sendo o volume completado com água ultrapura. Em seguida, foi submetida a ultrassom por 10 min e filtrada para retirada de material residual em suspensão. Para diluição das amostras sólidas, foram retirados 8 mL de cada amostra filtrada, transferidos para um balão de 100 mL e completado com água ultrapura. Essa etapa foi realizada no dia das análises para minimizar a degradação das amostras.

Para o preparo de amostras líquidas de medicamentos, retirou-se uma alíquota de 100,0 µL da amostra de concentração nominal igual a 200 mg mL⁻¹, que foi transferida para balão volumétrico de 250 mL e completado o volume com água ultrapura, também preparadas no dia das análises.

4.5 Preparo de soluções

As soluções de íon cromo(VI) foram obtidas a partir do sal de dicromato de potássio, K₂Cr₂O₇: i) uma solução estoque contendo 300 mg L⁻¹ de íon cromo(VI) foi preparada dissolvendo-se 84,87 mg do reagente em água ultrapura e elevando o volume final para 100 mL em balão volumétrico, com água ultrapura; ii) as diluições a partir da solução estoque foram preparadas nos seguintes níveis de concentração: 0,25; 0,5; 1; 3; 5; 10; 20; 40; e 60 mg L⁻¹.

A solução estoque de AA na concentração de 1.000 mg L^{-1} foi preparada a cada 2 dias devido à sua rápida degradação. Para tanto, uma massa de AA de 100 mg do reagente foi dissolvida em água ultrapura e transferida para um balão volumétrico de 100 mL; iv) as diluições a partir da solução estoque foram feitas no dia da análise e preparadas nos seguintes níveis de concentração: 0,5; 1; 2; 4; 10; 20; 30; 40; 60 e 80 mg L^{-1} . Todas as soluções foram transferidas para recipientes de vidro âmbar.

A solução do tampão acetato pH 4,5 foi preparada utilizando a mistura de 25 mL da solução de ácido acético $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e 25 mL da solução de acetato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. A solução tampão fosfato pH 6,9 foi preparada pela mistura de 100 mL da solução de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de dihidrogenofosfato de sódio (KH_2PO_4) com 11,5 mL de solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de sódio anidro (MORITA e ASSUMPÇÃO, 2007).

O preparo da solução de tiosulfato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ consistiu em medir 12,5 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 0,5 g de carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3) em balança analítica, seguido da transferência dos sólidos para um balão volumétrico de 1.000 mL; após agitação e completa solubilização, o volume foi completado com água ultrapura recentemente fervida e resfriada para evitar a formação de produtos secundários e ação bacteriana. Para a padronização da solução de tiosulfato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, mediu-se 0,13 g de iodato de potássio (KIO_3) puro e seco em estufa a 120°C por 150 min e dissolveu-se em 50 mL de água ultrapura; após isso, foram adicionados 2 g de iodeto de potássio (KI) e 8 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado na mistura (BACCAN et al., 2001). A solução de iodo $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 18 g de iodeto de potássio puro em 100 mL de água ultrapura, adicionando-se 6,38 g de iodo puro, homogeneizando a mistura e transferindo-a para um balão volumétrico de 1 L, completando o volume com água ultrapura. A solução preparada foi armazenada em recipiente de vidro âmbar com tampa esmerilhada e guardada em local escuro (MORITA e ASSUMPÇÃO, 2007).

A solução de amido a 1% (m v^{-1}) foi preparada medindo-se uma massa de 1 g de amido em balança analítica e adicionado em 50 mL de água ultrapura fervente para promover a completa dissolução. Após resfriada à temperatura ambiente, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água ultrapura (BACCAN et al., 2001).

A solução de trabalho de NPCs foi preparada na proporção 1/10 (v v^{-1}) por adição de 100,0 μL da suspensão obtida na síntese em 900,0 μL de água ultrapura.

4.6 Obtenção do suco de cajá-manga

O precursor natural foi obtido a partir do suco da fruta de cajá-manga através das seguintes etapas: i) lavagem da fruta para retirada dos resíduos impregnados na casca; ii) trituração da fruta em miniprocessador de alimentos durante 10 minutos para obtenção de um líquido com partículas aglomeradas na mistura; iii) filtração por gravidade para retirada do material particulado em suspensão feita em papel de filtro quantitativo Quanty® com diâmetro de 11 cm e poros de 25 μm de diâmetro; iv) armazenamento sob refrigeração à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, em recipientes de plástico com capacidade de 50 mL.(ZHANG et al., 2018)

4.7 Síntese, funcionalização e purificação dos NPCs

Foram feitas quatro sínteses com concentrações crescentes de funcionalizante por carbonização hidrotérmica em fase única. Para tanto, 50 mL do suco de cajá-manga e 0,6 mol L^{-1} ; 1,0 mol L^{-1} ; 1,4 mol L^{-1} ; e 1,8 mol L^{-1} de etanolamina foram misturados, seguido da adição de água ultrapura até o volume de 80 mL, sem tamponamento do meio. Na sequência, a mistura foi homogeneizada com bastão de vidro e transferida para a autoclave de 100 mL, que foi submetida a aquecimento na mufla a $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 h. Após o resfriamento, um volume de 50 mL de água ultrapura foi adicionado ao material escuro obtido, seguido de filtração por gravidade em papel de filtro quantitativo Quanty® com diâmetro de 11 cm e poros de 25 μm de diâmetro e, por fim, centrifugação a 6.000 rpm por 20 min (**Figura 4.1**).

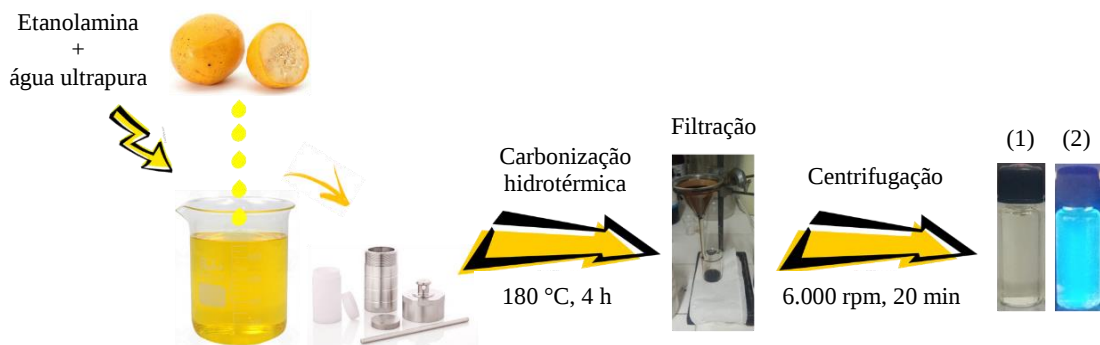


Figura 4.1 – Esquema ilustrativo das etapas de síntese dos NPCs por carbonização hidrotérmica. Fotografia da solução de trabalho dos NPCs sob: (1) luz visível; (2) luz ultravioleta, $\lambda_{\text{máx.exc.}} = 350\text{ nm}$. Fonte: própria do autor.

Após as etapas de filtração e centrifugação das nanopartículas, foi medido o pH da suspensão de coloração marrom avermelhada sintetizada com papel indicador universal. Os NPCs foram armazenados em recipiente de vidro âmbar de 50 mL.

4.8 Caracterização espectroscópica dos NPCs

4.8.1 Medidas espectrométricas

As medidas de absorvância molecular na região ultravioleta-visível (UV-Vis) foram realizadas com três diluições para cada tipo de NPCs sintetizados (sínteses 1 a 4). As absorvâncias das diluições foram medidas entre 0,10 e 0,05 unidade de absorvância para minimizar o IFE (LI et al., 2017).

A solução de trabalho de NPCs foi preparada por diluição de 0,10 mL da solução estoque em 9,90 mL de água ultrapura. As soluções testadas foram:

- i) 2 mL da solução de trabalho de NPCs;
- ii) 0,80 mL da solução de NPCs diluídos em 1,20 mL de água ultrapura;
- iii) 0,3 mL da solução de NPCs em 1,70 mL de água ultrapura.

As medidas, em triplicatas, foram feitas após homogeneização e repouso por 5 min em temperatura ambiente. As diluições e medidas foram feitas no mesmo dia.

Utilizando as mesmas diluições preparadas para as medidas de absorvância molecular, o sinal fluorescente molecular na região ultravioleta-visível das soluções de NPCs foram medidas após homogeneização e repouso por 5 min em temperatura ambiente, também em triplicatas. Todos os procedimentos foram realizados no mesmo dia.

4.8.2 Cálculo do rendimento quântico de fluorescência

Após obtenção dos valores de absorvância e fluorescência moleculares, foi construído um gráfico relacionando-se a área integrada de intensidades de absorvância em função da fluorescência, para fins de cálculos de RQF.

O RQF dos NPCs sintetizados foi determinado utilizando-se o método comparativo: uma solução padrão de sulfato de quinina em H₂SO₄, 0,1 mol L⁻¹, que possui um RQ de 54 %, foi utilizada para calcular o RQF das amostras testes, que foram diluídas em água ultrapura em diferentes concentrações (ZHOU et al., 2015). Os valores máximos de absorbância foram medidos para cada amostra. Todos espectros de emissão de fluorescência das soluções das amostras foram medidos com excitação em 380 nm. Os valores foram calculados utilizando a **Equação 4.1**.

$$\Phi_u = \Phi_s \times \left(\frac{Grad_u}{Grad_s} \right) \times \left(\frac{\eta_u^2}{\eta_s^2} \right) \quad (\text{Eq. 4.1})$$

Onde Φ é a fluorescência do RQF; u representa as amostras; s solução padrão de sulfato de quinina; Grad é a inclinação da curva entre os valores da área da banda do sinal de fluorescência *versus* banda do sinal da absorbância, no mesmo $\lambda_{\text{máx.exc.}} = 380 \text{ nm}$, e η representa o índice de refração do solvente, onde η_u e η_s possuem valores de 1,33 (WANG et. al., 2015).

4.9 Otimização das condições experimentais

A otimização dos parâmetros experimentais consistiu de estudos de diluição, variação do volume de solução de trabalho de NPCs, efeito do pH, efeito da extinção de fluorescência em função da concentração do íon cromo(VI) e restauração da intensidade fluorescência pela adição de quantidades crescentes de AA.

Para o estudo da diluição, foram utilizados os seguintes volumes da solução de trabalho de NPCs: 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 μL , adicionados em microtubos tipo Eppendorf, seguido da adição de volumes de água ultrapura, totalizando 2 mL. Após a homogeneização e repouso de 5 min em temperatura ambiente, foi medido o sinal analítico de fluorescência para cada diluição de NPCs em 488 nm ($\lambda_{\text{máx.exc.}} = 380 \text{ nm}$).

Para analisar o efeito de supressão da fluorescência das nanopartículas na presença do íon cromo(VI), foram adicionados em microtubos tipos Eppendorf: 40 μL da solução de trabalho de NPCs; 300 μL de solução do tampão fosfato pH 6,9; 500 μL da solução de íon cromo(VI) nas seguintes concentrações: 0,25, 0,5, 1, 3, 5, 10, 20, 40 e 60 mg L⁻¹ e 1.160 μL de água ultrapura. Após homogeneização e repouso de 5 min em temperatura ambiente, foi medido

o sinal fluorescente da solução em 488 nm ($\lambda_{\text{máx.exc.}} = 380 \text{ nm}$). Com o intuito de analisar os sinais obtidos, os valores foram expressos em função de $(F_0 - F)/F_0$.

O estudo do pH foi desenvolvido utilizando dois tipos de soluções tampão, acetato e fosfato.

Para o tampão acetato, foram adicionados em microtubos tipo Eppendorff: 40 μL da solução trabalho dos NPCs, 300 μL de solução tampão acetato de pH: 3,4; 4,5; 5,6 e 6,2; 500 μL da solução de íon cromo(VI) 10 mg L^{-1} ; 500 μL da solução de AA 15 mg L^{-1} e 660 μL de água ultrapura. Após homogeneização e repouso de 5 min, em temperatura ambiente, foi medido o sinal de fluorescência da solução em 488 nm ($\lambda_{\text{máx.exc.}} = 380 \text{ nm}$).

Para o tampão fosfato, foram adicionados em microtubos tipo Eppendorff: 40 μL da solução de trabalho de NPCs; 300 μL de solução tampão fosfato de pH: 5,5, 6,0, 6,9, 8, 9 e 10; 500 μL da solução de íon cromo(VI) de 10 mg L^{-1} ; 500 μL da solução de AA 15 mg L^{-1} e 660 μL de água ultrapura. Após homogeneização e repouso de 5 min em temperatura ambiente, foi medido o sinal fluorescente de cada mistura em 488 nm ($\lambda_{\text{máx.exc.}} = 380 \text{ nm}$).

4.10 Otimização da recuperação da fluorescência

Para analisar o efeito do sensor NPCs/Cr(VI), foram estudados as seguintes concentração da solução de íon cromo(VI): 10, 20, 30, 40, 50 e 60 mg L^{-1} .

As misturas consistiram da adição de 40 μL da solução de trabalho dos NPCs; 300 μL de solução do tampão fosfato pH 6,9; 500 μL da solução íon cromo(VI) em seis níveis de concentração; 660 μL de água ultrapura e 500 μL da solução de AA na concentração de 15 mg L^{-1} , em tubos tipo Eppendorff. Após homogeneização e repouso de 5 min em temperatura ambiente, foi medido o sinal fluorescente da solução em 488 nm ($\lambda_{\text{máx.exc.}} = 380 \text{ nm}$). Para avaliar o desempenho da recuperação da fluorescência, foi utilizada a diferença entre F_r e F .

4.11 Curva analítica

Para o desenvolvimento da curva analítica utilizando as soluções de AA, foram realizadas as seguintes adições em tubo tipo Eppendorf de 2 mL: adição de 40 μL da solução de trabalho dos NPCs; 300 μL de solução do tampão fosfato pH 6,9; 500 μL da solução íon

cromo(VI) na concentração de 10 mg L⁻¹; 660 µL de água ultrapura e 500 µL da solução de AA nas concentrações: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 60,0 mg L⁻¹. Após homogeneização e repouso de 5 min em temperatura ambiente, foi medido o sinal fluorescente de cada mistura em 488 nm ($\lambda_{\text{máx.exc.}} = 380 \text{ nm}$), utilizando o equipamento portátil. A equação $(F_r - F)/F$ foi utilizada para a construção da curva analítica, baseada na recuperação da fluorescência dos NPCs.

4.12 Validação do modelo linear

A validação do modelo linear foi feita para um modelo de calibração univariado ($p = 2$), em oito níveis de concentração de AA ($m = 8$) medidos em triplicatas ($n = 24$). As interpretações sobre a falta de ajuste e a significância de regressão basearam-se nos conceitos apresentados em 3.7.6, incluindo a avaliação do gráfico de resíduos, os coeficientes angular e linear da curva analítica e o coeficiente de regressão linear.

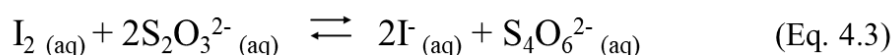
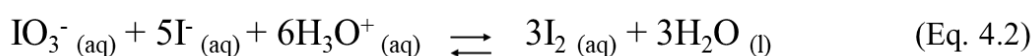
4.13 Testes de recuperação

Os testes de recuperação foram realizados para os seguintes níveis de concentração: 4,0; 10,0 e 20,0 mg L⁻¹ de AA. Para tanto, foram adicionados a um tubo tipo Eppendorf de 2 mL as seguintes soluções: 40 µL da solução de trabalho de NPCs; 300 µL de solução tampão fosfato pH 6,9; 500 µL da solução íon cromo(VI) na concentração de 10 mg L⁻¹, volume de 560, 410 e 160 µL de água ultrapura, 500 µL da amostra e volume 100, 250 e 500 µL da solução 80 mg L⁻¹ de AA. Após homogeneização e repouso de 5 min, em temperatura ambiente, foi medido o sinal de fluorescência dos NPCs.

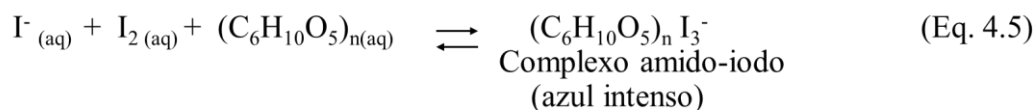
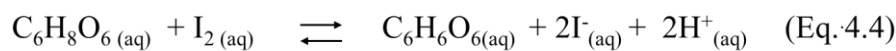
4.14 Determinação de ácido ascórbico em medicamentos

4.14.1 Método de referência

Baseia-se na iodometria, conforme procedimento descrito na Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2010). Para tanto, uma solução de tiosulfato de sódio de concentração aproximada correspondendo a 0,05 mol L⁻¹ foi padronizada com iodato de potássio como padrão primário em meio contendo iodeto de potássio, até a mudança da coloração castanha para verde amarelado. Então, adicionou-se 3 mL da solução de amido 1 % (m v⁻¹) no titulado e procedeu-se a titulação até a mudança da coloração para azul (BACCAN et al., 2001). As **Equações 4.2 e 4.3** representam as reações químicas e as respectivas estequiometrias.



Após a padronização, a solução de tiosulfato de sódio de concentração igual a 0,052 mol L⁻¹ foi utilizada para padronizar a solução de iodo, resultando na concentração de 0,048 mol L⁻¹, sendo utilizada para a determinação do teor de ácido ascórbico nas amostras comerciais de vitamina C. Para tanto, dissolveu-se cerca de 0,2 g de cada amostra em uma mistura de 100 mL de água e 25 mL de ácido sulfúrico 1 mol L⁻¹. Após isso, adicionou-se 3 mL de solução de amido 1 % (m v⁻¹), iniciando-se imediatamente a titulação com solução de iodo 0,048 mol L⁻¹. Para as amostras líquidas de medicamentos, mediu-se 1,0 mL de cada amostra para garantir uma massa de ácido ascórbico igual a 0,2 g, em triplicatas, conforme recomendações da ANVISA. As **Equações 4.4 e 4.5** representam as reações químicas e as respectivas estequiometrias (ANVISA, 2010; BACCAN et al., 2001).



A concentração de AA na amostra foi calculada com base na **Equação 4.6**, sabendo-se que cada mL da solução de iodo 0,0478 mol L⁻¹ equivale a 8,419 mg de AA.

$$C_{AA} = \frac{C_I \cdot V_I}{V_{amostra}} \quad (\text{Eq. 4.6})$$

Onde C_{AA} corresponde à concentração de ácido ascórbico na amostra; V_I é o volume médio gasto da solução de iodo; $V_{amostra}$ corresponde ao volume total da solução que será titulada e C_I corresponde à concentração da solução padrão de iodo ($0,048 \text{ mg L}^{-1}$).

4.14.2 Método proposto

O ensaio analítico consistiu da adição de $40 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de trabalho de NPCs a $300 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de tampão fostato pH 6,9, seguido da adição de $500 \text{ }\mu\text{L}$ da solução analítica contendo 10 mg L^{-1} de íon cromo(VI). A mistura foi completada com água ultrapura utilizando uma micropipeta de $1.000 \text{ }\mu\text{L}$ até 2 mL e homogeneização manual. Após 5 min , registrou-se o sinal de emissão em 488 nm utilizando uma fonte de excitação em 380 nm , registrando-se o sinal analítico do sensor NPC/Cr(VI).

Para a construção da curva analítica de ácido ascórbico, foram adicionados $40 \text{ }\mu\text{L}$ da solução diluída de NPCs, $300 \text{ }\mu\text{L}$ de solução do tampão fostato pH 6,9 e $500 \text{ }\mu\text{L}$ da solução 10 mg L^{-1} de íon cromo(VI), $660 \text{ }\mu\text{L}$ de água ultrapura e $500 \text{ }\mu\text{L}$ de soluções analíticas com as seguintes concentrações de AA: 0,50; 1,0; 2,0; 4,0; 10; 20; 30; 40; 60 e 80 mg L^{-1} , tubos tipo Eppendorf de 2 mL de capacidade. Após homogeneização e repouso de 5 min em temperatura ambiente, foi medido o sinal fluorescente de cada mistura em 488 nm ($\lambda_{\text{máx.exc}} = 380 \text{ nm}$).

Para determinação de AA, tanto nas amostras sólidas como líquidas, foram realizadas as seguintes etapas em tubo tipo Eppendorf de 2 mL : adição de $40 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de trabalho dos NPCs; $300 \text{ }\mu\text{L}$ de solução do tampão fostato pH 6,9; $500 \text{ }\mu\text{L}$ da solução íon cromo(VI) na concentração de 10 mg L^{-1} ; $660 \text{ }\mu\text{L}$ de água ultrapura e $500 \text{ }\mu\text{L}$ de cada amostra diluída. Após homogeneização e repouso de 5 min em temperatura ambiente, foi medido o sinal fluorescente de cada mistura em 488 nm ($\lambda_{\text{máx.exc}} = 380 \text{ nm}$), utilizando um espectrômetro portátil.

4.14.4 Estudos de interferentes

O estudo de interferentes foi realizado com os seguintes sais inorgânicos: CaCl_2 , NaCl , KCl , CuCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, CrCl_3 , CoCl_2 , $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (PHAN et al., 2018).

O estudo de cada substância inorgânica foi realizado da seguinte maneira: foram adicionados em tubo Eppendorf de 2 mL : $40 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de trabalho de NPCs; $300 \text{ }\mu\text{L}$ de

solução tampão fosfato pH 6,9; 1.160 µL de água ultrapura e 500 µL do cátion metálico. Após homogeneização e repouso de 5 min, em temperatura ambiente, foi medido o sinal de fluorescência dos NPCs em 488 nm.

4.15 Precisão

Foram feitas seis medidas em três níveis de concentração: 10, 30 e 60 mg L⁻¹ AA. As misturas foram preparadas em tubos tipo Eppendorf com adição de: 40 µL da solução de trabalho dos NPCs; 300 µL de solução do tampão fosfato pH 6,9; 500 µL da solução íon cromo(VI) na concentração de 10 mg L⁻¹; 660 µL de água ultrapura e 500 µL da solução de AA nas concentrações de 10,0; 30,0 e 60,0 mg L⁻¹. Após homogeneização e repouso de 5 min em temperatura ambiente, foi medido o sinal fluorescente de cada mistura em 488 nm ($\lambda_{\text{máx.exc}} = 380 \text{ nm}$).

4.16 Estudo de estabilidade das soluções

A estudo da estabilidade foi realizado para a solução de trabalho dos NPCs, do sensor NPCs/Cr(VI) e da recuperação da intensidade de fluorescência NPCs/Cr(VI) + AA, ao longo de 60 min.

A solução de trabalho consistiu da mistura de 40 µL da solução de trabalho dos NPCs; 300 µL de solução do tampão fosfato pH 6,9 e 1.660 µL de água ultrapura em tubos tipo Eppendorf de 2 mL. Após homogeneização e repouso de 5 min em temperatura ambiente, foi medido o sinal de fluorescência dos NPCs em 488 nm ($\lambda_{\text{máx.exc}} = 380 \text{ nm}$).

A solução do sensor NPC/Cr(VI) foi preparada com adição: 40 µL da solução de trabalho dos NPCs; 300 µL de solução do tampão fosfato pH 6,9; 500 µL da solução íon cromo(VI) na concentração de 10 mg L⁻¹; 1.160 µL de água ultrapura em tubos tipo Eppendorf de 2 mL. Após homogeneização e repouso de 5 min em temperatura ambiente, foi medido o sinal fluorescente de cada mistura em 488 nm ($\lambda_{\text{máx.exc}} = 380 \text{ nm}$).

A solução de NPCs/Cr(VI) + AA foi preparada com adição de: 40 µL da solução de trabalho dos NPCs; 300 µL de solução do tampão fosfato pH 6,9; 500 µL da solução íon cromo(VI) na concentração de 10 mg L⁻¹; 660 µL de água ultrapura e 500 µL da solução de AA na concentração de 20 mg L⁻¹ em tubos tipo Eppendorf de 2 mL. Após homogeneização e

repouso de 5 min em temperatura ambiente, foi medido o sinal fluorescente de cada mistura em 488 nm ($\lambda_{\text{máx.exc}} = 380 \text{ nm}$).

4.17 Equações de supressão e retorno da fluorescência

A capacidade do agente supressor, íon cromo(VI), foi calculada pela **Equação 4.7** (GONG et. al., 2017)

$$SF = \frac{(F_o - F)}{F_o} \quad (\text{Eq. 4.7})$$

Onde, SF é supressão da fluorescência, F corresponde à fluorescência do sensor NPCs/Cr(VI). e F_o corresponde ao sinal fluorescente da solução de trabalho de NPCs.

A resposta para construção da curva analítica foi calculada conforme **Equação 4.8**, baseada no retorno da fluorescência (QIAN et. al., 2015; XUE et. al., 2015).

$$RF = \frac{(F_r - F)}{F} \quad (\text{Eq. 4.8})$$

Onde, RF representa a recuperação do sinal da fluorescência, F_r corresponde ao sinal de emissão da fluorescência da solução analítica de AA e F corresponde à fluorescência do sensor NPCs/Cr(VI).

A diferença entre a recuperação da fluorescência e as concentrações crescentes das soluções de íon cromo(VI) (YANG, et al., 2018) foi calculada com base na **Equação 4.9**.

$$RF = F_r - F \quad \text{Eq.4.9}$$

Onde F_r corresponde a recuperação da fluorescência e F corresponde à supressão da fluorescência provocada pelo íon cromo(VI).

4.18 Sistema de detecção fluorescente

A detecção do sinal analítico foi realizada com o espectrômetro portátil *Ocean Optics*, modelo USB 4000. Este instrumento possui detector e acessório de fixação para cubeta de quartzo, que foi adaptado com um LED e uma placa de Arduino® com o propósito de emitir radiação em 380 nm. Para impedir a influência da luz do ambiente, o próprio instrumento possui uma tampa, colocada antes de cada medida, que auxilia no bloqueio da luz visível ambiente durante a realização das medidas. O sistema, com detalhamento dos componentes, está mostrado na **Figura 4.2**.

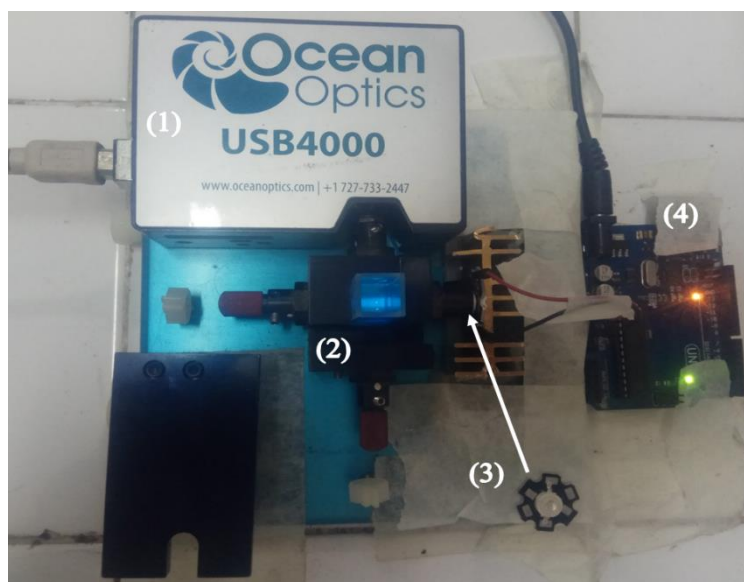


Figura 4.2 – Fotografia do sistema de detecção Ocean Optics: (1) detector fluorescente; (2) acessório de fixação da cubeta de quartzo; (3) LED-UV montado em dissipador de calor e (4) placa Arduino®. Fonte: própria do autor.

Um LED ultravioleta de alta potência (modelo LTPL-C034UVH370) foi empregado como fonte de excitação em 380 nm. Com o LED inserido na parte lateral do fixador de cubeta, em ângulo de 90° em relação ao eixo de leitura do detector, foi possível realizar as medidas de fluorescência das amostras. Devido à grande quantidade de calor liberado pelo LED, o mesmo foi acoplado a um dissipador de calor.

O detector foi conectado via cabo USB a um microcomputador Samsung® modelo NP300ESK-KF1BR, que exibe a banda do sinal analítico gerado via programa *SpectraSuite*. O *SpectraSuite* é um programa que trata dados espectrométricos baseado no programa Java, que opera em sistemas operacionais Windows e Linux. O programa foi utilizado para fornecer os dados

medidos pelo espectrofotômetro *Ocean Optics*. A interface do *SpectraSuite* é de fácil manipulação e rápida obtenção do espectro, pois todos os sistemas operacionais são parecidos com aplicativos usuais, contando com amplos recursos.

A placa de Arduino® (UNO) possui um regulador que fornece uma tensão contínua de 3,3 V para alimentação do LED UV, **Figura 4.3**. Esta placa contém um circuito integrado modelo U2-LP2985 com microcontroladores que manipulam, interpretam e transformam os sinais de voltagem e corrente vindos dos sensores, sistema de entrada, e ativa determinadas ações no sistema de saída como LED. Contudo, o valor máximo da corrente não pode exceder 50 mA.

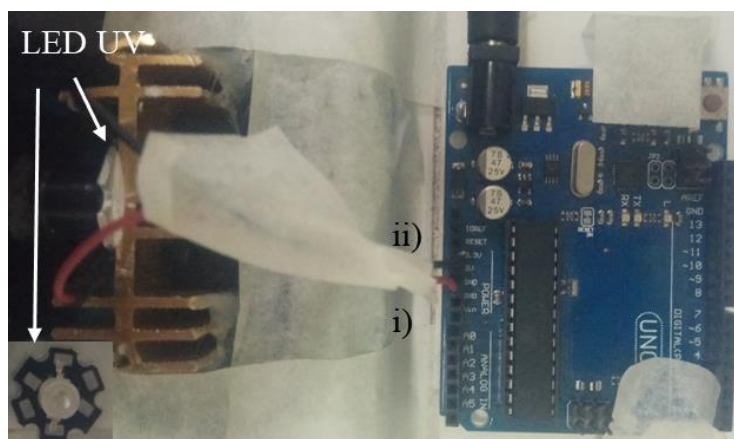


FIGURA 4.3 – Fotografia da placa de Arduino® com i) GND pinos de referência ou terra e ii) fonte de tensão de 3,3 V para alimentação de LED UV com corrente máxima de 50 mA. Fonte: própria do autor.

O *Microsoft Office Excel* é um editor de planilhas desenvolvido para organização e tratamento de dados que utiliza o sistema operacional *Microsoft Windows*, além de aparelhos móveis como celulares e tablets. Sua interface inclui várias ferramentas que auxiliam no manuseio dos dados obtidos no *SpetraSuite*, incluindo a construção de gráficos.

Capítulo 5

**RESULTADOS E
DISCUSSÃO**

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese, funcionalização e purificação dos NPC

5.1.1 Estratégia da síntese

Quatro diferentes sínteses foram feitas por carbonização hidrotérmica em fase única (180 °C por 4 h), mantendo-se constante o volume de bioprecursor, mas variando-se as concentrações de etanolamina 98 % e do solvente (água ultrapura), mantendo o volume total em 80 mL. Após a síntese, foi obtido um material com aspecto caramelizado de coloração escura. A purificação do material requereu uma filtração por gravidade seguida de centrifugação (6.000 rpm, 20 min), para remoção de resíduos do processo. Ao final, após diluída com água ultrapura, a suspensão concentrada de NPCs adquiriu coloração marrom avermelhada. (**Figura 5.1**).

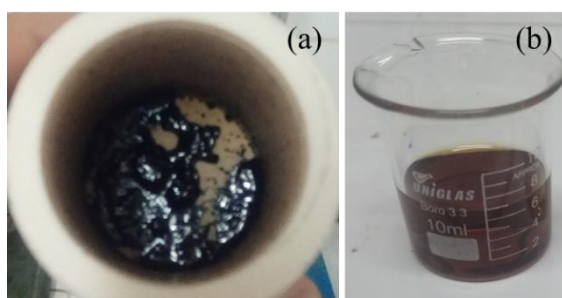


Figura 5.1 – Fotografia dos NPCs sintetizados: a) material carbonizado; b) NPCs diluídos em água ultrapura. Fonte: própria do autor.

Devido as concentrações adicionadas de etanolamina, o pH de cada suspensão obtida foi medido, resultando nos seguintes valores na **Tabela 5.1**.

Tabela 5.1 – Valores de pH das quatro soluções de PCs sintetizados com concentrações crescentes de etanolamina

Síntese	Valor de pH	Etanolamina (mol L ⁻¹)
1	9,0	0,6
2	9,5	1,0
3	9,5	1,4
4	10,0	1,8

A síntese é de fácil execução e reprodução, baixo custo, rápida e requer reagentes usuais de laboratório. Além disso, é ambientalmente amigável porque utiliza água como solvente. A solubilidade em água é justificada pela funcionalização por grupamentos $-NH$, provenientes da etanolamina, na estrutura dos NPCs (SUN et al., 2015)

5.2 Medidas espectrométricas dos NPCs

5.2.1 Medidas de fluorescência molecular na região ultravioleta-visível

Para fins quantitativos, é importante a escolha do comprimento de onda de emissão de maior magnitude de sinal, com o objetivo de se obter maior sensibilidade analítica. Na **Figura 5.2** estão apresentados os espectros de fluorescência molecular dos NPCs correspondentes a cada $\lambda_{\text{máx.exc.}}$, o qual foi variado de 320 nm a 430 nm. Vale destacar que os resultados mostrados na **Figura 5.2** foram obtidos para a primeira síntese dos NPCs, ou seja, não otimizada, utilizando o espectrofotômetro da Agilent Cary Eclipse.

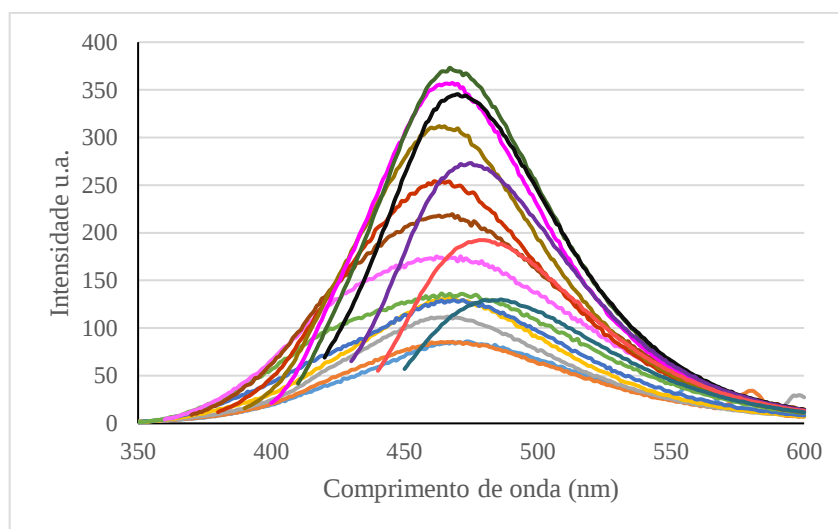


Figura 5.2 – Espectros de fluorescência molecular obtidos para a solução de trabalho de NPCs, excitados em: a) $\lambda = 280$ nm (); b) $\lambda = 290$ nm (); $\lambda = 300$ nm (); $\lambda = 310$ nm (); $\lambda = 320$ nm (); $\lambda = 330$ nm (); $\lambda = 340$ nm (); $\lambda = 350$ nm (); $\lambda = 360$ nm (); $\lambda = 370$ nm (); $\lambda = 380$ nm (); $\lambda = 390$ nm (); $\lambda = 400$ nm (); $\lambda = 410$ nm (); $\lambda = 420$ nm (); $\lambda = 430$ nm (). Medidas feitas no espectrofluorímetro Agilent Cary Eclipse.

Os espectros de fluorescência da **Figura 5.2** mostram que diferentes bandas de emissão e excitação dos NPCs são atribuídas aos grupos funcionais na superfície, ao heteroátomo funcionalizante e aos possíveis tamanhos de nanopartículas sintetizadas, que alteram as armadilhas emissivas dos NPCs, criando diferentes defeitos na superfície (GONG et al., 2017; SINGH et al., 2018). Na faixa de comprimentos de onda de excitação, 280 a 410 nm, a fluorescência permaneceu na região do azul.

A maior intensidade foi obtida com excitação do material em 390 nm, correspondendo a uma banda de emissão em 466 nm, que confirma a fluorescência na região do azul dessas nanopartículas em solução aquosa. Observa-se também que a excitação em 380 e em 400 nm possuem intensidades bastante próximas àquela obtida em 390 nm.

Geralmente, os NPCs quando expostos à radiação entre 350 e 390 nm, emitem comprimentos de onda entre 440 nm e 500 nm, que apresentam uma fluorescência azul. Baseado nisto, Zhu et al. (2013) desenvolveram PCs usando o precursor ácido cítrico funcionalizado com etanolamina, que exibiu um forte pico de emissão em 443 nm, de coloração azul, quando excitado em 360 nm.

Os estudos subsequentes foram realizados com o espectrômetro portátil. Para tanto, escolheu-se o LED disponível mais adequado, que corresponde a $\lambda_{\text{máx.exc.}} = 380$ nm. Dessa forma, foi possível comparar a magnitude do sinal fluorescente dos NPCs obtidos nas quatro sínteses, conforme mostrado na **Figura 5.3**.

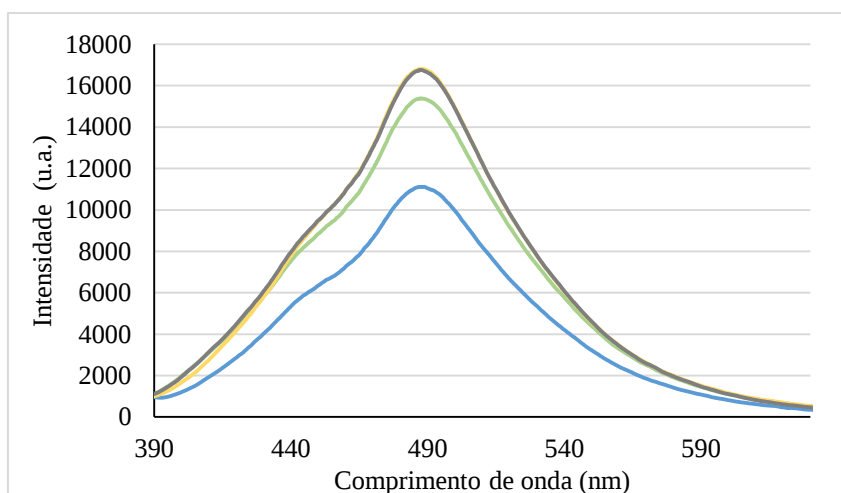


Figura 5.3 – Espectros de fluorescência da solução de trabalho dos NPCs sintetizados; $\lambda_{\text{máx.exc.}} = 380$ nm; e concentrações de etanolamina: a) síntese 1: $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ (—); síntese 2: $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (—); síntese 3: $1,4 \text{ mol L}^{-1}$ (—); síntese 4: $1,8 \text{ mol L}^{-1}$ (—).

Observa-se que intensidades similares foram obtidas para as sínteses 3 e 4, percebendo-se que o aumento da concentração de etanolamina de $1,4 \text{ mol L}^{-1}$ para $1,8 \text{ mol L}^{-1}$ não resultou em aumento de intensidade de sinal. O menor sinal foi registrado para a solução de NPCs obtidos pela síntese 1, mostrando que a concentração de etanolamina ($0,6 \text{ mol L}^{-1}$) foi insuficiente para intensificar a emissão das nanopartículas. A síntese 2 evidenciou uma intensidade de fluorescência significativa em comparação com as demais, utilizando apenas $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de etanolamina, promissora para estudos subsequentes.

A fluorescência registrada para os quatro tipos de NPCs sintetizados evidenciou perfis similares e com valor máximo de comprimento de onda de emissão em 488 nm , sem deslocamentos.

5.2.2 Medidas de absorção molecular na região ultravioleta-visível

Os NPCs exibiram bandas de absorbâncias suaves no comprimento de onda de 290 nm . Na **Figura 5.2**, mostra bandas com aspectos semelhantes para as 4 sínteses devido aos diferentes volumes do funcionalizante utilizado. A solução de NPCs obtida a partir da síntese 2 apresentou uma maior absorbância em relação as demais sínteses. O pico de absorbância em 290 nm corresponde a transições $\pi \rightarrow \pi^*$ para ligações $\text{C}=\text{C}$ de anéis aromáticos e ligações $\text{C}=\text{N}$ (LI et al., 2017; SU et al., 2015).

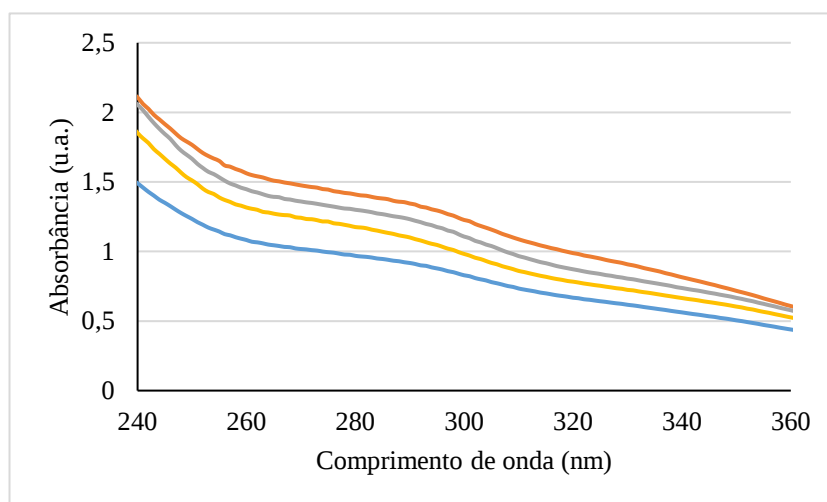


Figura 5.4 – Espectros de absorção molecular dos quatro tipos de NPCs sintetizados: a) NPCs1 (■); b) NPCs 2 (■); c) NPCs 3 (■); d) NPCs 4 (■).

5.2.3 Rendimento quântico

O rendimento quântico foi utilizado para caracterizar os materiais sintetizados em termos de capacidade fluorescente, com base na **Equação 4.4**. Os resultados estão apresentados na **Tabela 5.2**.

Tabela 5.2 – Dados de absorbância *versus* fluorescência dos NPCs sintetizados e padrão de referência sulfato de quinina com seus respectivos rendimentos quânticos, em porcentagem.

Soluções	Rendimento quântico (%)
NPCs 1	9,00
NPCs 2	12,0
NPCs 3	12,4
NPCs 4	12,4
Sulfato de quinina	54,0

Os quatro NPCs produzidos obtiveram rendimento quântico de 9,00 %; 12,0 %; 12,4 % e 12,4 %, respectivamente. Com base nos resultados, observou-se que houve um aumento de rendimento quântico correspondente às concentrações de etanolamina, que aumentou de 0,6 mol L⁻¹ (síntese 1) para 1,8 mol L⁻¹ na síntese 4. Para a síntese 2, utilizou-se apenas 1,0 mol L⁻¹ de etanolamina, que resultou em rendimento quântico de 12,0 %, valor bastante próximo dos rendimentos das sínteses 3 e 4. Dessa forma, os estudos subsequentes foram baseados em NPCs sintetizados nas condições descritas para a síntese 2, devido ao uso de menor volume de etanolamina, mas com rendimento satisfatório quando comparado às demais. O uso de menor quantidade do reagente reduz custos e causa menos impacto ao meio ambiente.

Os rendimentos quânticos calculados são adequados para aplicações analíticas. Du et al. (2015) sintetizaram PCs a partir de cascas de laranja, obtendo RQF = 9,0 %. Alam et al. (2015) desenvolveram PCs utilizando repolho como precursor natural, alcançando RQF = 16,5% e Huang et al. (2013) sintetizaram PCs a partir de morango, conseguindo um RQF = 6,3%.

5.3 Otimização das condições experimentais

5.3.1 Estudo de diluição dos NPCs

Estudos preliminares foram feitos para avaliar a influência concentração dos NPCs em água ultrapura, **Figura.5.5**.

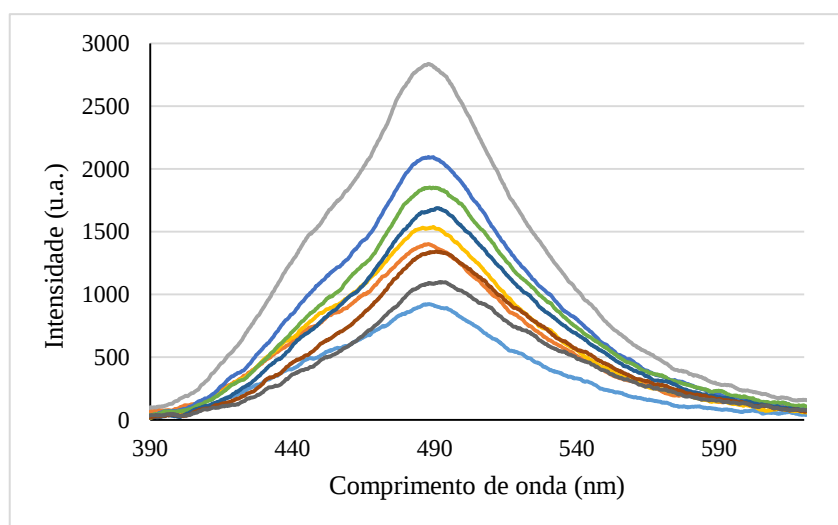


Figura 5.5 – Variação da concentração da solução de trabalho de NPCs em água ultrapura. Aliquotas da solução de trabalho de NPCs: 20µL (); 30µL (); 40µL (); 50µL (); 100µL (); 150µL(); 200µL(); 250µL(); 300µL(); $\lambda_{\text{máx.exc.}} = 370 \text{ nm}$.

Com base nos resultados, a concentração que corresponde ao volume de 40 µL de NPCs apresentou a maior intensidade de fluorescência. Em volumes menores que 30 µL, as nanopartículas estavam dispersas no meio aquoso, diminuindo o sinal analítico. No entanto, volume maiores que 50 µL produzem um decréscimo da fluorescência causada pela reabsorção da fluorescência pelas nanopartículas, que diminuiu a magnitude do sinal analítico, associado ao IFE (FONIN et al., 2014).

Com base nesses resultados, ficou definida a utilização de 40 µL da solução de trabalho dos NPCs para os estudos quantitativos, usando um LED ultravioleta para excitação em 380 nm, que apresentou uma intensidade fluorescente próxima do $\lambda_{\text{máx.exc.}} = 390 \text{ nm}$ (Figura 5.2).

5.3.2 Efeito da concentração do íon cromo(VI)

O efeito da supressão da fluorescência dos NPCs foi avaliado na presença de diferentes concentrações da solução de íon cromo(VI). Na **Figura 5.6 (a)**, pode observar que ocorreu interação entre os grupos funcionais presentes na superfície dos NPCs e íon cromo(VI), dando origem ao decréscimo de intensidade de emissão em 488 nm, devido às armadilhas que se encontram na superfície das nanopartículas, conforme mecanismo IFE (ZHANG et. al., 2017).

Na **Figura 5.6 (b)**, observa-se o desvio da linearidade da lei de Beer-Lambert, devido ao aumento da concentração de íons cromo(VI). (SKOOG, 2015).

A relação entre a eficiência da supressão da fluorescência e a concentração do íon cromo(VI) entre 0,25 a 60 mg L⁻¹, expressas em termo da **Equação 5.1**, está apresentada na **Figura 5.6(b)**.

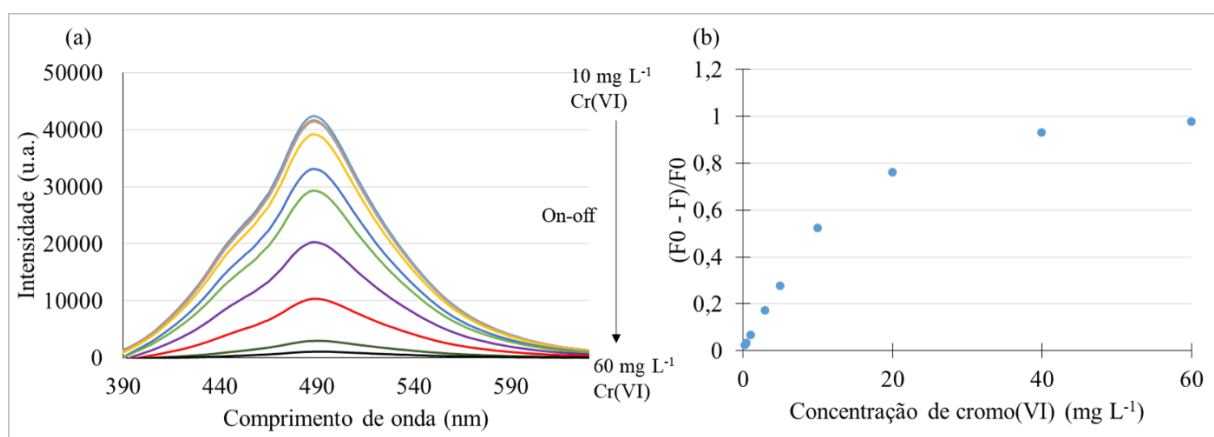


Figura 5.6 – (a) Supressão da fluorescência da solução de trabalho dos NPCs em função do aumento da concentração do íon cromo(VI): solução trabalho dos NPCs (—); 0,25 mg L⁻¹ (—); 0,50 mg L⁻¹ (—); 1,0 mg L⁻¹ (—); 3,0 mg L⁻¹ (—); 5,0 mg L⁻¹ (—); 10 mg L⁻¹ (—); 20 mg L⁻¹ (—); 40 mg L⁻¹ (—); 60 mg L⁻¹ (—); **(b)** A relação entre a equação $(F_0 - F) / F_0$ e as concentrações de cromo(VI) de 0,25 a 60 mg L⁻¹.

Para melhor visualizar a supressão da fluorescência, na **Figura 5.7** está ilustrada a coloração das soluções, que corresponde ao comportamento das nanopartículas ao interagirem com o íon cromo(VI), quando submetidas à radiação ultravioleta em $\lambda_{\text{máx.exc.}} = 380$ nm. Assim, é possível observar a coloração da solução de trabalho dos NPCs com forte tonalidade na cor

azul ciano e diminuição da fluorescência com o aumento da concentração do íon cromo(VI), visualizada pela diminuição da tonalidade.



Figura 5.7 – Fotografia da supressão da fluorescência dos NPCs em função do aumento da concentração do íon Cr(VI) sob luz UV em $\lambda_{\text{máx.exc.}} = 350 \text{ nm}$. Fonte: própria do autor.

5.3.3 Otimização da recuperação da fluorescência

Os valores calculados estão ilustrados na **Tabela 5.3**.

Tabela 5.3 – Valores de recuperação da fluorescência ($F_r - F$) para as diferentes concentrações de íon cromo(VI)

Concentração de íon cromo (VI) (mg L^{-1})	$F_r - F$
10	315,74
15	234,93
20	147,52
30	37,55
40	27,89
50	7,70
60	0,26

Observa-se que o aumento da concentração de íon cromo(VI) diminuiu a recuperação da fluorescência dos NPCs. Logo, a concentração de 10 mg L^{-1} resultou no maior valor, igual a 315,74, seguido das concentrações de 15 e 20 mg L^{-1} .

A eficiência da recuperação é observada quando o efeito *on-off* diminui devido à reação de oxidação-redução do íon cromo(VI) pelo AA, na presença do sensor NPC/Cr(VI). O resultado é o retorno da fluorescência das nanopartículas (efeito *off-on*). (LUO et al., 2018; YANG et al., 2018; GONG et al., 2017).

5.3.4 Efeito do pH do meio reacional

O efeito do pH no meio reacional foi investigado utilizando as soluções tampão fosfato e acetato, com o intuito de avaliar possíveis implicações sobre a intensidade do sinal fluorescente.

5.3.4.1 Solução tampão acetato

O estudo feito na faixa de pH entre 3,4 e 8,5 não evidenciou mudanças significativas de interação das nanopartículas com o analito (**Figura 5.8**).

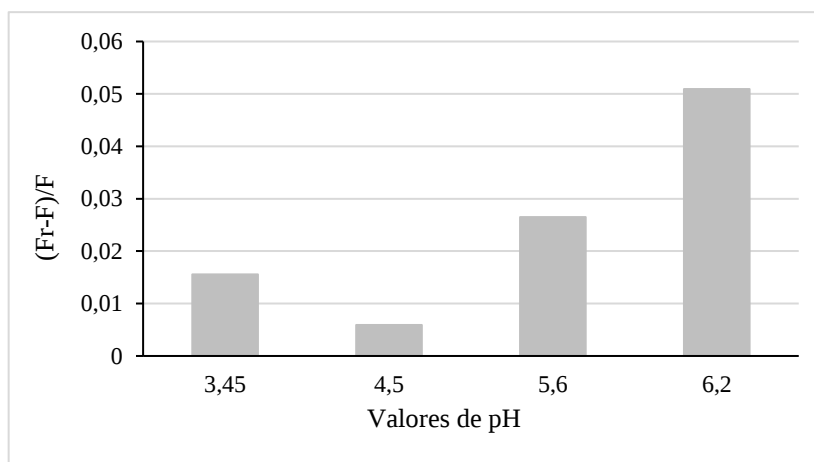


Figura 5.8 – Variação da recuperação da fluorescência dos NPCs em função do pH.

Observa-se que a maior recuperação da fluorescência foi obtida em pH 6,2. No entanto, as intensidades são bastante baixas, fato que compromete a sensibilidade analítica.

Segundo Fong et al. (2016), em baixos valores de pH, grupos orgânicos como os carboxílicos, encontrados na superfície dos PCs, são protonados, resultando numa superfície positivamente carregada, que impede a aproximação do íon cromo(VI) por repulsões de cargas positivas, que promove a diminuição do IFE. Com o aumento do pH, ocorre desprotonação

desses grupos orgânicos, aumentando a atração eletrostática entre os íons cromo(VI) e os NPCs, que resulta no aumento do efeito de supressão.

5.3.4.2 Solução tampão fosfato

Estudando o pH entre 5,5 e 10, observa-se que a maior recuperação de fluorescência ocorreu em pH 6,9 (**Figura 5.9**).

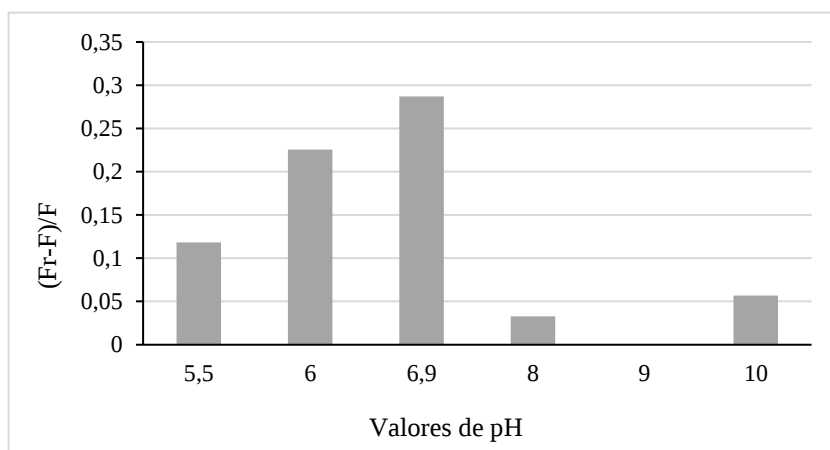


Figura 5.9 – Variação da recuperação da fluorescência dos NPCs em função do pH.

O valor de pKa do AA é de 4,25. Assim, em pH 6,9, há predominância da forma monoaniônica (HA^-) do ácido em relação à forma protonada (H_2A), ou seja, a dissociação do AA é favorecida, resultando em recuperação da fluorescência. Em valores de pH abaixo do pka, predomina a forma ácida, que desfavorece a redução do íon cromo(VI), comprometendo o retorno da fluorescência dos NPCs (GIULIVI e CADENAS, 1993).

Segundo Luo et al. (2018), à medida que aumenta o pH do meio reacional, os PCs perdem prótons deixando seus grupos funcionais com cargas negativas pela desprotonação. Devido a este efeito, o íon cromo(VI) interage com as nanopartículas por atração eletrostática, que favorece a supressão da fluorescência. Contudo, na presença do AA, ocorre a redução do íon cromo(VI) para íon cromo(III), com recuperação da fluorescência das nanopartículas.

Dessa forma, para os estudos subsequentes, o meio foi tamponado em pH 6,9 com solução tampão fosfato.

5.4 Curva analítica

A curva analítica foi construída com base no funcionamento do sensor NPCs/Cr(VI). Os efeitos de supressão e retorno da intensidade de fluorescência, que correspondem ao sinal analítico, foram observados na presença de soluções analíticas de AA na faixa de 0,50 a 80 mg L⁻¹, solução de íon cromo(VI) na concentração de 10 mg L⁻¹ e volume de 40 µL da solução de trabalho dos NPCs, em pH 6,9 (**Figura 5.10**).

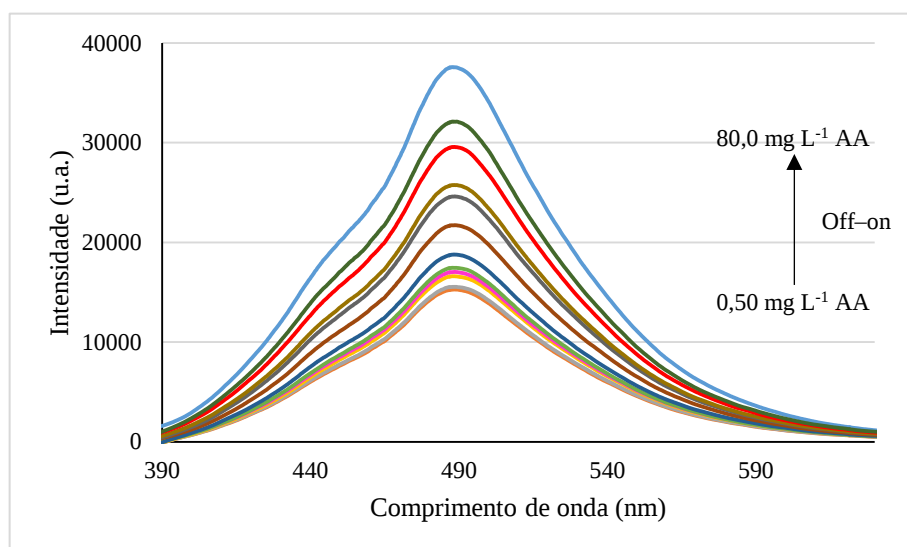


Figura 5.10 – Recuperação da intensidade de fluorescência dos NPCs em função do aumento da concentração do AA: 40 µL de solução de trabalho de NPCs (—); NPCs/Cr(VI) 10 mg L⁻¹ (—); 0,50 mg L⁻¹ (—); 1,0 mg L⁻¹ (—); 2,0 mg L⁻¹ (—); 4,0 mg L⁻¹ (—); 10,0 mg L⁻¹ (—); 20,0 mg L⁻¹ (—); 30,0 mg L⁻¹ (—); 40,0 mg L⁻¹ (—); 60,0 mg L⁻¹ (—); 80,0 mg L⁻¹ (—). Cada mistura foi tamponado em pH 6,9 (solução tampão fosfato).

Pode-se observar a recuperação da intensidade de fluorescência dos NPCs quando concentrações crescentes de AA são adicionadas na presença do íon cromo(VI).

Em estudo prévio, foi evidenciado que uma solução 100,0 mg L⁻¹ AA foi capaz de recuperar 100% de fluorescência dos NPCs, devido à redução total do íon cromo(VI) a cromo(III). No entanto, para fins analíticos, optou-se por definir 80,0 mg L⁻¹ AA como concentração máxima.

Na **Figura 5.11**, observa-se o efeito do sensor de NPCs/Cr(VI) em função da adição de concentrações crescentes de AA (0,50 a 80,0 mg mL⁻¹), que pode ser observado pelo aumento

da coloração das soluções expostas à radiação ultravioleta, de azul ciano para azul ciano intenso (seta de cor branca).



Figura 5.11 – Fotografia dos frascos das soluções utilizadas para a construção da curva analítica, mostrando as diferentes tonalidades de cor azul ciano, que evidenciam a recuperação d intensidade de fluorescência dos NPCs na presença do aumento da concentração do AA, sob luz UV em $\lambda_{\text{máx.exc.}} = 350$ nm. Fonte: própria do autor.

5.4.1 Validação do modelo linear

A curva analítica obtida está mostrada na **Figura 5.12**.

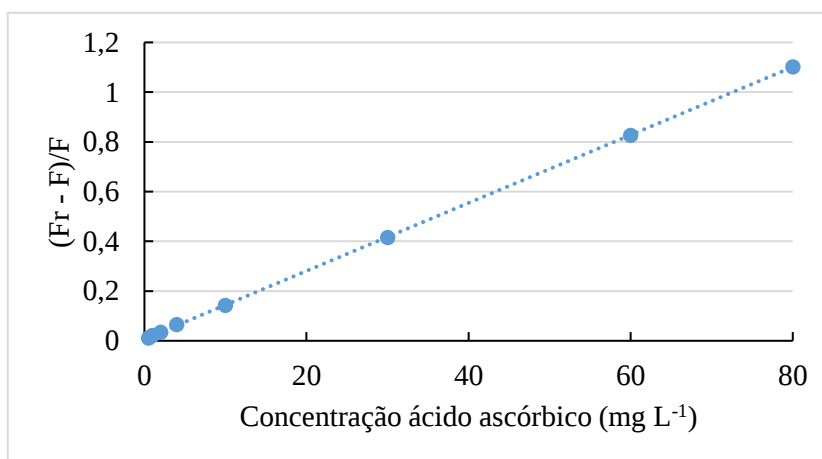


Figura 5.12 – Curva analítica de recuperação da fluorescência dos NPCs em função da concentração de AA: 0,50; 1,0; 2,0; 4,0; 10; 30; 60 e 80 mg L⁻¹.

A equação linear que descreve o modelo é $Y = 0,0137x + 0,0073$. A regressão linear resultou em coeficiente de determinação (R^2) de 0,998, sendo os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) iguais a 0,15 mg L⁻¹ e 0,46 mg L⁻¹, respectivamente.

A distribuição dos resíduos está apresentada na **Figura 5.13**, não se observando perfil sistemático que indique a falta de ajuste do modelo.

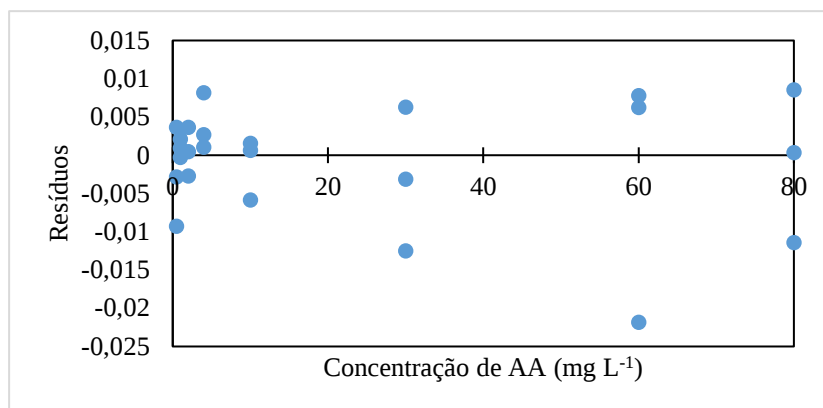


Figura 5.13 Gráfico de distribuição de resíduos deixados pelo modelo univariado de calibração.

5.4.2 Análise de variância

Os resultados obtidos para os testes de falta de ajuste e significância estatística de regressão estão apresentados nas **Tabela 5.4** e **Tabela 5.5**.

Tabela 5.4 – Resultados da ANOVA calculados para avaliação do modelo de calibração univariado do método proposto.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática
Regressão	1	3,10209	3,10209
Resíduo	22	0,01591	0,00072
Falta de ajuste	6	0,00234	0,00039
Erro puro	16	0,05411	0,00338
Total	23	3,11800	

Tabela 5.5 – Resultados dos testes de falta de ajuste e significância de regressão – ANOVA.

		Sistema proposto
MQ_{faj}/MQ_{ep}		0,1155
MQ_{reg}/MQ_r		4.289,47
Grau de liberdade	Falta de ajuste	6
	Significância de regressão	1
Teste F tabelado, 95% de confiança	Falta de ajuste	2,74
	Significância de regressão	4,30

Para a falta de ajuste, a razão MQ_{faj}/MQ_{ep} correspondeu a 0,12, valor inferior quando comparado com o valor tabelado da distribuição F de 2,74, para o nível de confiança estatística de 95%, demonstrando que não há falta de ajuste do modelo linear.

O teste de significância de regressão, que foi realizado por comparação do valor da razão MQ_{reg}/MQ_r , igual a 4.289,47, com o valor crítico de 4,30 da distribuição F a 95% de confiança, evidenciando que a regressão linear é altamente significativa.

5.5 Testes de recuperação

Foram selecionadas três amostras comerciais diferentes para investigar o comportamento da recuperação das concentrações de AA. Os resultados foram comparados com os dados obtidos antes e após a adição das soluções padrão de AA nas amostras.

Tabela 5.6 – Resultados do teste da recuperação do AA em três amostras comerciais distintas utilizando o espectrômetro miniaturizado.

Amostra	Concentração de AA (mg L ⁻¹)	Recuperação (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
A 1	4	97,2	1,4
	10	90,6	0,9
	20	106	1,1
A 2	4	95,9	1,7
	10	107	2,0
	20	90,8	0,6
A 3	4	99,3	1,5
	10	104	1,1
	20	94,9	0,8

Os valores de recuperação das amostras apresentam uma variação entre 90,6 e 107 %, a faixa considerada aceitável para análises químicas de medicamentos (INMETRO, 2016).

5.6 Determinação de ácido ascórbico em medicamentos

Os resultados das amostras sólidas (quatro) e líquidas (cinco) analisadas e a comparação com o método de referência estão mostrados nas **Tabelas 5.7 e 5.8**, respectivamente.

Tabela 5.7 – Resultados de teor de AA das análises feitas com amostras sólidas de medicamentos, através do método proposto e de referência.

Amostras	Rótulo	Concentração de AA				
		Método proposto		Método de referência		
	mg	mg	RSD (%)	mg	RSD (%)	
A1	500	498,8 ± 2,5	0,5	494,6 ± 6,9	1,4	0,8
A2	500	510,7 ± 3,6	0,7	521,0 ± 5,4	1,0	-2,0
A3	1.000	998,5 ± 9,9	1,0	1.002,7 ± 11,2	1,1	-0,4
A4	1.000	1.012,9 ± 2,0	0,2	1.008,1 ± 9,7	1,0	0,5

Os valores médios obtidos para o método proposto e o de referência aproximaram-se dos valores nominais informados nos rótulos, de forma satisfatória. Conforme ANVISA, os teores de princípio ativo de medicamentos não devem exceder 10 % em relação ao valor rotulado (ANVISA, 2017).

Observa-se que o RSD % variou de 0,2 a 1,0 para o método proposto, indicando maior precisão quando comparado ao método de referência, cujos valores variaram entre 1,0 a 1,4.

Com base no teste t pareado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias obtidas pelo método proposto em comparação ao de referência, para um nível de confiança de 95 %.

Tabela 5.8 – Resultados do teor de AA das análises realizadas com amostras líquidas de medicamentos pelo método proposto e de referência para fins de comparação.

Amostras	Rótulo	Concentração de AA				
		Método proposto		Método de referência		E _{rel} (%)
	mg mL ⁻¹	mg mL ⁻¹	CV (%)	mg mL ⁻¹	CV (%)	
A5	200	170,5 ± 1,0	0,6	169,7 ± 0,8	0,5	0,5
A6	200	162,1 ± 1,3	0,8	162,3 ± 1,2	0,7	-0,1
A7	200	161,0 ± 7,4	4,6	163,2 ± 0,6	0,4	-1,4
A8	200	169,2 ± 6,8	4,0	165,9 ± 0,3	0,2	2,0
A9	200	165,1 ± 5,6	3,4	166,1 ± 0,5	0,3	-0,7

Observa-se que os valores médios obtidos para o método proposto e o de referência estão próximos, mas inferiores ao valor rotulado de 200 mg L⁻¹, indicando a provável oxidação do AA nas soluções do medicamento.

Os valores de RSD % para o método proposto variaram de 0,6 a 4,6 %, evidenciando menor precisão em comparação ao método de referência (0,2 a 0,7).

Com base no teste t pareado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias obtidas no método proposto em comparação ao de referência, para um nível de confiança de 95 %.

5.7 Precisão

Para avaliação da precisão intradia, realizaram-se seis medidas para os seguintes níveis de concentrações: 10, 30 e 60 mg L⁻¹ AA, que correspondem aos níveis baixo, intermediário e alto da faixa linear da curva analítica, conforme **Tabela 5.9** (EURACHEM, 2014).

Tabela 5.9 – Resultados da precisão intradia avaliada para soluções de AA nas concentrações de 10, 30 e 60 mg L⁻¹; n = 3.

Concentração (mg L ⁻¹)	Valor médio de intensidade (u.a)	Desvio padrão (mg L ⁻¹)	CV (%)
10,0	0,14	0,0048	3,42
30,0	0,41	0,0077	1,86
60,0	0,83	0,0084	1,01

Os valores de CV corresponderam a 3,42 %, 1,86 % e 1,01 % para as respectivas concentrações de AA, inferiores ao valor crítico de 5,3 % para concentrações menores do que 100 mg L⁻¹ (INMETRO, 2016).

5.8 Estudo de estabilidade

A estabilidade da solução de trabalho dos NPCs, do sensor NPC/Cr(VI) e da recuperação da intensidade de fluorescência NPC/Cr(VI) + AA foi estudada ao longo de 60 min, **Figura 5.14**.

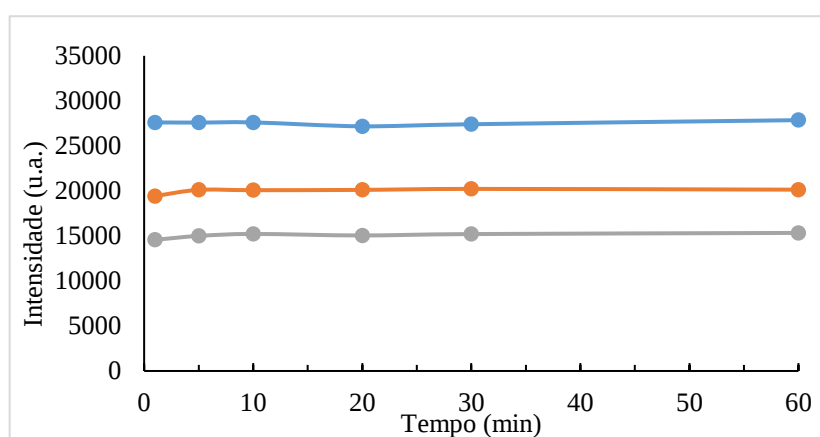


Figura 5.14 – Estudo de estabilidade para (i) a solução de trabalho dos NPCs (—); (ii) o sensor NPCs/Cr(VI) (—) e (iii) recuperação da intensidade de fluorescência NPCs/Cr(VI) + AA (—) em diferentes tempos: 1, 5, 10, 20, 30 e 60 min.

Os resultados indicaram que as intensidades de fluorescência variaram entre zero e cinco minutos, mantendo-se constantes entre cinco e 60 minutos. Por esse motivo, para todos os estudos quantitativos, definiu-se um tempo de repouso de 5 min para que as soluções atingissem a condição de equilíbrio químico. Resultado similar para o tempo de repouso foi encontrado por Luo e colaboradores (2018), ao determinarem o teor de ácido ascórbico em frutas.

5.9 Estudo de interferentes

Os principais interferentes inorgânicos estudados foram os cátions Ca²⁺, Na⁺, K⁺, Cu²⁺, Cr³⁺, Co²⁺, Fe²⁺ e Fe³⁺, avaliados em concentração cinco vezes maior que o íon cromo(VI), ou

seja, 50 mg L⁻¹, exceto para os cátions Fe²⁺ e Fe³⁺, que foram empregados na concentração de 20 mg L⁻¹ e 10 mg L⁻¹, respectivamente (**Figura 5.16**).

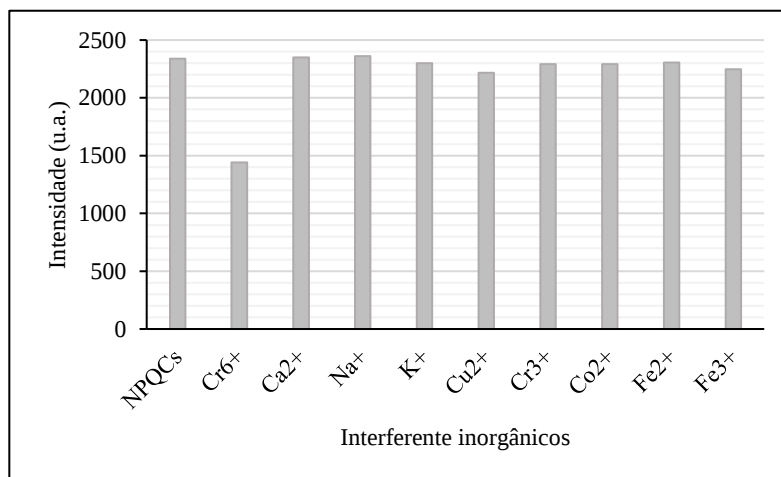


Figura 5.15 – Estudo de interferentes inorgânicos para averiguar o efeito IFE dos seguintes cátions na presença da solução de trabalho de NPCs: Ca²⁺, Na⁺, Cu²⁺, K⁺, Cr³⁺, Co²⁺, Fe²⁺ e Fe³⁺ em comparação com o cátion Cr⁶⁺.

Observa-se que não ocorrem efeitos de supressão de fluorescência superiores a 5 % de supressão, nas concentrações de interferentes estudadas. No entanto, ressalta-se que os efeitos para os cátions Fe²⁺ e Fe³⁺ referem-se às concentrações de 20 mg L⁻¹ e 10 mg L⁻¹, respectivamente, ou seja, acima desses valores, são interferentes. Da literatura, tanto o íon ferro(II) quanto o íon ferro(III) interagem com grupos fenólicos, hidroxilas e/ou aminas encontrados na superfície dos NPCs, promovendo a supressão de fluorescência de PCs (GONG et al, 2015; HORMOZI-NEZHAD e TAGHIGHIPOUR, 2016).

Capítulo 6

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Os NPCs obtidos a partir do suco de cajá-manga, sintetizados por tratamento de carbonização hidrotérmica, apresentaram alta fluorescência de coloração azul ciano em um comprimento de onda de emissão de 488 nm, quando excitados em 380 nm.

A dopagem com nitrogênio promoveu aumento da intensidade de fluorescência dos NPCs. A melhor de condição de síntese foi obtida utilizando concentração de etanolamina de $1,0 \text{ ml L}^{-1}$, que correspondeu a um valor de rendimento quântico de fluorescência de 12,0 %, estabelecendo melhor relação custo/benefício e condição ambientalmente amigável.

O aumento de sensibilidade analítica depende da concentração de NPCs, do pH do meio reacional e da concentração da solução de íon cromo(VI).

O sensor NPCs/Cr(VI) produzido foi capaz de interagir com diferentes concentrações de AA, possibilitando a determinação analítica pelo sistema *on-off-on*.

A faixa linear de trabalho correspondeu ao intervalo de 0,46 a 80 mg L^{-1} , com limite de detecção igual a $0,15 \text{ mg L}^{-1}$.

A comparação de valores médios de AA entre o método proposto e o de referência não evidenciou diferenças estatisticamente significativas para o teste t pareado, considerando um nível de confiança de 95 %. No entanto, os valores médios obtidos para as amostras líquidas ficaram abaixo do valor rotulado, indicando provável degradação do AA nessa forma de apresentação do medicamento. Para as amostras sólidas, esse fato não observado, evidenciando maior estabilidade química do fármaco na forma de comprimidos.

O método proposto apresenta vantagens como facilidade de síntese e manipulação das nanopartículas, utilização de instrumentação básica que pode ser encontrada na maioria dos laboratórios, além do uso de um espectrômetro miniaturizado portátil de baixo custo quando comparado a equipamentos de bancada equivalentes.

REFERÊNCIAS

ALAM, A.; PARK, B.; GHOURI, Z. K.; PARK, M.; KIM, H. Synthesis of Carbon Quantum Dot from Cabbage with Down- and Up-Conversion Photoluminescence Properties: Excellent Imaging Agent for Biomedical Application. *Green Chemistry*, 17, 3.791-3.797, 2015.

ANDRADE, S. I. E. Pontos quânticos de carbono aplicado à determinação fluorimétrica de cobre(II) em óleos usando um sistema em fluxo-batelada com extração em fase única. *Tese de Doutorado*. Programa de Pós Graduação em Química- Universidade Federal da Paraíba, 2016.

ANVISA. Resolução da diretoria colegiada nº 141, de 25 de julho de 2017. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401 Acesso em: 26/01/2019.

ANVISA. Farmacopeia Brasileira – Volume 2 – Monografias, 5ª edição, Brasília, 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/260079/5%C2%AA+edi%C3%A7%C3%A3o+-+Volume+2/ce7e36ca-b3f4-46eb-9a99-2974c4041383>. Acesso em: 14/11/2018.

ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada nº 269, de 22 de setembro de 2005. Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC_269_2005.pdf/2e95553c-a482-45c3-bdd1-f96162d607b3. Acesso em 17/01/2019.

ARYA, S. P.; MAHAJAN, M.; JAIN. P. Non-spectrophotometric methods for the determination of Vitamin C. *Analytica Chimica Acta*, 417, 1-14, 2000.

BACCAN, N.; ANDRADE, J. C.; GODINHO, O. E. S; BARONE, J. S. Química Analítica Quantitativa Elementar. 3ª edição. 324 p. Edgar Blucher: São Paulo, 2001.

BAPTISTA, F. R.; BELHOUT, S. A. GIORDANI, S.; QUINN, S. J. Recent developments in carbono nanomaterial sensors. *Chemical Society Reviews*, 44, 4433-4453, 2015.

BARATI, A.; SHAMSIPUR, M.; ARKAN, E.; HOSSEINZADEH, L.; ABDOLLAHI, H. Synthesis of biocompatible and highly photoluminescent nitrogen doped carbon dots from lime: Analytical applications and optimization using response surface methodology. *Materials Science and Engineering*, 47, 325-332, 2015.

CAO, J.; ZHANG, W.; WANG, H.; MA, S.; LIU, Y. A novel fluorescence immunosensor based on Förster resonance energy transfer between nitrogen and sulfur co-doped carbon dot functionalized silica nanospheres and Au@Ag NPs. *New Journal of Chemistry*. 43, 1.424-1.430, 2019.

CHEN, H.; DOU, J.; XU, H. Removal of Cr(VI) ions by sewage sludge compost biomass from aqueous solutions: Reduction to Cr(III) and biosorption. *Applied Surface Science*, 425, 728-735, 2017.

CHEM, Y.; O'DONOGHUE, M. B.; HUANG, Y.; KANG, H.; PHILIPS, J. A.; CHEN, X.; ESTEVEZ, M.; YANG, C. J.; TAN, W.; A Surface Energy Transfer Nanoruler for Measuring Binding Site Distances on Live Cell Surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 132, 16.559-16.570, 2010.

DAS, R.; BANDYOPADHYAY, R.; PRAMANIK, P. Carbon quantum dots from natural resource: a review, *Mater. Today*, 8, 96-109.2018.

DU, W.; XU, X.; HAO, H.; LIU, R.; ZHANG, D.; GAO, F.; LU, Q. Green synthesis of fluorescent carbon quantum dots and carbon spheres from pericarp. *Science China Chemistry*, 58 (5), 863-870, 2015.

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods A laboratory guide to method validation and related topics. 2^a edição, 2014. Disponível em: <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/my> . Acesso em: 24/01/2019.

FONG, J. F.; CHIN, S. F.; NG, S. M. A unique “turn-on” fluorescence signalling strategy for highly specific detection of ascorbic acid using carbon dots as sensing probe. *Biosensors and Bioelectronics*, 85, 844-852, 2016.

FONIN, A. V.; SULATSKAYA, A.I.; KUZNETSOVA, I.M.; TUROVEROV, K. K. Fluorescence of Dyes in Solutions with High Absorbance. Inner Filter Effect Correction. *Plos One*, 9, 1-8, 2014.

FU, L.; WANG, A.; LAI, G.; SU, W.; MALHERBE, F.; YU, J.; LIN, C.; YU, A. Defects regulating of graphene ink for electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. *Talanta*, 180, 248-253, 2018.

GIULIVI, C.; CADENAS, E. The reaction of ascorbic acid with different heme iron redox states of myoglobin. *Federation of European Biochemical Societies*, 332(3), 287-290, 1993.

GONG, X.; LIU, Y.; YANG, Z.; SHUANG, S.; ZHANG, Z.; DONG, C. An “on-off-on” fluorescent nanoprobe for recognition of chromium(VI) and ascorbic acid based on phosphorus/nitrogen dual doped carbon quantum dot. *Analytica Chimica Acta*, 968, 85-96, 2017.

GONG, X.; LU, W.; PAAU, M.C.; HU, Q.; WU, X.; SHUANG, S.; DONG, C.; CHOI, M. M.C. Facile synthesis of nitrogen-doped carbon dots for Fe^{3+} sensing and cellular imaging. *Analytica Chimica Acta*. 861, 74-84, 2015.

GUO, J.; HUO, D.; MEI, H.; HOU, C. J.; FA, H.; LUO, H.; YANG, P. Colorimetric detection of Cr (VI) based on the leaching of gold nanoparticles using a paper-based sensor. *Talanta*, 161, 819-925, 2016.

HOLA, K.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; GIANNELIS, E.P.; ZBORIL, R.; ROGACH, A.L. Carbon dots—Emerging light emitters for bioimaging, cancer therapy and optoelectronics. *Nanotoday*, 9, 590-603, 2014.

HORMOZI-NEZHAD, M. R.; TAGHIGHIPOUR, M. Quick Speciation of Iron (II) and Iron (III) in Natural Samples Using a Selective Fluorescent Carbon Dot-based Probe. *Analytical Methods*, 8, 4.064-4.068, 2016.

HUANG, H.; CUI, Y.; LIU, M.; CHEN, J.; WAN, Q.; WEN, Y.; DENG, F.; ZHOU, N.; ZHANG, X.; WEI, Y. A one-step ultrasonic irradiation assisted strategy for the preparation of polymer-functionalized carbon quantum dots and their biological Imaging. *Journal of Colloid and Interface Science*, 532, 767-773, 2018.

HUANG, H.; LV, J.; ZHOU, D.; BAO, N.; XU, Y.; WANG, A.; FENG, J. One-pot green synthesis of nitrogen-doped carbon nanoparticles as fluorescent probes for mercury ions. *RSC Advances*, 3, 21.691-21.696, 2013.

LIJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Letter to Nature*. 354, 56-58, 1991.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos, de 05 de agosto de 2016. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf. Acesso em: 24/01/2019.

IQBAL, A.; TIAN, Y.; WANG, X.; GONG, D.; GUO, Y.; IQBAL, K.; WANG, Z.; LIU, W.; QIN, W. Carbon dots prepared by solid state method via citric acid and 1,10- phenanthroline for selective and sensing detection of Fe^{2+} and Fe^{3+} . *Sensors and Actuators*, 237, 408-415, 2016.

JAYAWEERA, S.; KE, Y.; HU, X.; NG W. J. Facile preparation of fluorescent carbon dots for label-free detection of Fe^{3+} . *Photochemistry and Photobiology*, 390, 156-163, 2019.

KOBLOVÁ, P.; SKLENÁROVÁ, H.; BRABCOVÁ, I.; SOLICH, P. Development and validation of a rapid HPLC method for the determination of ascorbic acid, phenylephrine, paracetamol and caffeine using a monolithic column. *Analytical Methods*, 4, 1.588-1.591, 2012.

KROTO, H. W.; HEATH, J. R.; O'BRIEN, S. C.; CURL, R. F.; SMALLEY, R. E. C60: Buckminsterfullerene. *Letter to Nature*, 318, 162-163, 1985.

LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition, Springer, 2006.

LEITE, F. Validação em Análise Química, 5ª Edição. p.109-190. Editora Átomo: São Paulo, 2008.

LI, H.; HE, X.; LIU Y.; HUANG, H.; LIAN, S.; LEE, S.; KANG, Z. One-Step Ultrasonic Synthesis of Water-Soluble Carbon Nanoparticles with Excellent Photoluminescent Properties. *Carbon*, 49, 605-609, 2011.

LI, P.; HONG, Y.; FENG, H.; Li, S. F. Y. An efficient “off-on” carbon nanoparticle-based fluorescent sensor for recognition of chromium(VI) and ascorbic acid based on the inner filter effect. *Journal of Material Chemistry B*, 5, 2979-2988, 2017.

LI, Y.; XU, L.; CHEN, T.; LIU, X.; XU, Z.; ZHANG, H. Carbon nanoparticles from corn stalk soot and its novel application as stationary phase of hydrophilic interaction chromatography and per aqueous liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 726, 102-108, 2012.

LIAO, S.; ZHAO, X.; ZHU, F.; CHEN, M.; WU, Z.; SONG, X.; YANG, H.; CHEN, X. Novel S, N-doped carbon quantum dot-based "off-on" fluorescent sensor for silver ion and cysteine. *Talanta*, 180, 300-308, 2018.

LIM, S. Y.; SHEN, W.; GAO, Z. Carbon quantum dots and their applications. *Chemical Society Reviews*, 44, 362-381, 2014.

LUO, X.; ZHANG, W.; HAN, Y.; CHEN, X.; ZHU, L.; TANG, W.; WANG, J.; YUE, T.; LI, Z. N, S co-doped carbon dots based fluorescent “on-off-on” sensor for determination of ascorbic acid in common fruits. *Food Chemistry*, 258, 214-221, 2018.

MACHADO, C.E.; VIEIRA, K. O.; FERRARI, J.L.; SCHIAVON, M.A. Pontos Quânticos de Carbono: Síntese Química, Propriedades e Aplicações. *Revista Virtual de Química*, 7(4), 1.306-1.346, 2015.

MADRONA, G. S; SANTOS, S. S.; CARDOSO, V. L.; REIS, M. H. M. Influência do pré-tratamento na microfiltração de polpa de cajá-manga (*Spondias dulcis*). *Revista Virtual de Química*, 10(1), 116-123, 2018.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação, indicadores de segurança e descarte de produtos químicos. 2ª edição. p.724. Edgar Blucher: São Paulo, 2007.

MUTHUSANKAR, G.; RAJKUMAR, C.; CHEN, S.; KARKUZHALI, R.; GOPU,, G.; SANGILI, A.; SENGOTTUVELAN, N.; SANKAR, R. Sonochemical driven simple preparation of nitrogen-doped carbon quantum dots/SnO₂ nanocomposite: A novel electrocatalyst for sensitive voltammetric determination of riboflavina. *Sensors and Actuators*, 281, 602-612, 2019.

NEMATI, F.; HOSSEINI, M.; ZORE-DORABEI, R.; SALEHNIA, F.; GANJALI, M.R. Fluorescent turn on sensing of Caffeine in food sample based on sulfurdoped carbon quantum dots and optimization of process parameters through response surface methodology. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 273, 25-34, 2018.

NETO, B. B.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos. 4ª edição. p. 215. Bookman: Porto Alegre, 2010.

NETO, B. B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica - parte i. fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). *Química Nova*, 25(5), 856-865, 2002.

OZYUREK, M.; GUÇIC, K.; BEKTASOGLU, B.; APAK, R. Spectrophotometric determination of ascorbic acid by the modified CUPRAC method with extractive separation of flavonoids–La(III) complexes. *Analytica Chimica Acta*, 588, 88-95, 2007.

PETERS, F. T; DRUMMER, O. H.; MUSSHOF, F. Validation of new methods. *Forensic Science International*, 165, 216-224, 2007.

PHAN, L.M.T.; BAEK, S.H.; NGUYEN, T. P.; PARK, K. Y.; HA, S.; RAFIQUE, R.; KAILASA, S.K.; PARK, T.J. Synthesis of fluorescent silicon quantum dots for ultra-rapid and selective sensing of Cr(VI) ion and biomonitoring of cancer cells. *Materials Science & Engineering C* 93, 429-436, 2018.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. *Química Nova*, 19(3), 268-277, 1996.

PUBCHEM, 2019. U. S. National Library of Medicine - National Center for Biotechnology Information - Ascorbic acid. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/#query=ascorbic%20acid>>. Acesso em 17/01/2019. Se queres usar para informações sobre ácido ascórbico.

QIAN, Z. S.; CHAI, L. J.; HUANG, Y. Y.; TANG, C.; SHEN, J. J.; CHEN, J. R.; FENG, H. A real-time fluorescent assay for the detection of alkaline phosphatase activity based on carbon quantum dots. *Biosensors and Bioelectronics*, 68, 675-680, 2015.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Química Nova*, 31 (1), 164-171, 2008.

SANCHEZ, F.; SOBOLEV, K.; Nanotechnology in concrete – A review. *Construction and Building Materials*, 24, 2.060-2.071, 2010.

SKOOG, D. A.; WEST, D.M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Fundamentos de química analítica. 9ª edição, p.753-763. Cengage Learning: São Paulo 2015.

SHEN, C.; SUN, Y.; WANG, J.; LU, Y. Facile route to highly photoluminescent carbono nanodots for ion detection, pH sensors and bioimaging. *Nanoscale*, 6, 9.139-9.147, 2014.

SILVA, K.D. Pontos quânticos de carbono de *Pilosocereus gounellei* para determinação de taninos em chás empregando um analisador flow-batch com detecção fluorimétrica. *Dissertação de Mestrado*. Programa de Pós Graduação em Químico – Universidade Federal da Paraíba, 2018.

SINGH, A.; MOHAPATRA, P. K.; KALAYANASUNDARAM, D.; KUMAR, S. Self-functionalized ultrastable water suspension of luminescent carbon quantum Dots. *Materials Chemistry and Physics*, 225, 23-27, 2019.

SINGH, V. K.; SINGH, V.; YADAV, P. K.; CHANDRA, S.; BANO, D.; KUMAR, V.; KOCH, B.; TALAT, M.; HASAN, S. H. Bright-blue-emission nitrogen and phosphorus doped carbon quantum dots as a promising nanoprobe for detection of Cr(VI) and ascorbic acid in pure aqueous solution and in living cell. *New Journal of Chemistry*, 42, 12.990-12.997, 2018.

SUN, X.; BRUCKNER, C.; LEI, Y. One-pot and ultrafast synthesis of nitrogen and phosphorus codoped carbon dots possessing bright dual wavelength fluorescence emission. *Nanoscale*, 7, 17278-17282, 2015.

SUN, X.; LEI, Y. Fluorescent carbon dots and their sensing applications. *Trends in Analytical Chemistry*, 89, 163-180, 2017.

TIAN, T.; HE, Y.; GE, Y.; SONG, G. One-pot synthesis of boron and nitrogen co-doped carbon dots as the fluorescence probe for dopamine based on the redox reaction between Cr(VI) and dopamine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 240, 1.265-1.271, 2017.

TIBURSKI, J. H.; ROSENTHAL, A.; DELIZA, R.; Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. *Food Research International*, 44, 2.326-2.331, 2011.

XUE, M.; ZHANG, L.; ZOU, M.; LAN, C.; ZHAN, Z.; ZHAO, S. Nitrogen and sulfur co-doped carbon dots: A facile and green fluorescence probe for free chlorine. *Sensors and actuators B: Chemical*, 219, 50-56, 2015.

XU, Q.; KUANG, T.; LIU, Y.; CAI, L.; PENG, X.; SREEPRASAD, T. S.; ZHAO, P.; YU, Z.; LI, N. Heteroatom-doped carbon dots: synthesis, characterization, properties, photoluminescence mechanism and biological applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 45, 7.204-7.219, 2016.

XU, X.; RAY, R.; GU, Y.; PLOEHN, H. J.; GEARHEART, L.; RAKER, K.; SCRIVENS, W.A.; Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 12736–12737, 2004.

VAZ, R.; VIEIRA, K. O.; MACHADO, C. F.; FERRARI, J. L.; SCHIAVON, M. A. Preparação de pontos de carbono e sua caracterização óptica: um experimento para introduzir nanociência na graduação. *Química Nova*, 38 (10), 1366-1373, 2015.

VANNUCCHI, H.; ROCHA, M.M. Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes: ácido ascórbico. *Internacional Life Sciences Institute*, 21, 1-12, 2012.

VIDAL, P. C. L.; FREITAS, G. ESTUDO DA ANTIOXIDAÇÃO CELULAR ATRAVÉS DO USO DA VITAMINA C. *Revista Uningá*, 21(1) 60-64. 2015.

YAN, F.; JIANG, Y.; SUN, Z. ZHANG, Y.; ZHOU, X. Surface modification and chemical functionalization of carbon dots: a review. *Microchimica Acta*, 185, 1-34, 2018.

YANG, H.; HE, L.; LONG, Y.; LI, H.; PAN, S.; LIU, H.; HU, X. Fluorescent carbon dots synthesized by microwave-assisted pyrolysis for chromium(VI) and ascorbic acid sensing and logic gate operation *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 205, 12-20, 2018.

WANG, Y.; KIM, S.; FENG, L. Highly luminescent N, S- Co-doped carbon dots and their direct use as mercury(II) sensor. *Analytica Chimica Acta*, 890,134-142, 2015.

WANG, Z.; TENG, X.; LU, C. Carbonate interlayered hydrotalcites-enhanced peroxyxynitrous acid chemiluminescence for high selectivity sensing of ascorbic acid. *Analyst*, 137, 1876-1881, 2012.

ZARBIN, A. J. G.; OLIVEIRA, M.M. NANOESTRUTURAS DE CARBONO (NANOTUBOS, GRAFENO): QUO VADIS? *Química Nova*, 36 (10), 1.533-1.539, 2013.

ZHANG, L.; HAN, Y.; ZHU, J.; ZHAI, Y.; DONG, S. Simple and Sensitive Fluorescent and Electrochemical Trinitrotoluene Sensors Based on Aqueous Carbon Dots. *Analytical Chemistry*, 87 (4), 2.033- 2.036, 2015.

ZHANG, Y.; FANG, X. ZHAO, H.; LI, Z. A highly sensitive and selective detection of Cr(VI) and ascorbic acid based on nitrogen-doped carbon dots. *Talanta*, 181, 318-325, 2018.

ZHANG, H. Y.; WANG, Y.; SHAN, X.; WANG, H.; WANG, J. H.; FENG, L. Rapid detection of Cr(VI) ions based on cobalt(II)-doped carbon dots. *Biosensors and Bioelectronics*, 87, 46-52, 2017.

ZHANG, B.; LIU, C.; LIU, Y. A Novel One- Step Approach to Synthesize Fluorescent Carbon Nanoparticles. *Europe Journal of Inorganic Chemistry*, 4411-4414, 2010.

ZHAO, J.; PAN, X.; SUN, X.; PAN, W.; YU, G.; WANG,, J. Detection of metronidazole in honey and metronidazole tablets using carbon dots- based sensor via the inner filter effect. *The Journal of Biological and Chemical Luminescence*, 33, 704-7012, 2018.

ZHOU, Z.; ZHOU, M.; GONG, A.; ZHANG, Y.; LI, Q. Synthesis of highly photoluminescent carbon dots via citric acid and Tris for iron(III) ions sensors and bioimaging. *Talanta*, 143, 107-113, 2015.

ZU, F.; YAN, F.; BAI, Z.; WANG, Y.; HUANG. Y.; ZHOU, X.; The quenching of the fluorescence of carbon dots: A review on mechanisms and applications. *Microchim Acta*, 184, 1.899-1.914, 2017.

ZUO, P.; LU, X.; SUN, Z.; GUO, Y.; HE, H. A review on syntheses, properties, characterization and bioanalytical applications of fluorescent carbon dots. *Microchim Acta*. 189, 519-542, 2016.

ZHU, S.; MENG, Q.; WANG, L.; ZAHNG, J.; SONG, Y.; JIN, H.; ZHANG, K.; SUN, H.; WANG, H.; YANG, B. Highly Photoluminescent Carbon Dots for Multicolor Patterning, Sensors, and Bioimaging. *Journal of the German*, 52, 3.953-3.957, 2013.