



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

Tese de doutorado

**SÍNTESE DE PONTOS QUÂNTICOS DE CARBONO
FLUORESCENTES ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS PARA
DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO E RIBOFLAVINA
EM SUPLEMENTOS VITAMÍNICOS**

Wallis Cavalcante do Nascimento

JOÃO PESSOA – PB

Junho de 2024



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

Tese de doutorado

SÍNTESE DE PONTOS QUÂNTICOS DE CARBONO FLUORESCENTES ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO E RIBOFLAVINA EM SUPLEMENTOS VITAMÍNICOS

Wallis Cavalcante do Nascimento

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

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

Coorientador: Dr. Stéfani Iury Evangelista de Andrade

JOÃO PESSOA – PB

Junho de 2024

**Catálogo na publicação ·
Seção de Catalogação e Classificação¶**

N244s Nascimento, Wallis Cavalcante do.¶

Síntese de pontos quânticos de carbono fluorescentes assistida por micro-ondas para determinação de ácido ascórbico e riboflavina em suplementos vitamínicos / Wallis Cavalcante do Nascimento. -- João Pessoa, 2024.¶
152 f. : il.¶

¶

Orientação: Kátia Messias Bichinho.¶

Coorientação: Stéfani Iury Evangelista de Andrade. ·
Tese (Doutorado) → - UFPB/CCEN.¶

¶

1. Química analítica. ·2. Nanopartículas. ·3. ·
Suplementos vitamínicos. ·4. EDTA. ·I. Bichinho, Kátia ·
Messias. ·II. Andrade, Stéfani Iury Evangelista de. ·III. ·
Título.¶

UFPB/BC'

CDU 543 (043)'

Síntese de pontos quânticos de carbono fluorescentes assistida por micro-ondas para determinação de ácido ascórbico e riboflavina em suplementos vitamínicos

Tese de Doutorado apresentada pelo aluno Wallis Cavalcante do Nascimento e aprovada pela banca examinadora em 27 de junho de 2024.

Documento assinado digitalmente
 **KATIA MESSIAS BICHINHO**
Data: 01/07/2024 08:04:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Kátia Messias Bichinho (UFPB) Orientadora/Presidente

Documento assinado digitalmente
 **JOSUE CARINHANHA CALDAS SANTOS**
Data: 03/07/2024 17:17:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos (UFAL) Examinador

Documento assinado digitalmente
 **CINTYA D ANGELES DO ESPIRITO SANTO BARB**
Data: 01/07/2024 08:45:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a. Dr.^a. Cintya D'Angeles do Espírito Santo Barbosa (UFAL) Examinadora

Documento assinado digitalmente
 **WALLACE DUARTE FRAGOSO**
Data: 09/07/2024 21:31:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Wallace Duarte Fragoso (UFPB) Examinador

Documento assinado digitalmente
 **RICARDO ALEXANDRE CAVALCANTI DE LIMA**
Data: 04/07/2024 09:26:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima (UFPB) 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 irmã Willianne Cavalcante do Nascimento e Rodrigo Inacio de Melo que buscaram a felicidade e crescimento como pessoa, enquanto estavam na terra.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pelo presente da vida e por me ajudar a superar os desafios que apareceram durante toda minha carreira acadêmica, 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 aprendizagem lendo os artigos e escrevendo o artigo e a Tese.

A minha família, Manoel, Edineide, Willianne, Claudio, Tamires, Fellype, Ana Beatriz e Edicleide, que sempre me apoiaram e me deram o suporte para que conseguisse estudar de forma eficiente.

A minha “namorada”, Neidiane Alcântara de Souza, que me ajudou a aliviar as tensões do final do doutorado com seu carinho, suas palavras positivas e sua presença encantadora.

Aos meus amigos e irmãos, Myller, Luciana, Ludmila, Pedro, Victor, Raquel, Gabriel, Karol e Maisa que estiveram nos momentos mais difíceis da minha vida.

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. Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima, que esteve sempre me dando uma palavra amiga e me acompanha desde o exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Josué Caririnha Caldas Santos e à Prof.^ª Dr.^a Cintya D’Angeles do Espírito Santo Barbosa, ambos da UFAL, e Prof. Wallace Duarte Fragoso da UFPB, que prontamente aceitaram o convite para compor a banca examinadora.

A todos os meus professores do PPGQ, em especial, aos professores Dr. Mário César Ugulino de Araújo e Fauston Fred da Silva.

À turma da salinha, Juliana, Kelly, Daniella, Tassio, Thyago, Nayara, Jainny, que me fazem sorrir todos os dias.

A todos os amigos e amigas que conheci na família LAQA, em especial, Prof. Luciano, Flaviano, Tassio, João, Luciano, Monte, Flaviana, Amanda, Wellington, Alcides e Suely.

A CAPES, pela oportunidade de cursar o doutorado com bolsa de estudos de número 88882.440055/2019-01.

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

RESUMO

Síntese de pontos quânticos de carbono fluorescentes assistida por micro-ondas para determinação de ácido ascórbico e riboflavina em suplementos vitamínicos

Neste trabalho, os precursores ácido etilenodiamino tetra-acético, tiosulfato de sódio e ureia, usualmente disponíveis em laboratórios analíticos, foram empregados na síntese de etapa única de pontos quânticos de carbono pelo método assistido por micro-ondas de uso doméstico de 1.400 W. Na investigação da caracterização dos PQC foram registradas as imagens TEM, espectro de FTIR, análises XPS, XRD, potencial Zeta, espectroscopia de absorção UV-Vis e espectroscopia de fluorescência molecular. Utilizando duas configurações instrumentais distintas, uma rede de difração com detector baseado em fotomultiplicadora, *Agilent*, e outro com detector CCD e LED 372 nm, *Ocean Optics*, os PQC exibiram propriedades ópticas estáveis por 240 dias com emissão de fluorescência de coloração azul em 430 e 440 nm, respectivamente, solubilidade em água e rendimento quântico de fluorescência de 8,9 %, sendo aplicados na determinação do teor de ácido ascórbico (AA) e riboflavina (RB) em suplementos vitamínicos. Os mecanismos de fluorescência dos PQC foram o *quenching* dinâmico para o sensor PQC/Cr(VI) baseado na variação de Ksv com a variação de temperatura, e retorno da fluorescência por supressão na presença de AA e o *quenching* estático baseado na variação de Ksv com a variação de temperatura e efeito de filtro interno na interação com RB. O planejamento fatorial 2⁴ foi usado na otimização dos parâmetros analíticos de PQC/Cr(VI)/AA empregando as variáveis volume de PQC, volume de tampão, concentração de NaCl 0,5 mol L⁻¹ e concentração de íon cromo(VI) e o planejamento 2³ para PQC/RB empregando as variáveis volume de PQC, volume de tampão, concentração de NaCl 0,5 mol L⁻¹, calculados usando a versão livre do software Minitab. No instrumento *Agilent*, o sensor PQC/Cr(VI) empregado na determinação de AA por meio da estratégia *on-off-on* resultou numa faixa linear de 0,5 a 50 µg mL⁻¹ e LOD 0,15 µg mL⁻¹, recuperação das amostras de 80,72 a 107,72 % e test t pareado para amostras líquidas de 1,88 e 0,6 para sólidas; e para a determinação de RB resultou numa faixa linear de 0,1 a 7 µg mL⁻¹ e LOD 0,09 µg mL⁻¹, recuperação das amostras de 85,07 a 112,23 % e test t pareado para amostras em cápsulas de 0,74. No instrumento *Ocean Optics*, o sensor PQC/Cr(VI) empregado na determinação de AA por meio da estratégia *on-off-on* resultou numa faixa linear de 0,25 a 50 µg mL⁻¹ e LOD 0,1 µg mL⁻¹, recuperação das amostras de 86,21 a 108,74 % e test t pareado para amostras líquidas de 3,10 e 0,14 para sólidas e para a determinação de RB resultou numa faixa linear de 0,1 a 4,5 µg mL⁻¹ e LOD 0,03 µg mL⁻¹ recuperação das amostras de 88,97 a 112,96 % e test t pareado para amostras em cápsulas de 3,05. O estudo de seletividade analítica, usando diferentes compostos orgânicos e inorgânicos, foi realizado a partir do efeito *quenching*, retorno da fluorescência com diferentes íons metálicos e retorno de fluorescência do sensor PQC/Cr(VI). Portanto, os PQC sintetizados foram utilizados na determinação de AA e RB em suplementos vitamínicos usando dois instrumentos de fluorescência, e a aplicação desse nanomaterial pode ser expandida para diferentes analitos e matrizes.

Palavras-chave: nanopartículas; EDTA; planejamento fatorial; micro-ondas; suplementos vitamínicos.

ABSTRACT

Microwave-assisted synthesis of fluorescent carbon quantum dots for determination of ascorbic acid and riboflavin in vitamin supplements

In this study, the precursors ethylenediaminetetraacetic acid, sodium thiosulfate, and urea, which are commonly available in analytical laboratories, were used in a one-step synthesis of carbon quantum dots via a domestic 1,400 W microwave-assisted method. Characterization of the quantum dots included TEM imaging, FTIR spectroscopy, XPS analysis, XRD, Zeta potential measurement, UV-Vis absorption spectroscopy, and molecular fluorescence spectroscopy. Using two distinct instrumental setups a diffraction grating with a photomultiplier detector (Agilent), and another with a CCD detector and 372 nm LED (Ocean Optics), the quantum dots exhibited stable optical properties for 240 days with blue fluorescence emission at 430 and 440 nm, respectively, water solubility, and a fluorescence quantum yield of 8.9%. They were applied in the determination of ascorbic acid (AA), and riboflavin (RB) content in vitamin supplements. The fluorescence mechanisms of the quantum dots included dynamic quenching for the PQC/Cr(VI) sensor based on the variation of K_{sv} with temperature change, and fluorescence recovery through suppression in the presence of AA, as well as static quenching based on the variation of K_{sv} with temperature change and internal filter effects in interaction with RB. A 2^4 -factorial design was used to optimize the analytical parameters of PQC/Cr(VI)/AA, employing the variables PQC volume, buffer volume, 0.5 mol L^{-1} NaCl concentration, and Cr(VI) ion concentration, and a 2^3 -factorial design for PQC/RB, using the variables PQC volume, buffer volume, and 0.5 mol L^{-1} NaCl concentration, calculated using Minitab free software. On the Agilent instrument, the PQC/Cr(VI) sensor used for AA determination through an on-off-on strategy resulted in a linear range of 0.5 to $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ and an LOD of $0.15 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, with sample recovery ranging from 80.72 to 107.72% and paired t-test results of 1.88 for liquid samples and 0.6 for solid samples; for RB determination, it yielded a linear range of 0.1 to $7 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ and an LOD of $0.09 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, with sample recovery from 85.07 to 112.23% and a paired t-test result of 0.74 for capsule samples. On the Ocean Optics instrument, the PQC/Cr(VI) sensor for AA determination with an on-off-on strategy produced a linear range of 0.25 to $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ and an LOD of $0.1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, with sample recovery between 86.21 and 108.74% and paired t-test results of 3.10 for liquid samples and 0.14 for solid samples; for RB, it showed a linear range of 0.1 to $4.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ and an LOD of $0.03 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, with sample recovery from 88.97 to 112.96% and a paired t-test result of 3.05 for capsule samples. An analytical selectivity study, using various organic and inorganic compounds, was performed based on quenching effects, fluorescence recovery with different metal ions, and fluorescence recovery of the PQC/Cr(VI) sensor. Therefore, the synthesized quantum dots were used for the determination of AA and RB in vitamin supplements using two fluorescence instruments, and the application of this nanomaterial can be expanded to different analytes and matrices.

Keywords: nanoparticles; EDTA; factorial design; microwave; vitamin supplements.

Lista de figuras

Figura 2.1 – Estrutura química de ácido ascórbico.....	16
Figura 2.2 – Estrutura química da riboflavina.....	17
Figura 2.3 – Comparação do tamanho de nanomateriais em escala de 100 pm a 1 mm.....	18
Figura 2.4 – Representação esquemática das diferentes nanoestruturas dos nanomateriais de carbono: (a) nanodiamante; (b) grafeno; (c) fulereno; (d) nanotubos de carbonos; (e) pontos quânticos de carbono; (f) pontos quânticos de grafeno	19
Figura 2.5 – Principais mecanismos <i>quenching</i> aplicados em química analítica.....	25
Figura 2.6 – Precursores EDTA, tiosulfato de sódio e ureia.....	27
Figura 2.7 – Diagrama esquemático da classificação das rotas de síntese, <i>top-down</i> e <i>bottom-up</i> , e os principais métodos de síntese de PQC.....	30
Figura 3.1 – Esquema ilustrativo da síntese de PQC assistido por micro-ondas.....	43
Figura 3.2 – Imagem do espectrofluorímetro Cary Eclipse Agilent.....	51
Figura 3.3 – Fotografia do sistema de detecção Ocean Optics: (a) detector fluorescente; (b) acessório de fixação da cubeta de quartzo; (c) LED-UV montado em dissipador de calor e (d) placa Arduino®. Fonte: própria do autor.....	56
Figura 4.1 – Fotografia dos PQC sintetizados pelo método assistido por micro-ondas descrito em sequência nos tempos: 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 10 min.....	62
Figura 4.2 – Imagem por alta resolução de microscopia eletrônica de transmissão dos PQC com rede média de espaçamento de 0,26 nm.....	63
Figura 4.3 – Ilustração da imagem por TEM dos PQC com média de 100 nanopartículas em zoom de 50 nm	64
Figura 4.4 – Distribuição dos tamanhos das nanopartículas investigadas na Figura 4.3.....	64
Figura 4.5 – Espectro de XPS dos elementos C, H, O, N e S encontrados na superfície dos PQC.....	65
Figura 4.6 – Espectro de XPS em alta resolução dos elementos C, H, O, N e S encontrados na superfície dos PQC.....	66
Figura 4.7 – Espectro de FTIR medido no intervalo de 405 a 3905 cm^{-1} com bandas de estiramentos vibracionais	67
Figura 4.8 – Espectro de medida de DRX com pico em $23,7^\circ$	68
Figura 4.9 – Gráfico de potencial Zeta nos PQCs (vermelho), sensor PQC/Cr(VI) (azul) e PQC/Cr(VI)/AA (verde).....	69
Figura 4.10 – Gráfico de potencial Zeta dos PQCs (Azul) e PQC/RB (Vermelho).....	69
Figura 4.11 – Espectros de absorção molecular da síntese de PQC pelo método assistido por micro-ondas.....	70

Figura 4.12 – Espectros de emissão de fluorescência dos PCs em função do comprimento de onda de excitação variando de 300 a 440 nm.....	71
Figura 4.13 – Variação da intensidade de fluorescência dos PQC em função do pH para ácido ascórbico.....	74
Figura 4.14 – Variação da intensidade de fluorescência dos PQC em função do pH para riboflavina.....	74
Figura 4.15 – Variação da intensidade de fluorescência dos PQC em função do pH sem a presença dos os analitos.....	75
Figura 4.16 – Diagrama de Pareto com a variáveis volume de tampão, volume de PQC, concentração de NaCl e concentração de íon cromo(VI), e suas respectivas interações.....	77
Figura 4.17 – Gráfico dos efeitos das variáveis volume de tampão, volume de PQC, concentração de NaCl e concentração de íon cromo(VI) analisadas individualmente.....	77
Figura 4.18 – Gráfico das interações das variáveis volume de tampão, volume de PQC, concentração de NaCl e concentração de íon cromo(VI).....	78
Figura 4.19 – Diagrama de Pareto com a variáveis volume de tampão, volume de PQC e concentração de NaCl, e suas respectivas interações.....	79
Figura 4.20 – Gráfico dos efeitos das variáveis volume de tampão, volume de PQC, concentração de NaCl e concentração de íon cromo(VI) analisadas individualmente.....	80
Figura 4.21 – Gráfico das interações das variáveis volume de tampão, volume de PQC e concentração de NaCl.....	81
Figura 4.22 – Efeito do tempo repouso de solução analítica PQC/Cr(VI)/AA 5 µg mL ⁻¹ na faixa de 0 a 120 min.....	82
Figura 4.23 – Efeito do tempo de repouso de solução analítica PQC/RB 1 µg mL ⁻¹ na faixa de 0 a 240 min.....	82
Figura 4.24 – Curva analítica entre a intensidade de fluorescência dos PQC e concentrações da solução de íon cromo(VI) em quatro temperaturas diferentes: 13°C; 25°C; 30°C e 40 °C.....	83
Figura 4.25 – Curva analítica entre a intensidade de fluorescência dos PQC e concentrações da solução de RB em quatro temperaturas diferentes em quatro temperaturas diferentes: 13°C; 25°C; 30°C e 40 °C.....	83
Figura 4.26 – Espectro de absorção dos PQC com e sem a presença dos analitos.....	85
Figura 4.27 – Ilustração dos espectros de emissão e excitação em 430 nm e 360 nm, respectivamente, e bandas de absorbância da solução de íon cromo(VI) e dos analitos AA e RB.....	86
Figura 4.28 – Gráfico do retorno da fluorescência dos PQC variado a concentração de íon cromo(VI) na faixa de 10 a 80 µg mL ⁻¹	87
Figura 4.29 – Espectro de fluorescência do sensor PQC/Cr(VI) em diferentes concentrações de AA (0,5 a 100 µg mL ⁻¹)	88
Figura 4.30 – Espectro de fluorescência da solução de PQC em diferentes concentrações de RB (0,1 a 9 µg mL ⁻¹) com banda decrescente em 430nm e crescente em 530 nm.....	89

Figura 4.31 – Espectro de fluorescência da solução de PQC em diferentes concentrações de RB (0,1 a 9 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com banda decrescente em 430 nm.....	89
Figura 4.32 – Curva analítica entre a intensidade de fluorescência do sensor PQC/Cr(VI) baseada na equação $(F_r - F)/F$ e concentrações de AA.....	90
Figura 4.33 – Gráfico da distribuição de resíduos pelo modelo na faixa de concentração de 0,5 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AA.....	91
Figura 4.34 – Espectro de fluorescência da solução de PQC em diferentes concentrações de RB (0,1 a 9 $\mu\text{g mL}^{-1}$) no comprimento de onda emissão em 430 nm.....	92
Figura 4.35 – Gráfico da distribuição de resíduos pelo modelo na faixa de concentração de 0,1 a 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de RB.....	93
Figura 4.36 – Seletividade na resposta do analítica do efeito <i>quenching</i> utilizando diferentes cátions metálicos.....	99
Figura 4.37 – Seletividade na resposta do analítica de AA aplicada na supressão do efeito <i>quenching</i> utilizando diferentes sensores.....	100
Figura 4.38 – Seletividade do sensor PQC/Cr(VI) nos diferentes compostos orgânicos.....	101
Figura 4.39 – Seletividade dos PQC em diferentes compostos orgânicos.....	102
Figura 4.40 – Estabilidade da solução dos PQC analisada durante 8 meses.....	102
Figura 4.41 – Espectro de excitação do LED em 372 nm.....	103
Figura 4.42 – Estabilidade do LED em 372 nm ao longo de 90 min.....	104
Figura 4.43 – Variação de fluorescência dos PQC em função do volume utilizando o analito AA 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	105
Figura 4.44 – Variação de fluorescência dos PQC em função do volume utilizando o analito RB 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	105
Figura 4.45 – Diagrama de Pareto com a variáveis volume de tampão, volume de PQC, concentração de NaCl e concentração de íon cromo(VI), e suas respectivas interações.....	107
Figura 4.46 – Gráfico dos efeitos das variáveis volume de tampão, volume de PQC, concentração de NaCl e concentração de íon cromo(VI) analisadas individualmente.....	108
Figura 4.47 – Gráfico das interações das variáveis volume de tampão, volume de PQC, concentração de NaCl e concentração de íon cromo(VI).....	108
Figura 4.48 – Curva analítica da RB com a medida 4 e 6 otimizadas no planejamento fatorial 2^3	110
Figura 4.49 – Diagrama de Pareto com a variáveis volume de tampão, volume de PQC e concentração de NaCl, e suas respectivas interações.....	110
Figura 4.50 – Gráfico dos efeitos das variáveis volume de tampão, volume de PQC, concentração de NaCl e concentração de íon cromo(VI) analisadas individualmente.....	111
Figura 4.51 – Gráfico das interações das variáveis volume de tampão, volume de PQC e concentração de NaCl.....	112

Figura 4.52 – Espectro de fluorescência do sensor PQC/Cr(VI) em diferentes concentrações de AA (0,5 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$).....	113
Figura 4.53 – Espectro de fluorescência da solução de PQC em diferentes concentrações de RB (0,1 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com banda decrescente em 440 nm e crescente em 540 nm.	114
Figura 4.54 – Espectro de fluorescência da solução de PQC em diferentes concentrações de RB (0,1 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com banda decrescente em 440 nm.	114
Figura 4.55 – Curva analítica entre a intensidade de fluorescência do sensor PQC/Cr(VI) e a concentrações de AA, baseada na equação $(Fr-F)/F$	115
Figura 4.56 – Gráfico da distribuição de resíduos pelo modelo na faixa de concentração de 0,25 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AA.....	116
Figura 4.57 – Espectro de fluorescência da solução de PQC em diferentes concentrações de RB (0,1 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) no comprimento de onda emissão em 440 nm.....	117
Figura 4.58 – Gráfico da distribuição de resíduos pelo modelo na faixa de concentração de 0,1 a 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de RB.....	118

Lista de tabelas

Tabela 2.1 – Principais características dos métodos de sínteses.....	30
Tabela 2.2 – Diferentes técnicas analíticas aplicadas na determinação de ácido ascórbico e riboflavina.....	32
Tabela 3.1 – Parâmetros de otimização para a determinação de AA.....	45
Tabela 3.2 – planejamento fatorial 2^4 de quatro variáveis independentes e a codificação dos parâmetros: X1 - Volume de tampão: 200 (-) e 300 (+), X2 - Volume de PQC: 100 (-) e 200 (+), X3 – Concentração de NaCl: 0 mol L ⁻¹ (-) e 0,5 mol L ⁻¹ (+), e X4 -Concentração de íon cromo(VI):20 µg mL ⁻¹ (-) e 30 µg mL ⁻¹ (+).....	46
Tabela 3.3 – Parâmetros de otimização para determinação de RB.....	47
Tabela 3.4 – Planejamento fatorial 2^3 de três variáveis independentes e a codificação dos parâmetros: X1 - Volume de tampão: 200 (-) e 300 (+); X2 - Volume de PQC: 100 (-) e 200 (+); e X3 – Concentração de NaCl: 0 mol L ⁻¹ (-) e 0,5 mol L ⁻¹ (+).....	47
Tabela 3.5 – Parâmetros de otimização para a determinação de AA.....	51
Tabela 3.6 – Planejamento fatorial 2^4 de quatro variáveis independentes e a codificação dos parâmetros: X1 - Volume de tampão: 200 (-) e 300 (+), X2 - Volume de PQC: 100 (-) e 200 (+), X3 – Concentração de NaCl: 0 mol L ⁻¹ (-) e 0,5 mol L ⁻¹ (+), e X4 -Concentração de íon cromo(VI):20 µg mL ⁻¹ (-) e 30 µg mL ⁻¹ (+).....	52
Tabela 3.7 – Parâmetros de otimização para determinação de RB.....	52
Tabela 3.8 – Planejamento fatorial 2^3 de três variáveis independentes e a codificação dos parâmetros: X1 - Volume de tampão: 200 (-) e 300 (+); X2 - Volume de PQC: 100 (-) e 200 (+); e X3 – Concentração de NaCl: 0 mol L ⁻¹ (-) e 0,5 mol L ⁻¹ (+)	53
Tabela 4.1 – Dados do RQF dos PCs produzidos a partir precursores EDTA, tiosulfato de sódio e ureia variando o tempo de síntese pelo método assistido por micro-ondas.....	72
Tabela 4.2 – Planejamento fatorial 2^4 de quatro variáveis independentes e a codificação dos parâmetros: X1 - Volume de tampão: 200 (-) e 300 (+), X2 - Volume de PQC: 100 (-) e 200 (+), X3 – Concentração de NaCl: 0 mol L ⁻¹ (-) e 0,5 mol L ⁻¹ (+), e X4 -Concentração de íon cromo(VI):20 µg mL ⁻¹ (-) e 30 µg mL ⁻¹ (+).....	76
Tabela 4.3 – Planejamento fatorial 2^3 de três variáveis independentes e a codificação dos parâmetros: X1 - Volume de tampão: 200 (-) e 300 (+); X2 - Volume de PQC: 100 (-) e 200 (+); e X3 – Concentração de NaCl: 0 mol L ⁻¹ (-) e 0.5 mol L ⁻¹ (+).....	79
Tabela 4.4 – Resultado da ANOVA calculados para avaliação do modelo para AA.....	91
Tabela 4.5 – Resultado dos testes de falta de ajuste e significância de regressão.....	91
Tabela 4.6 – Resultado da ANOVA calculados para avaliação do modelo para RB.....	93
Tabela 4.7 - Resultado dos testes de falta de ajuste e significância de regressão.....	93

Tabela 4.8 – Resultados da precisão intermediária, por três semanas, avaliada para soluções do padrão de AA nas concentrações de 0,5, 5 e 20 mg L ⁻¹ ; n = 3.....	94
Tabela 4.9 – Resultados da precisão intermediária, por três semanas, avaliada para soluções do padrão de RB nas concentrações de 0,5, 3,5 e 5 mg L ⁻¹ ; n = 3.....	95
Tabela 4.10 – Recuperação de AA em suplementos vitamínicos líquidos e efervescentes de vitamina C (n=3)	96
Tabela 4.11 – Recuperação de RB em suplementos vitamínicos de farmácia de manipulação (n=3)	97
Tabela 4.12 – Teste t pareado para as amostras de AA, NC = 95 %.....	98
Tabela 4.13 – Teste t pareado para as amostras de RB, NC = 95 %.....	98
Tabela 4.14 – planejamento fatorial 2 ⁴ de quatro variáveis independentes e a codificação dos parâmetros: X1 - Volume de tampão: 200 (-) e 300 (+), X2 - Volume de PQC: 100 (-) e 200 (+), X3 – Concentração de NaCl: 0 mol L ⁻¹ (-) e 0,5 mol L ⁻¹ (+), e X4 -Concentração de íon cromo(VI):20 µg mL ⁻¹ (-) e 30 µg mL ⁻¹ (+).....	106
Tabela 4.15 – Planejamento fatorial 2 ³ de três variáveis independentes e a codificação dos parâmetros: X1 - Volume de tampão: 200 (-) e 300 (+); X2 - Volume de PQC: 100 (-) e 200 (+); e X3 – Concentração de NaCl: 0 mol L ⁻¹ (-) e 0.5 mol L ⁻¹ (+)	109
Tabela 4.16 - Resultado da ANOVA calculados para avaliação do modelo para AA.....	116
Tabela 4.17 – Resultado dos testes de falta de ajuste e significância de regressão.....	116
Tabela 4.18 – Resultado da ANOVA calculados para avaliação do modelo para RB	118
Tabela 4.19 – Resultado dos testes de falta de ajuste e significância de regressão.....	118
Tabela 4.20 – Resultados da precisão intermediária, por três semanas, avaliada para soluções do padrão de AA nas concentrações de 0,5, 5 e 20 mg L ⁻¹ ; n = 3.....	119
Tabela 4.21 – Resultados da precisão intermediária, por três semanas, avaliada para soluções do padrão de RB nas concentrações de 0,5, 2 e 4 mg L ⁻¹ ; n = 3.....	120
Tabela 4.22 – Recuperação de AA em suplementos vitamínicos líquidos e efervescentes de vitamina C (n=3)	121
Tabela 4.23 – Recuperação de RB em suplementos vitamínicos de farmácia de manipulação (n=3)	122
Tabela 4.24 – Teste t pareado para as amostras de AA, NC = 95 %.....	123
Tabela 4.25 – Teste t pareado para as amostras de RB, NC = 95 %.....	124

Lista de abreviaturas

AA – Ácido ascórbico

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ANOVA – Análise de variância

BR- Britton-Robinson

Cr(VI)- Íon cromo(VI)

DQ – Departamento de Química

FRET – Transferência de energia por ressonância de Förster, do inglês *Förster resonance energy transfer*

FT-IR – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

IFE – Efeito de filtro interno, do inglês *Inner Filter Effect*

IFSC/USP – Instituto de Física de São Carlos/ Universidade de São Paulo

LabMic/UFG – Laboratório de multiusuário de microscopia de alta resolução/ Universidade Federal de Goiás

NP-LACOM – Núcleo de Pesquisas em Combustíveis e Materiais

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

PQ – Pontos quânticos

PQC – Pontos quânticos de carbono

RB- Riboflavina

RQF – Rendimento quântico de fluorescência

TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão, do inglês *Transmission Electron Microscopy*

UV – Radiação ultravioleta

UV-Vis – Espectrometria Ultravioleta-Visível

XPS – Espectroscopia de Fotoelétrons por raios-X, do inglês *X-ray Photoelectron Spectroscopy*

XRD – Difração de raios-X, do inglês *X-Ray Diffraction*

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Objetivo geral	12
<i>1.1.1 Objetivos específicos</i>	12
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 Automedicação e controle de qualidade	15
2.2 Ácido ascórbico e riboflavina	16
2.3 Suplementos vitamínicos: ácido ascórbico e riboflavina	18
2.4 Nanociência e nanotecnologia	19
2.5 Pontos Quânticos de Carbono	21
<i>2.5.1 Propriedades ópticas dos pontos quânticos de carbono</i>	23
<i>2.5.1.1 Fenômeno da absorção molecular</i>	23
<i>2.5.1.2 Fluorescência dos PQC</i>	24
<i>2.5.1.3 Rendimento quântico de fluorescência</i>	25
<i>2.5.1.4 Mecanismo de sensor de fluorescência dos PQC</i>	26
2.6 Precursores EDTA, tiosulfato de sódio e ureia	28
2.7 Métodos de síntese dos PQC	30
<i>2.7.1 Síntese de PQC assistido por micro-ondas</i>	32
2.8 Caracterização da síntese dos PQC	33
2.9 Aplicações analíticas na determinação de ácido ascórbico e riboflavina	34
<i>2.9.1 Determinação de AA e RB em diferentes amostras</i>	35
3 EXPERIMENTAL	38
3.1 Descrição instrumental e medida de sinal analítico	38
3.2 Reagentes e soluções	40
<i>3.2.1 Reagentes</i>	40
<i>3.2.2 Preparo de soluções</i>	40
3.3 Limpeza de vidrarias	42
3.4 Amostras	42
<i>3.4.1 Amostras de AA</i>	42
<i>3.4.2 Amostras de RB</i>	43
3.5 Síntese e purificação dos PQC	43
3.6 Caracterização espectroscópica dos PQC	44
<i>3.6.1 Microscopia eletrônica de transmissão</i>	44
<i>3.6.2 Difração de raios X</i>	44
<i>3.6.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier</i>	44
<i>3.6.4 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X</i>	45

3.6.5	Potencial Zeta	45
3.6.6	Medidas espectrométricas	45
3.6.7	Rendimento quântico de fluorescência.....	46
3.7	Medidas realizadas no espectrofluorímetro Agilent	46
3.7.1	Otimização das condições analíticas	46
3.7.1.1	Estudo da variação da solução de íon cromo(VI).....	46
3.7.1.2	Estudo da variação de pH.....	47
3.7.1.3	Planejamento fatorial.....	47
3.7.1.4	Tempo de repouso das misturas	49
3.7.2	Curva analítica do método proposto.....	50
3.7.3	Validação do modelo linear.....	50
3.7.4	Precisão	50
3.7.5	Teste de recuperação	51
3.7.6	Sistema de detecção fluorescente.....	51
3.8	Espectrômetro Ocean Optics	52
3.8.1	Otimização das condições analíticas	52
3.8.1.1	Estabilidade do LED 370 nm	52
3.8.1.2	Planejamento fatorial.....	53
3.8.2	Curva analítica do método proposto.....	55
3.8.3	Validação do modelo linear	56
3.8.4	Precisão.....	56
3.8.5	Teste de recuperação	57
3.8.6	Sistema de detecção fluorescente.....	57
3.9	Estudos de seletividade	59
3.10	Estudo de estabilidade das nanopartículas	60
3.11	Equação do fenômeno de fluorescência das nanopartículas.....	60
3.12	Determinação de ácido ascórbico e riboflavina em suplementos vitamínicos	60
3.12.1	Preparo de amostras	60
3.12.2	Método de referência para a determinação de ácido ascórbico.....	61
3.12.3	Método de referência para determinação de riboflavina.....	62
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1	Sínteses e purificação dos pontos quânticos de carbono	64
4.2	Caracterização dos pontos quânticos de carbono	65
4.2.1	Microscópio eletrônica de transmissão	65
4.2.2	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X.....	67
4.2.3	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	69
4.2.4	Difração de raios X.....	70

4.2.5 Potencial Zeta	71
4.2.6 Propriedades ópticas dos PQC	72
4.2.6.1 Espectrofotometria de absorção UV dos pontos quânticos de carbono	72
4.2.6.2 Fluorescência molecular dos pontos quânticos de carbono	73
4.3 Rendimento quântico de fluorescência dos pontos quânticos de carbono	74
4.4 Medidas no espectrofluorímetro Cary Eclipse Agilent	76
4.4.1 Otimização dos parâmetros analíticos	76
4.4.1.1 Estudo do efeito do pH	76
4.4.1.2 Planejamento fatorial	78
4.4.1.3 Tempo de repulso da solução analítica	84
4.4.2 Mecanismo quenching de Fluorescência	86
4.4.3 Estudo da sensibilidade analítica do sensor PQC/Cr(VI)	89
4.4.4 Curva analítica	90
4.4.5 Validação do modelo linear	93
4.4.6 Precisão do método	97
4.4.7 Recuperação das amostras	98
4.4.8 Determinação de ácido ascórbico e Riboflavina em suplementos vitamínicos	100
4.4.9 Seletividade analíticas dos PQC/analito	101
4.4.10 Estabilidade dos pontos quânticos de carbono	105
4.5 Espectrômetro de fluorescência molecular Ocean Optics	106
4.5.1 Fonte de irradiação: LED em 372 nm	106
4.5.2 Otimização dos parâmetros analíticos	107
4.5.2.1 Efeito de diluição dos PQC	107
4.5.2.2 Planejamento fatorial	109
4.5.3 Curva analítica	115
4.5.4 Validação do modelo linear de AA e RB	118
4.5.5 Precisão do método	122
4.5.6 Recuperação das amostras	123
4.5.6 Determinação de ácido ascórbico e Riboflavina em suplementos vitamínicos	125
5 CONCLUSÃO	130

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a automedicação vem preocupando os profissionais de saúde devido à flexibilidade na compra de suplementos vitamínicos, antiparasitários e anti-inflamatórios em farmácias comerciais sem adequada vistoria (Santos; Albuquerque; Guedes; 2022; Sadio *et al.*, 2022). Dessa forma, a importância do controle de qualidade de medicamentos e suplementos vitamínicos tornaram-se imprescindível devido a necessidade de assegurar a integridade de seu princípio ativo desde a produção até o consumo pela população (Tiggeman, Limpi e Chaves, 2024). Conforme a resolução nº 98/2016, existem vários critérios que isentam a administração e compra de medicamentos sem prescrição médica, incluindo o tempo mínimo de comercialização, reações adversas, baixa toxicidade e não apresentar dependência medicamentosa (Anvisa, 2016). Portanto, o desenvolvimento de materiais utilizados na investigação e controle da qualidade do teor de medicamentos é de importância para população.

Um dos suplementos vitamínicos utilizados sem prescrição médica é o ácido ascórbico (AA). Conhecido popularmente como vitamina C, o AA é encontrado em produtos farmacêuticos suplementares, cosméticos e alimentos como vegetais e frutas frescas, polpas e sucos comerciais (Meng *et al.*, 2022). Além disso, é um excelente antioxidante que previne o envelhecimento e danos teciduais no corpo humano (Preethi *et al.*, 2022; Rose; Bode, 1993).

Outro suplemento vitamínico vendido sem prescrição médica é a riboflavina (RB). Conhecida popularmente com vitamina B2, a RB é uma substância solúvel em meio aquoso que desempenha um importante papel no sistema fisiológico dos seres humanos, mas é facilmente degradável quando exposto à luz ambiente (Wang *et al.*, 2015). Esses suplementos vitamínicos são utilizados para melhorar o sistema imunológico e combater os sintomas da COVID-19.

A nanotecnologia que é a aplicação dos materiais produzidos pela nanociência, representa uma complementação nas áreas de pesquisa pelo desenvolvimento de novos dispositivos e sistemas com propriedades e funções alternativas, baseados no rearranjo de estruturas atômicas em escala nanométrica (Bayda *et al.*, 2020). Os materiais nanométricos têm atraído a atenção dos pesquisadores que buscam novas alternativas para redução de recursos, em termos de energia e materiais, para produzir componentes que ofereçam produtos com alto potencial e baixo custo de fabricação, no caso, as nanopartículas (Corbett *et al.*, 2020).

O surgimento dos pontos quânticos (PQs), em 1980, revolucionou o uso de nanomateriais no campo científico e industrial devido as suas excelentes propriedades ópticas e eletrônicas e por possuírem formas e tamanhos controlados que podem ser aplicados no desenvolvimento de

fotodetectores, na produção de diodo emissores de luz, tecnologia de célula solar ou computação (Wagner *et al.*, 2019; Alaghmandfard *et al.*, 2021).

No entanto, em 2004, os pontos quânticos de carbono (PQC) foram descobertas acidentalmente durante processo de separação e purificação de nanotubos de carbono de parede simples pelo método eletroforético (Xu *et al.*, 2004). Esses nanomateriais são quase esféricos, com diâmetro inferior a 10 nm, e possuem propriedades ópticas e eletrônicas semelhantes aos pontos quânticos, mas distinguem no baixo custo de síntese, alta biocompatibilidade, solubilidade em água (Xu *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2022).

Essas nanopartículas demonstram um amplo potencial em aplicações incluindo sensores (Jia *et al.*, 2022), imagens (Atchudan *et al.*, 2021), medicamentos (Preethi *et al.*, 2022), fotocatalise (Han *et al.*, 2018) e diodos emissores de luz (Wang *et al.*, 2022). Além disso, a estratégia *on-off-on*, atribuída à supressão do efeito *quenching* (*on-off*) e retorno da fluorescência (*off-on*) dos PQC, tem sido amplamente utilizada na determinação de metais e moléculas devido à detecção simultânea, a seletividade e sensibilidade analíticas (Jia *et al.*, 2022).

As propriedades ópticas dos PQC são dependentes do tamanho e morfologia das nanopartículas, podendo exibir uma mudança no estado de superfície pela presença de grupos funcionais em sua estrutura. Esses grupos auxiliam o efeito do confinamento quântico e/ou efeito da hibridização pelas conjugações de ligações duplas entre átomos de carbono (Molaei, 2020; Yuan, *et al.*, 2016).

Os PQC produzem o efeito *quenching* como parâmetro quantitativo de sinal analítico de fluorescência. Baseado nesse efeito, os principais mecanismos *quenching* encontrados na literatura são: *quenching* dinâmico, *quenching* estático, efeito do filtro interno e transferência de energia ressonante Förster (Zu *et al.*, 2017).

Esses nanomateriais apresentam rotas de produção ambientalmente amigáveis mediante síntese a partir de recursos naturais como limão e cebola (Monte-Filho *et al.*, 2019), batata (Preethi *et al.*, 2022), resíduos de fruta *Myrica rubra* (Fan *et al.*, 2022). Bastante usual é a utilização de reagentes químicos como ácido cítrico e L-cisteína (Hamid *et al.*, 2023), N-(4-amino phenyl) acetamide e (2,3-difluoro phenyl) boronic acid (Xiao *et al.*, 2023) e DL-málico e levofloxacin (Zhao, *et al.*, 2022), entre outros, dos quais se conhece a concentração e pureza, aspectos que contribuem para o controle e reprodutibilidade da síntese.

Os precursores ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), tiosulfato de sódio e ureia são reagentes utilizados em diferentes sínteses descritas na literatura. Esses precursores possuem características distintas, mas auxiliam no deslocamento do comprimento de onda de

emissão e aumentam a intensidade de fluorescência, devido a funcionalização dos grupos orgânicos na síntese das nanopartículas (Saengsrichan *et al.*, 2022; Hu *et al.*, 2022a; Nugraha *et al.*, 2021).

A síntese de PQC pode ser realizada por dois métodos: *top-down*, que consiste da decomposição de precursores de estruturas maiores de carbono visando a obtenção de materiais de dimensões nanométricas por ablação a laser, oxidação química e descarga de arco-voltaico, e o método de síntese *bottom-up*, onde os PQC são sintetizados via polimerização e carbonização de precursores moleculares sob condições específicas, como hidrotermal, solvotermal, pirólise, micro-ondas e ultrassom (Kurian; Paul, 2021; Jonas; Pappas, 2021; Hebbbar, *et al.*, 2023).

O método assistido por micro-ondas vem ganhando popularidade devido à simplicidade no manuseio instrumental, baixo custo, baixa produção de impureza, sistema de segurança apropriado e tempo rápido de síntese, sendo adequado para precursores de carbono, incluindo resíduos alimentares e reagentes químicos (Nair *et al.*, 2020).

Vários PQC foram produzidos pelo método assistido por micro-ondas usando diferentes precursores, incluindo Kundu, Maity e Basu (2023), que produziram PQC a partir do bagaço de laranja para determinação de íon cromo(VI) e 4-nitrofenol em água de torneira e lago; Hao e colaboradores (2023) produziram PQC utilizando os precursores ácido cítrico e ureia na determinação íon mercúrio(II) e AA em amostra de comprimidos de vitamina C, empregando a estratégia *on-off-on*; Zhao e colaboradores (2022) desenvolveram PQC a partir dos precursores ácido málico e levofloxacin na determinação de íon ferro(III) e AA em amostra de água, baseada na estratégia *on-off-on*.

A caracterização dos PQC são fatores que evidenciam a existência de constituintes químicos, estrutura, morfologia e dimensão das nanopartículas (Das *et al.*, 2021). Esses fatores podem ser analisados por várias técnicas, incluindo a microscopia eletrônica de transmissão, difração de raios-X, espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X, espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier, potencial Zeta, e espectroscopia de absorção e fluorescência moleculares (John; Abraham; Mathew; 2022).

Até os dias atuais, diferentes métodos analíticos foram desenvolvidos para a determinação de teor de AA e RB em suplementos vitamínicos, incluindo espectrofotometria (Hu; Zhu; Zhao, 2021; El-malla *et al.*, 2022), eletroquímicas (Miller; Kristova; Patel, 2022), quimioluminescência (Iranifam *et al.*, 2022), eletroforese (Legrand *et al.*, 2020), cromatografia líquida de alta desempenho (Klimczak; Gliszczyńska-Świgło, 2015; Sim; Kim; Lee, 2016). No entanto, em comparação as técnicas citadas, a espectrofluorimetria é menos robusta para análise

de matrizes complexas do que a cromatográfica (Hamid *et al.*, 2023); mais confiável que eletroquímica (Pourmadadi *et al.*, 2023), mais sensível que espectrofotometria (Hamid *et al.*, 2023) e não utiliza um reagente de uso específico e de custo elevado como o luminol quando comparada à quimioluminescência (Iranifam *et al.*, 2022).

A espectrofluorimetria é uma técnica bastante empregada na química analítica, devido a sua precisão e reprodutibilidade, rapidez e sensibilidade, podendo ser aplicada na determinação do teor de AA e RB (Li *et al.*, 2023).

Algumas aplicações analíticas na determinação de AA e RB usando síntese de PQC por método assistido por micro-ondas. Por exemplo, Jia e colaboradores (2022) produziram PQC a partir dos precursores ácido L-tartárico, ácido cítrico e ureia para a determinação de AA em frutas usando a estratégia *on-off-on* com íon cromo(VI) que obtiveram um limite de detecção (LD) de 0,018 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Hamid e colaboradores (2023) sintetizaram PQC utilizando micro-ondas a partir dos precursores ácido cítrico e L-cisteína para a determinação de AA em vitamina C usando o sistema *on-off-on* com íon ferro(III), conseguindo um LD de 0,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Monte-Filho e colaboradores (2019) desenvolveram PQC a partir dos bioprecursores limão e cebola utilizando um micro-ondas de uso doméstico na determinação de riboflavina em medicamentos polivitamínicos, obtendo um LD de 0,001 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Assim, o uso de PQC surge como uma alternativa no desenvolvimento de um método rápido e de simples para a determinação de AA e RB em suplementos vitamínicos, sintetizados em etapa única a partir do método assistido por micro-ondas utilizando EDTA, tiosulfato de sódio e ureia.

1.1 Objetivo geral

Desenvolver um método analítico simples e rápido empregando pontos quânticos de carbono a partir dos precursores EDTA, tiosulfato de sódio e ureia para a determinação fluorimétrica de ácido ascórbico e riboflavina em suplementos vitamínicos.

1.1.1 Objetivos específicos

- ✓ Sintetizar os PQC a partir dos precursores EDTA, tiosulfato de sódio e ureia pelo método assistido por micro-ondas utilizando um equipamento de uso doméstico;
- ✓ Caracterizar as nanopartículas sintetizadas;

- ✓ Otimizar os parâmetros analíticos aplicando o planejamento fatorial 2^3 e 2^4 ; e o estudo univariado incluindo a concentração de íon cromo(VI), volume de PQC e tempo reacional;
- ✓ Comparar os resultados analíticos para ácido ascórbico e riboflavina obtidos em dois instrumentos de fluorescência, *Agilent* e *ocean Optics*;
- ✓ Validar e aplicar o método fluorimétrico desenvolvido para a determinação do teor de ácido ascórbico e riboflavina em suplementos vitamínicos utilizando as nanopartículas sintetizadas;
- ✓ Avaliar o desempenho analítico do método proposto em relação ao método de referência para AA e RB.

CAPÍTULO II **F**UNDAMENTAÇÃO **T**EÓRICA

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Automedicação e controle da qualidade

Atualmente, a automedicação vem preocupando os profissionais de saúde devido à flexibilidade na compra de suplementos vitamínicos, antiparasitários e anti-inflamatórios em farmácias comerciais sem adequada vistoria (Santos; Albuquerque; Guedes; 2022). A automedicação é definida como a administração de medicamentos, ervas ou remédios caseiros por indivíduos para auxiliar no tratamento intermitente ou contínuo de doenças ou alívio dos sinais e sintomas autorreconhecidos, anteriormente prescrito por um profissional ou sem qualquer orientação médica (Sadio *et al.*, 2021; Wegbom *et al.*, 2021; WHO, 2023).

Na resolução nº 98/2016, um medicamento pode ser isento de prescrição conforme enquadrados nos critérios de tempo mínimo de comercialização de 10 anos, no qual 5 anos no Brasil como medicamento sob prescrição e 5 anos no exterior como medicamento isento de prescrição; reações adversas com causalidade conhecidas e reversíveis; baixo potencial de toxicidade e baixo potencial de interação medicamentosa e alimentar; e não apresentar potencial dependência (Anvisa, 2016).

A importância do controle de qualidade de medicamentos e suplementos vitamínicos tornou-se imprescindível devido a necessidade de assegurar a integridade de seu princípio ativo desde a produção até o consumo pela população (Tiggeman, Limpi e Chaves, 2024). Estudo recentes sobre a fabricação e armazenamento inadequado de medicamentos podem acarretar degradação do princípio ativo, resultando em subprodutos que comprometem a qualidade do medicamento e ocasiona problemas graves de saúde e morte dos consumidores (Luchi *et al.*, 2024; Tiggeman, Limpi e Chaves, 2024).

O uso indiscriminado de medicamentos sem prescrição médica e controle de qualidade inadequado pode provocar hipersensibilidade, resistência bacteriana, distúrbios hematológicos, irritação e infecção na pele, insuficiência renal e cardíaca, diabetes e até mesmo resultar em óbito (Santos; Albuquerque; Guedes; 2022). Além disso, pode mascarar sinais e sintomas de doenças, causar dependência medicamentosa, provocar interações medicamentosas perigosas, erros na dosagem de administração, escolha incorreta de tratamento e dificultar o exame diagnóstico (Santos; Albuquerque; Guedes; 2022; Saha *et al.*, 2022).

O uso inadequado de medicamentos é influenciado pelas propagandas e *marketing* que incentivam o consumo de medicamentos, a persuasão de amigos e familiares devido à falta recursos econômicos do consumidor e à demora nos atendimentos médicos (Santos *et al.*, 2022).

Dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas do Brasil evidenciam que a intoxicação medicamentosa ocupa a primeira posição com 28,2 %, seguido de domissanitários (produtos de limpeza), 8,73 % e animais peçonhentos/escorpiões, 8,37 %, entre os demais agentes causadores de intoxicação, e o segundo lugar em óbitos no Brasil (SINITOX, 1999).

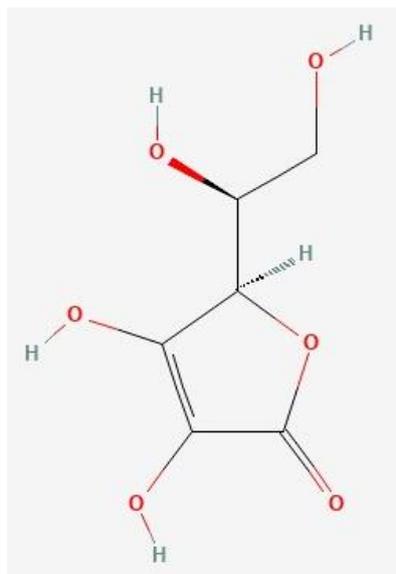
O controle de qualidade dos medicamentos inclui os suplementos vitamínicos, como ácido ascórbico e riboflavina, que necessitam de monitoramento constante para evitar a degradação e ingestão de concentrações inadequada pela população.

2.2 Ácido ascórbico e riboflavina

O ácido ascórbico, (2R)-2-[(1S)-1,2-dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxy-2H-furan-5-one, conhecido como vitamina C, é um pó cristalino branco, de sabor ácido, quase inodoro, utilizado na conservação de alimentos industrializados, possui fórmula molecular $C_6H_8O_6$ e massa molar $176,13 \text{ g mol}^{-1}$, solúvel em água, decompõe-se entre 189 a 193 °C (Gong *et al.*, 2017; Rose; Bode, 1993).

O AA foi isolado pelo cientista Albert Szent-Gyorgyi ao realizar estudos com glândulas suprarrenais, repolho e laranjas (Vannucchi; Rocha, 2012). A estrutura química do AA está representada na **Figura 2.1**.

Figura 2.1 – Estrutura química do ácido ascórbico.

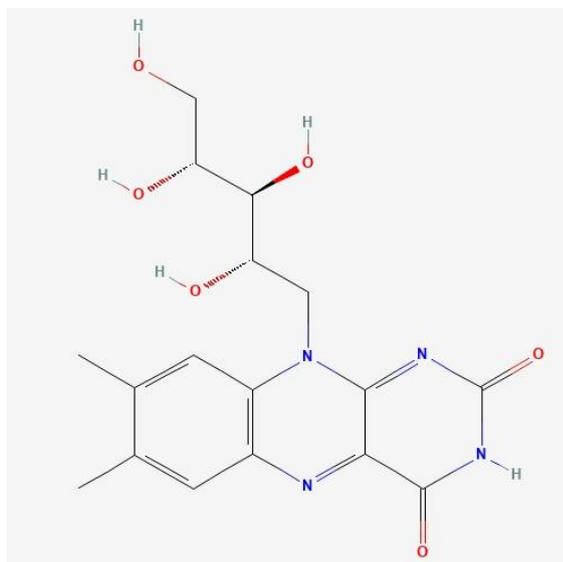


Trata-se de um composto hidrossolúvel com características redutoras, encontrado em frutas, legumes e vegetais, principalmente. O AA é classificado como um antioxidante natural, pois possui baixo potencial de redução, sendo capaz de reagir com radicais livres presentes no organismo, como superóxidos, hidroperoxilas, hidroxilas e óxido nítrico (Vidal; Freitas, 2015). Segundo a Anvisa, a ingestão recomendada de vitamina C para adultos é de 45 mg/dia.

A riboflavina, 7,8-dimetil-10-(1'-D-ribitol)isoaloxazina, conhecida como vitamina B2, é um pó cristalino amarelo-laranja, de sabor amargo e odor leve, utilizada como corante alimentar, possui fórmula molecular $C_{17}H_{20}N_4O_6$ e massa molar $376,37 \text{ g mol}^{-1}$, moderadamente solúvel em água, relativamente estável ao calor e à oxidação (Suwannasom *et al.*, 2021; Monte-Filho *et al.*, 2019). Segundo a Anvisa, a ingestão recomendada de vitamina B2 para adultos é de 1,3 mg/dia.

A RB ocorreu em 1879 foi isolada pela primeira vez pelo químico inglês A. Wynter Blyth, em 1879 ao extrair um pigmento amarelo encontrado no leite (Suwannasom *et al.*, 2021). A estrutura química da RB está representada na **Figura 2.2**.

Figura 2.2 – Estrutura química da riboflavina.



Fonte: Pubchem, 2024.

A RF é uma molécula com sensibilidade elevada à luz, principalmente em soluções alcalinas, onde é mais solúvel, degradando-se em um composto denominado lumiflavina (Massey, 2000). No sistema fisiológico, a RF é fosforilada intracelularmente para flavina mononucleotídeo e posteriormente metabolizada para flavina adenina dinucleotídeo, que desempenham um papel fundamental como cofatores no metabolismo energético e são

necessários para a função da coenzima em inúmeras reações de oxidação e redução nos seres vivos (Suwannasom *et al.*, 2021).

2.3 Suplementos vitamínicos: ácido ascórbico e riboflavina

Na RDC nº 242/2018 consta-se a diferença dos termos medicamento específico de suplemento alimentar e vitamínicos. Dessa forma, os medicamentos específicos são produtos à base de vitaminas, minerais e aminoácidos quando utilizando para fins terapêuticos, e suplementos alimentares são produtos farmacêuticos com a finalidade de suplementação na alimentação de indivíduos saudáveis (Anvisa, 2018). Geralmente, administrados sem prescrição médica.

Um dos suplementos vitamínicos utilizados sem prescrição médica é o ácido ascórbico. Conhecido popularmente como vitamina C, o AA é encontrado em produtos farmacêuticos suplementares, cosméticos e alimentos como vegetais e frutas frescas, polpas e sucos comerciais (Meng *et al.*, 2022).

A vitamina C é um eficiente agente redutor que neutraliza a ação de radicais livres no corpo humano, devido a sua excelente capacidade antioxidante que diminui o envelhecimento e previne danos teciduais gerados por espécies reativas de oxigênio e metabólitos carcinógenos (Preethi *et al.*, 2022; Rose; Bode, 1993).

Segundo Hamid e colaboradores (2023), o AA foi usado contra o coronavírus SARS-CoV-2, durante a pandemia da COVID 19, com o intuito de melhorar o sistema imunológico pelo aumento da produção de linfócitos e neutrófilos no organismo humano e, em altas concentrações de AA, estimular a fagocitose do vírus em meio intracelular e diminuir o estresse oxidativo grave em pacientes infectados.

O AA tem um importante papel na produção de colágeno e neurotransmissores, incluindo a norepinefrina, além de atividades metabólicas que auxiliam no desenvolvimento humano (Preethi *et al.*, 2022). Contudo, seu excesso pode causar cálculo renal, diarreia, sangramento estomacal e anemia (Fan *et al.*, 2022).

Outro suplemento vitamínico vendido sem prescrição médica é a riboflavina (RB). Conhecida popularmente como vitamina B2, a RB é uma substância solúvel em meio aquoso que desempenha um importante papel no sistema fisiológico dos seres humanos, mas é facilmente degradável quando exposto à luz ambiente (Wang *et al.*, 2015).

A RB não pode ser sintetizada pelo corpo humano, mas pode ser encontrada em produtos farmacêuticos e em alimentos como peixe, leite e derivados, fermento, nozes, arroz, algumas frutas e vegetais verdes (Suwannasom, *et al.*, 2020). A RB desempenha um papel importante

no sistema fisiológico do corpo humano, como auxiliar na produção de hemoglobina, transportador de hidrogênio no metabolismo de lipídios, proteínas e carboidratos, reparo de ácido nucleico e processos ligados ao sistema respiratório (Monte-Filho *et al.*, 2019; Calam, 2021).

Ragan e colaboradores (2020) descrevem em sua pesquisa que utilizaram a RB e irradiação sob luz ultravioleta para reduzir a quantidade do patógeno SARS-CoV-2, no tratamento de transfusão de sangue, mantendo a qualidade do material sanguíneo.

A falta de RB pode causar câncer, fadiga, retardo no crescimento em crianças, problemas digestivos, distúrbios hematológicos, danos oxidativos nos tecidos, deficiências congênitas durante a gravidez, anemia hipocrômica (Monte-Filho *et al.*, 2019; Suwannasom *et al.*, 2020; Calam, 2021). Sua ingestão em altas concentrações pode causar danos oxidativos na pele, degradação do DNA e aumento da formação de peróxidos lipídicos (Zhou *et al.*, 2021).

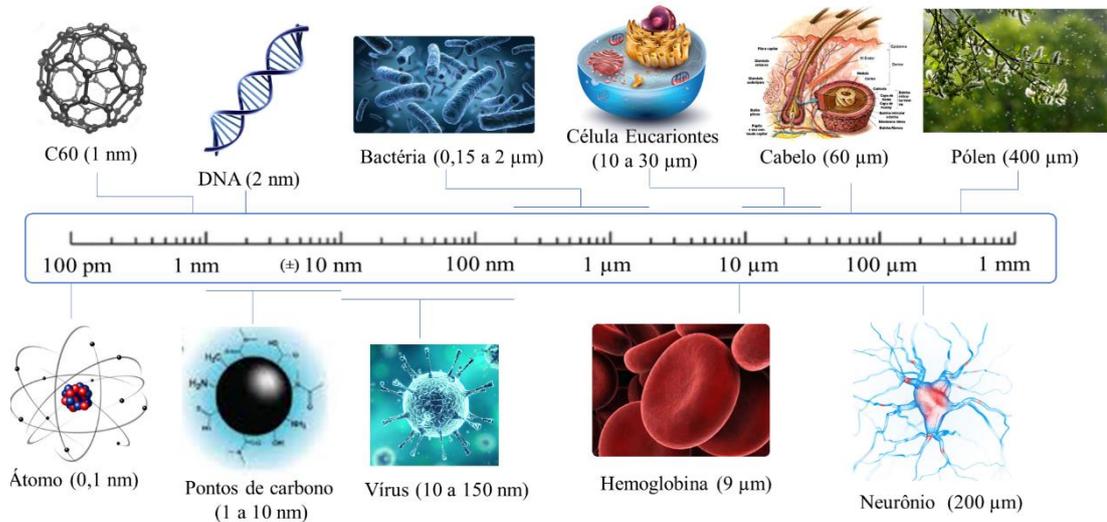
Na RDC n° 269/2005, consta-se o regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada de proteínas, vitaminas e minerais pela população, no qual para AA é recomendado a ingestão de 45 mg e RB de 1,3 mg para adultos e, 30 mg e 0,5 mg em crianças, respectivamente.

Nesse contexto, é necessário o delineamento de estratégias para o controle da automedicação, onde destaca-se a prevenção e o monitoramento da qualidade do teor de AA e RB em suplementos vitamínicos ingeridos pela população. Dessa forma, a aplicação de nanotecnologia vem sendo aprimorado utilizando materiais de baixo custo e fácil aquisição para o auxílio da população.

2.4 Nanociência e nanotecnologia

A nanociência é o estudo do fenômeno e a manipulação de materiais em escala atômica, molecular e macromolecular (Bayda *et al.*, 2020; Menezes *et al.*, 2011). A nanotecnologia é o design, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas de controle de formas e tamanhos na faixa de nanômetros, que corresponde à escala de 1 a 100 nm (Dosekova *et al.*, 2017; Menezes *et al.*, 2011). Diferentes nanomateriais encontrados na literatura, como o fulereno e os pontos quântico de carbono, são comparados com outros materiais de maior dimensão na **Figura 2.3**.

Figura 2.3 – Comparação do tamanho de nanomateriais em escala de 100 pm a 1 mm.



Fonte: adaptado de Bayda *et al.*, 2020.

No século 4 d.C. em Roma, ocorreu a construção do copo de Lycurgus considerado como um dos principais nanomateriais empregando nanopartículas em vidro dicróico. Este material exibe dois tipos diferentes de vidro que mudam de coloração do verde para o vermelho-púrpura, em determinadas condições de iluminação (Bayda *et al.*, 2020).

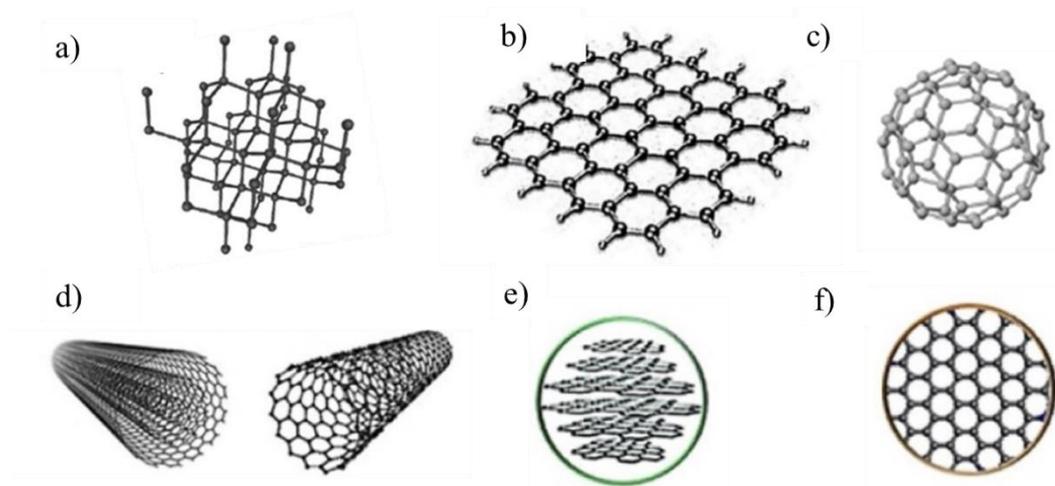
Os conceitos de nanociência e nanotecnologia foram descritos pelo físico americano e laureado ao prêmio Nobel em 1965 Dr. Richard P. Feynman durante uma palestra intitulada “*There is plenty of room at the bottom*” no instituto de tecnologia da Califórnia em 1959 (Menezes *et al.*, 2011). Contudo, o emprego da nanotecnologia foi destinado ao professor e pesquisador japonês Norio Taniguchi em 1974 que usou para explicar o processamento de materiais com precisão em nanômetros por usinagem ultrafina (Corbett *et al.*, 2000).

A real descoberta da nanociência foi em 1981, quando os físicos Gerd Binnig e Heinrich Rohrer inventaram o microscópio de tunelamento por varredura (do inglês *Scanning Tunneling Microscope*) com capacidade de visualizar átomos e moléculas na superfície de substâncias sólidas, habilitando o emprego da nanotecnologia. (Dosekova *et al.*, 2017; Bayda *et al.*, 2020).

O americano K. Eric Drexler foi responsável por popularizar o conceito e o termo nanotecnologia no livro “*Engines of creation*” publicado em 1986, evidenciando a manufatura de estruturas moleculares em nanômetros pela abordagem *bottom-up*, produção de nanopartículas por métodos físicos e químicos pela manipulação controlada de automontagem de átomos e moléculas (Bayda *et al.*, 2020; Corbett *et al.*, 2000).

Atualmente a nanotecnologia abrange uma família de nanomateriais, incluindo fulereno, grafeno e seus derivados (Kroto *et al.*, 1985), nanotubos de carbono (Lijima, 1991), nanodiamante, pontos quânticos de carbono (Kolekar *et al.*, 2023), **Figura 2.4**, que exibem propriedades ópticas, eletrônicas, químicas e físicas notáveis, sendo aplicados no desenvolvimento de novas pesquisas no campo da ciência, diagnóstico, terapia, produção de materiais e sensores para o monitoramento da saúde humana e do meio ambiente (Zhu *et al.*, 2015; Dosekova *et al.*, 2017; Menezes *et al.*, 2011).

Figura 2.4– Representação esquemática das diferentes nanoestruturas dos nanomateriais de carbono: (a) nanodiamante; (b) grafeno; (c) fulereno; (d) nanotubos de carbonos; (e) pontos quânticos de carbono; (f) pontos quânticos de grafeno.



Fonte: adaptado de Sajid e Plotka-Wasyłka 2020; Zarbin *et al.*, 2013.

Devido à grande atenção voltada para a nanotecnologia, pesquisadores vêm buscando novos caminhos para redução de recursos, em termos de energia e materiais, para a produção de componentes que ofereçam produtos com potencial de aplicação e baixo custo de fabricação, no caso, os pontos quânticos de carbono (PQC) (Corbett *et al.*, 2000).

2.5 Pontos Quânticos de Carbono

Os pontos quânticos (PQ), conhecidos como semicondutores nanocristalinos, foram descobertos em 1980 por Brus, Bawendi e Ekimov pela Sociedade Óptica da América (do inglês *Optical Society of America*) no qual foram laureados com o Prêmio Nobel de Química em 2023 (Ekimov; Onushchenko, 1982). Suas propriedades ópticas e eletrônicas exibem dependência na distribuição morfológica e no tamanho dos PQ, e vêm sendo aplicadas em diagnósticos e tratamentos clínicos via imagem celular, além do emprego em fotodetectores, produção de

diodo emissor de luz (do inglês *light-emitting diode* - LED), tecnologia de célula solar ou computação (Wagner *et al.*, 2019; Alaghmandfard *et al.*, 2021).

As vantagens dos PQ incluem ótima intensidade e estabilidade luminescente, contudo, apresentam algumas limitações, incluindo reagentes caros, pobre biocompatibilidade, potencial risco a saúde e ao meio ambiente associado ao uso de metal, quando aplicados a metais de transição, em sua síntese (Machado *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2020). Portanto, a busca e o desenvolvimento de nanomateriais fluorescentes mais seguros e ambientalmente amigáveis tornou-se necessária para determinação de substâncias orgânicas, inorgânicas, poliméricas ou biológicas (Nair *et al.*, 2020).

Em 2004, os PQC foram descobertos acidentalmente durante processo de separação e purificação de nanotubos de carbono de parede simples por método eletroforético (Xu *et al.*, 2004) e, posteriormente, sintetizado por Sun e colaboradores (2006) empregando o método por ablação a laser.

Os PQC são nanopartículas fotoluminescentes quase esféricas com diâmetro inferior a 10 nm que possuem núcleos amorfos a nanocristalinos contendo, predominantemente, carbono grafitico com ligações π em carbonos sp^2 e apresentam sítios quimicamente reativos pela presença de oxigênio, nitrogênio e/ou grupos carboxílicos (Lim *et al.*, 2015; Hebbar *et al.*, 2023).

Essas nanopartículas possuem excelentes propriedades, incluindo solubilidade em água, estabilidade química, facilidade de síntese e funcionalização, resistência à fotodegradação, baixa toxicidade e biocompatibilidade, além de rendimento quântico 3,92 a 53,3 % e baixo custo de síntese (Jia *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021).

Os PQC possuem propriedades fluorescentes similares aos PQ de telúrio, mas diferem na coloração de fluorescência que, em alguns casos, está relacionada com controle do tamanho ou a presença dos grupos orgânicos na superfície das nanopartículas, e o largo espectro de fluorescência que, possivelmente, resulta de estruturas químicas não homogêneas (Zhu *et al.*, 2015). Portanto, os PQC são uma alternativa viável devido à capacidade de obter e separar diferentes tamanho de nanopartículas, a funcionalização de grupos orgânicos na superfície e a presença de heteroátomos que provocam mudanças nas propriedades das nanopartículas aumentando a solubilidade e exibindo diferentes colorações de fluorescência (Sun *et al.*, 2015), além das rotas de síntese simples, baixo custo, abundância de precursores e ambientalmente amigável (Hebbar *et al.*, 2023).

Atualmente, os PQC têm atraído bastante interesse dos pesquisadores devido suas propriedades físico-químicas possuírem amplo potencial para diferentes aplicações, incluindo

sensores (Jia *et al.*, 2022), imagens (Atchudan *et al.*, 2021), medicamentos (Preethi *et al.*, 2022), fotocatalise (Han *et al.*, 2018), controle de falsificação (Xu *et al.*, 2022) e LED (Wang *et al.*, 2022).

Em aplicações analíticas, os PQC são empregados na determinação de metais e compostos orgânicos em diferentes matrizes como alimentos, medicações e meio ambiente. Por exemplo, Kolekar e colaboradores (2024) produziram PQC a partir do pó da canela e adição de acetato de zinco na determinação de íons cromo(VI) e manganês(VII) em água de rio; Tang e colaboradores (2023) fabricaram PQC usando ácido ascórbico, rodamina B e melamina na determinação do corante carmim de índigo em águas de torneira e rio, suco e doce; e Hamid e colaboradores (2023) sintetizaram PQC utilizando equipamento micro-ondas com os precursores ácido cítrico e L-cisteína na determinação de AA em medicamentos usando o sistema *on-off-on* com íon ferro(III). Essas nanopartículas possuem propriedade óptica que devemos estudar e compreender sua interação fotoluminescente na determinação dos analitos. Para isso, o próximo tópico conterá as principais características da estrutura dos PQC.

2.5.1 Propriedades ópticas dos pontos quânticos de carbono

As propriedades ópticas dos PQC são caracterizadas pela absorção e emissão de radiação eletromagnéticas (Machado *et al.*, 2015). Essas propriedades dependem do tamanho e da morfologia das nanopartículas, efeito de superfície, efeito do confinamento quântico, presença de grupos funcionais nas nanopartículas como hidróxido, epóxido, carbonil e carboxil, e/ou efeito da hibridização pelas conjugações de ligações duplas entre átomos de carbono (Molaei, 2020; Yuan, *et al.*, 2016). Nesta seção, explicaremos as principais propriedades ópticas dos PQC encontradas na literatura.

2.5.1.1 Fenômeno da absorção molecular

O fenômeno de absorção molecular ocorre quando uma fonte de radiação incide numa molécula capaz de absorver uma quantidade de energia de modo a promover a transição do elétron entre os orbitais HOMO (do inglês, *Highest Occupied Molecular Orbital*) e LUMO (do inglês, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) (Vaz *et al.*, 2015). A maioria dos PQC exibem forte banda de absorção na região UV entre 230 nm e 320 nm e finaliza com uma estreita banda na região visível entre 400 nm e 750 nm (Zhu *et al.*, 2015; Ozyurt *et al.*, 2023). Segundo Nair e colaboradores (2020), acredita-se que a expansão da banda para a região visível é devido à funcionalização das nanopartículas.

O fenômeno de absorção molecular acontece em diferentes transições eletrônicas que estão vinculadas com os níveis de energia ocupados e desocupados (*) nos fluoróforos como π - π^* , n - π^* , σ - σ^* , n - σ^* e σ - π^* (Vaz *et al.*, 2015). Contudo, a principais transições discutadas na literatura sobre os PQC limitam-se as ligações C=C aromáticas de transição π - π^* entre 200 a 300 nm e ligações C=O ou C=N de transição n - π^* entre 300 e 400 nm, às vezes aparecendo bandas abaixo de 300 nm (Mintz *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2015). Ozyurt e colaboradores (2023) complementa que bandas maiores que 400 nm podem ser atribuídas aos estados de superfície de transição n - π^* .

Na fabricação de nanopartículas, a síntese e funcionalização podem alterar ou deslocar a banda de absorbância. Mintz e colaboradores (2021) produziram três diferentes tipos de nanopartículas: i) precursor de carbono em pó com ácido sulfúrico e ácido nítrico por método de combustão; ii) precursor ácido cítrico e ureia por método assistido por micro-ondas de uso doméstico; e iii) o-fenilenodiamina e ácido cítrico por método ultrassônico. Os pesquisadores constataram que diferentes sínteses podem altera os espectros de absorbância devido a presença de grupos orgânicos funcionalizados, o tamanho e morfologia das nanopartículas.

2.5.1.2 Fluorescência dos PQC

As propriedades ópticas associadas a emissão da fluorescência dos PQC podem ser alteradas pelo efeito do confinamento quântico, os defeitos de estados da superfície, efeito do tamanho quântico e existência de fluoróforo (Hallaji *et al.*, 2021).

Segundo Ozyurt e colaboradores (2023), o efeito do confinamento quântico surge do tamanho das nanopartículas em relação ao raios de Bohr do éxciton, distância média entre o elétron e o buraco. Dessa forma, quando as dimensões do sistema são menores que o raios de Bohr, o éxciton torna-se menos livre, provocando o aumento da energia entre a banda de valência e a banda de condução (*band gap*) correlacionando com a diminuição das nanopartículas (Viol *et al.*, 2011). Portanto, esse fenômeno desloca o espectro eletromagnético para a região do azul à medida que diminui o tamanho dos PQC.

Os defeitos de superfície dos PQC comportam-se como moléculas aromáticas com ligações sp^2 e sp^3 hibridizadas, exibindo múltiplas cores de emissão devido a presença de grupos orgânicos na superfície das nanopartículas que possuem diferentes níveis de energia e armadilhas emissivas (Zhu *et al.*, 2015; Lim *et al.*, 2015). Wei e colaboradores (2020) complementam que a variação do pH contribui para mudança do estado de superfície e os níveis de energia dos PQC entre os orbitais HOMO e o LUMO.

O efeito do tamanho quântico consiste na variação dos defeitos na superfície dos PQC e suas diferentes armadilhas emissivas que produzem o fenômeno da fluorescência (Molaei, 2020; Zhu *et al.*, 2015). Esses defeitos são dependentes das armadilhas emissivas observadas no HOMO-LUMO que variam conforme a produção do tamanho dos fragmentos de grafeno (Zhu *et al.*, 2015).

O efeito da existência de fluoróforo está relacionada com a presença de moléculas de fluoróforo que se ligam a estrutura dos PQC para emitirem fluorescência após o processo de síntese (Hallaji *et al.*, 2021). Segundo Zhu e colaboradores 2015, os fluoróforos são formados em temperatura ambiente, à medida que aumenta a temperatura de carbonização, ocorre a desidratação das moléculas e o consumo de fluoróforo para a formação do núcleo de carbono que exibem forte emissão de fluorescência.

Para complementar o fenômeno de fluorescência, cada síntese produzida contém diferentes intensidades dependentes do tempo de síntese, concentração dos reagentes, temperatura entre outras condições utilizadas. Logo, é necessário a investigação do rendimento quântico de fluorescência para distinguir a intensidade do fenômeno de fluorescência de cada mistura de PQC.

2.5.1.3 Rendimento quântico de fluorescência

O Rendimento quântico de Fluorescência (RQF) dos PQC é a relação entre número de fótons emitidos com o número de fótons absorvidos (Lakowicz, 2006). O elevado RQF é explicado pela presença de grupos orgânicos, incluindo aminas e ácidos carboxílicos, na superfície dos PQC (Machado *et al.*, 2015). Além disso, o RQF é dependente da rota de síntese para formação das nanopartículas, podendo aumentar a fotoluminescência e a solubilidade em água (Zhu *et al.*, 2015).

O RQF de cada material sintetizado foi medido correlacionando os valores obtidos de absorvância e de intensidade de fluorescência dos PQC com os valores obtidos de padrão de referência de sulfato de quinina (Lakowicz, 2006; Preethi *et al.*, 2022). O RQF é calculado conforme Equação 2.1.

$$\Phi_u = \Phi_s \left(\frac{A_u}{A_s} \right) \times \left(\frac{\eta_u}{\eta_s} \right)^2 \quad (2.1)$$

Onde Φ é o rendimento quântico de fluorescência molecular; u representa os PQC sintetizados; s o padrão de referência de sulfato de quinina em meio ácido; A é a inclinação da curva entre os valores da área integrada do espectro de emissão de fluorescência *versus* a absorvância no λ

máx.exc. = 390 nm, e η representa o índice de refração do solvente, onde η_u e η_s possuem valores de 1,33 (Li *et al.*, 2023).

Os fenômenos de fluorescência são empregados para compreender os processos de emissão dos PQC. Contudo, o efeito de interação das nanopartículas com o analito podem ser identificadas pelo mecanismo de fluorescência dos PQC.

2.5.1.4 Mecanismo de sensor de fluorescência dos PQC

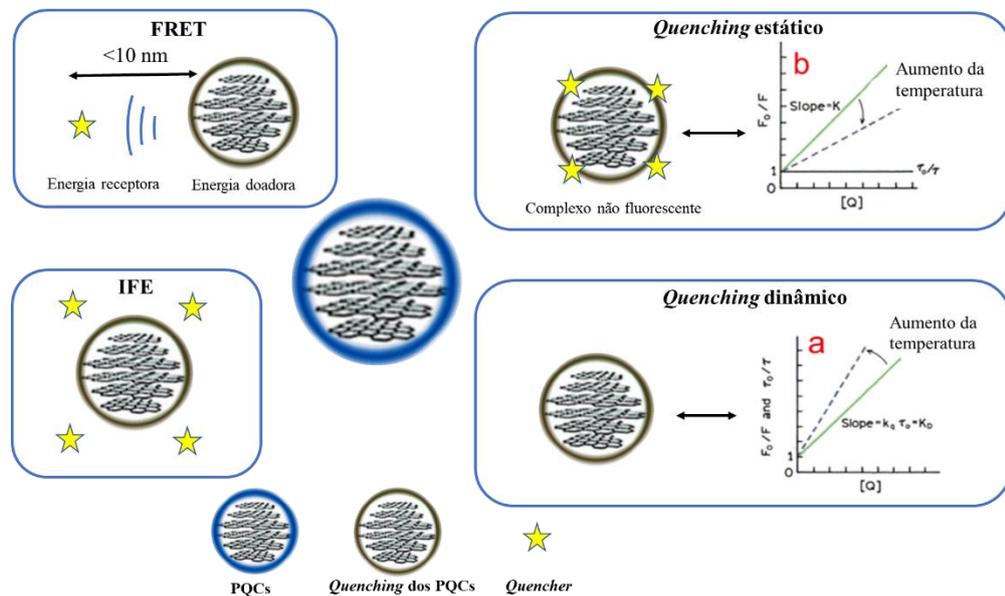
Os PQC possuem diferentes tipos de grupos funcionais capazes de interagir de forma seletiva com diferentes analitos por efeito *quenching*. Esse efeito é caracterizado quando o analito, denominado *quencher*, interage com uma substância fluorescente do modo a suprimir a intensidade do sinal de fluorescência quando expostos à radiação UV (Zu *et al.*, 2017). Portanto, uma investigação no comportamento da fluorescência dos PQC possibilita desvendar o tipo de mecanismo *quenching* que ocorre no meio reacional.

Em aplicações analíticas, o efeito *quenching* pode ser identificado pela estratégia de fluorescência denominada *on-off*, que resulta da extinção de fluorescência. No entanto, a estratégia *off-on*, que resulta da supressão do efeito *quenching*, ocorre a partir de espécies químicas que interagem com sensor PQC/metal para restaurar a fluorescência dos PQC (Jia *et al.*, 2022; Hu *et al.*, 2022b).

A união dessas estratégias de fluorescência, *on-off-on*, que consiste do uso de dois analitos, no qual um analito causa a extinção da fluorescência formando um possível complexo e um outro analito promove a recuperação da fluorescência pelo processo de oxirredução ou quebra do complexo (Tammina; Yang, 2020). Esse processo pode ser aplicado em alguns analitos, a exemplo de Wang e colaboradores (2024) que produziram PQC a partir dos precursores glicose, etilenodiamino e ácido sulfúrico pelo método por ultrassom, aplicado na determinação de íon cobre(II) pela estratégia *on-off* e glutamina pela estratégia *on-off-on* em amostras de soro humano.

Os principais mecanismos *quenching* encontrados na literatura utilizando o efeito *quenching*, são: *quenching* dinâmico, *quenching* estático, efeito do filtro interno (do inglês *Inner Filter Effect*- IFE) e transferência de energia ressonante Förster (do inglês *Förster Resonance Energy Transfer*- FRET) (**Figura 2.5**).

Figura 2.5 – Principais mecanismos *quenching* aplicados em química analítica.



Fonte: adaptado de Zu *et al.*, 2017.

O mecanismo *quenching* dinâmico consiste do retorno do estado excitado para o estado fundamental após a colisão do *quencher* e o PQC ocasionando a transferência de energia ou carga. Esse mecanismo é investigado utilizando a equação *Stern-Volmer* (K_{sv}) (2.2), mudança no tempo de vida da fluorescência e aumento da intensidade pelo aumento da temperatura do sistema (Zu *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2022b).

O mecanismo *quenching* estático ocorre quando a interação do *quencher* e PQC resulta na formação de um complexo não fluorescente no estado fundamental (Xu *et al.*, 2022). Nesse mecanismo, a equação de *Stern-Volmer* (2.2) também é utilizada, contudo, não a mudança no tempo de vida de fluorescência e ocorre diminuição da intensidade pelo aumento da temperatura do sistema (Lakowicz, 2006; Zu *et al.*, 2017).

Segue a descrição da equação de *Stern-Volmer*:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] \quad (2.2)$$

Onde, F_0 e F representam a intensidade de fluorescência dos PQC na ausência e presença do analito; K_{sv} é a constante *quenching* de *Stern-Volmer*; e $[Q]$ é a concentração do analito.

O mecanismo IFE resulta da sobreposição espectral entre a banda de absorção do analito ou *quencher* e a banda de excitação ou emissão dos PQC (Zu *et al.*, 2017). Esse efeito é evidenciado pela aplicação da equação de *Parker* (2.3), constância do valor do tempo de vida

de fluorescência e análise da sobreposição do espectro de absorção do analito com o espectro de excitação ou emissão dos PQC (Zu *et al.*, 2017; Ji *et al.*, 2021).

Segue a descrição da equação de *Parker*:

$$\frac{F_{\text{cor}}}{F_{\text{obsd}}} = \frac{2,3dA_{\text{ex}}}{1-10^{-dA_{\text{ex}}}} 10^{gA_{\text{em}}} \frac{2,3sA_{\text{em}}}{1-10^{-sA_{\text{em}}}} \quad (2.3)$$

Onde, F_{obsd} é a intensidade da fluorescência observada, F_{cor} é a intensidade de fluorescência corrigida IFE; A_{em} e A_{ex} são as absorvâncias nos comprimentos de onda máximos de excitação e emissão em nm. s é a espessura em cm do feixe de excitação, g é a distância em cm entre a borda do feixe de excitação e a borda da cubeta, d é a largura da cubeta em cm.

O mecanismo FRET ocorre quando o espectro de emissão dos PQC, denominado doador, sobrepõe com o espectro de absorção do *quencher*, denominado receptor (Lakowicz, 2006). Segundo o mecanismo requer as seguintes condições: (i) efeito da sobreposição entre o espectro de absorção do receptor e o espectro de emissão do doador; (ii) a distância de 1 a 10 nm da interação dipolo-dipolo entre o doador e o receptor; (iii) a distância é calculada pela equação de *Förster* (Hu *et al.*, 2022b).

Segue a descrição das equações do mecanismo FRET para obter a distância entre a molécula aceptora e molécula doadora (r), e distância entre a constante de *Förster* (R_0) (2.5).

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (2.4)$$

$$R_0 = 0,2108 [K^2 * \phi * \eta_R^{-4} * J(\lambda)]^{\frac{1}{6}} \quad (2.5)$$

Onde, K^2 é o fator de orientação entre os dipolos de transição do doador e receptor, que geralmente corresponde a $2/3$. O índice de refração médium e o rendimento quântico da fluorescência do doador são representados por η e ϕ , e o valor de η , quando a medida é realizada no solvente água, é 1,33. $J(\lambda)$ é a integral de sobreposição do espectro de emissão, e $\varepsilon_A(\lambda)$ é a absorvidade molar do comprimento de onda do receptor. $F_D(\lambda)$ intensidade de emissão de fluorescência normalizada (Lakowicz, 2006).

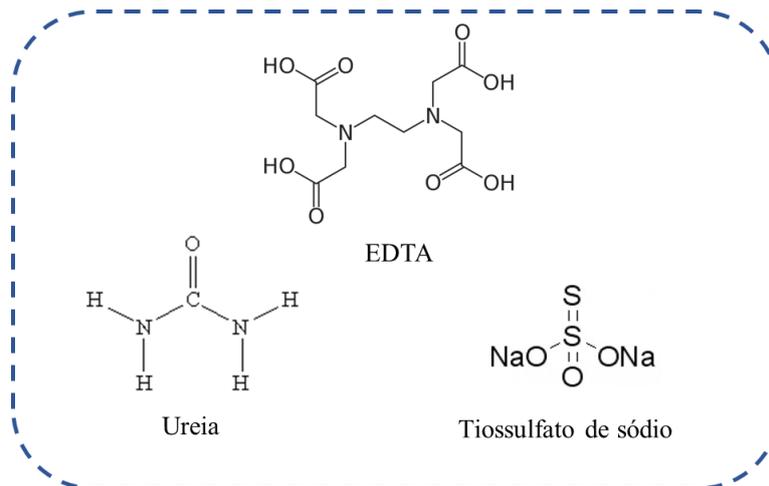
A importância do mecanismo está vinculada com as propriedades fluorescentes dos PQC, cujo a finalidade é maximizar as aplicações. Dessa forma, o uso de diferentes precursores na síntese dos PQC contribui para a intensidade de fluorescência e formação das nanopartículas.

2.6 Precursores EDTA, tiosulfato de sódio e ureia

Os três reagentes etilenodiaminotetraacético (EDTA), tiosulfato de sódio e ureia, **Figura 2.6**, foram utilizados em diferentes sínteses dos PQC descritas na literatura (Jeong *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2021; Saengsrichan *et al.*, 2022). Segundo Jeong e colaboradores (2021), o EDTA é um ligante quelante que possui alta afinidade na formação de complexos metal-EDTA e,

durante a síntese pelo método assistido por micro-onda, pode acelerar a formação das nanopartículas devido a sua estrutura molecular ramificada. Vale destacar que o uso do EDTA em maiores concentrações pode causar a alteração das propriedades ópticas de fluorescência produzindo PQC com emissão de coloração azul (Nugraha *et al.*, 2021).

Figura 2.6 – Precursores EDTA, tiosulfato de sódio e ureia



Fonte: própria do autor

A ureia possui um importante papel no processamento de proteínas e nas vias metabólicas humanas, além de desempenhar funções como fertilizante agrícola (Priyadarshini *et al.*, 2023). Na função de precursor, a ureia é uma substância rica em amina, podendo ser empregada na funcionalização das nanopartículas e formar grupos aminas ou amidas na superfície dos PQC (Hu *et al.*, 2022a). Além disso, segundo Yu e colaboradores (2021) a ureia pode alterar as propriedades ópticas de fluorescência ao deslocar a emissão para comprimento de onda maiores mudando a coloração dos PQC.

Segundo Escobar-Ledesma e colaboradores (2020) o tiosulfato de sódio é uma nova alternativa ecológica na aplicação de lixiviação, devido formação de complexos que adsorvem íons metálicos, como cádmio, mercúrio ou chumbo. Na síntese de PQC, o tiosulfato é capaz de aumentar o tamanho das nanopartículas reduzindo *band gap* e deslocando a emissão para comprimento de onda maiores (Saengsrichan *et al.*, 2022). Simões, Leitão e Silva (2017) complementam que os átomos de enxofre podem ajudar a aumentar o efeito de dopagem com nitrogênio através do efeito cooperativo que consiste de uma reação de redução do oxigênio por efeito catalítico que, possivelmente, aumentam os estados de superfície com nitrogênio.

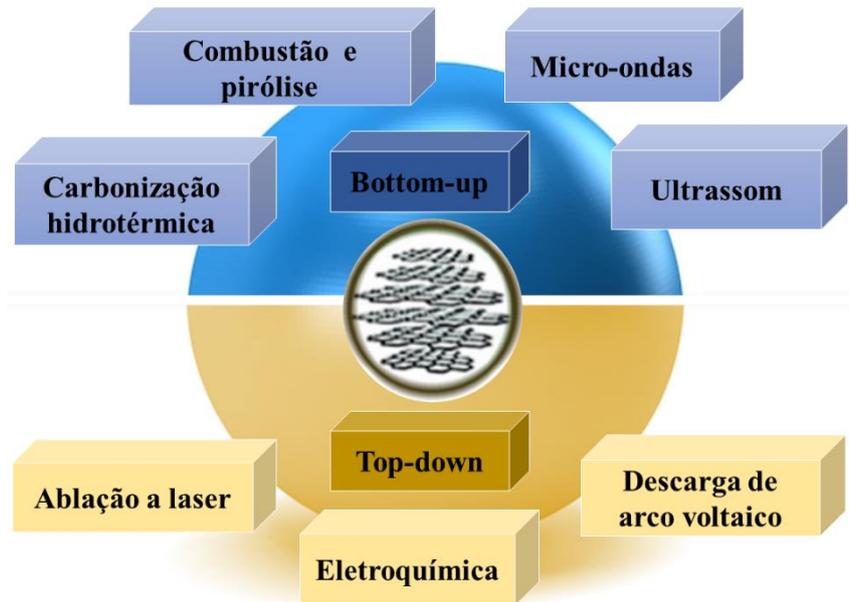
Contudo, esses fatores deveram ser rigorosamente estudados para minimizar as dúvidas sobre a aplicação desses precursores, que podem ser utilizados para melhorar a fluorescência durante a síntese dos PQC.

2.7 Métodos de síntese dos PQC

Os PQC são sintetizados utilizando precursores, que são reagentes puros, como ácido cítrico e L-cisteína (Hamid *et al.*, 2023), N-(4-amino fenil) acetamida e (2,3-difluoro fenil) ácido bórico (Xiao *et al.*, 2023); DL-málico e levofloxacina (Zhao, *et al.*, 2022); e glucosamina (Tammina; Yang, 2020), e bioprecursores que usam fontes naturais, como batata (Preethi *et al.*, 2022), wolfberry (Gu *et al.*, 2022), resíduos de fruta *Myrica rubra* (Fan *et al.*, 2022), limão e cebola (Monte-Filho *et al.*, 2019) e erva daninha (Bandi *et al.*, 2018). Esses materiais são bastante empregados na produção de nanopartículas devido à alta abundância, baixo custo, segurança no manuseio e capacidade de conversão de materiais de baixo custo em materiais úteis e valiosos para a pesquisa (Nair *et al.*, 2020).

Os materiais sintetizados são desenvolvidos por diferentes tipos de métodos de síntese, sendo classificado em duas rotas: i) *top-down*, que consiste da esfoliação ou quebra de estruturas moleculares com grande quantidade de carbono, como grafite, tubos de carbono, diamante ou grafeno, para formação de nanoestruturas por ablação a laser, oxidação eletroquímica ou descarga de arco voltaico; ii) *bottom-up*, que consiste da formação de nanomateriais a partir de pequenas moléculas orgânicas que sofrem desidratação, polimerização, carbonização e funcionalização sob condições adequadas, pelos métodos por combustão, pirólise, assistência por micro-ondas, carbonização hidrotérmica e ultrassom. (Ozyurt *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2023; Xu *et al.*, 2016). A **Figura 2.7** contém uma representação esquemática desses métodos de síntese.

Figura 2.7 – Diagrama esquemático da classificação das rotas de síntese, *top-down* e *bottom-up*, e os principais métodos de síntese de PQC.



Fonte: adaptado de Xu et al., 2016.

O método *top-down* possui poucas vantagens, incluindo a ampla produção de PQC e a formação de estrutura uniforme (Ozyurt *et al.*, 2023). No entanto, suas desvantagens incluem longos tempos de síntese, consumo de energia, reagentes caros, uso de instrumentos sofisticados e necessidade de funcionalização para melhorar as propriedades fotoluminescentes dos PQC (Machado *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016).

O método *bottom-up* é comumente aplicado e encontrado na literatura devido ao custo-benefício, curto tempo de síntese, amigável ambientalmente e permiti modificações na estrutura dos PQC (Hebbar *et al.*, 2023; Jorns e Pappas, 2021). A desvantagem desse método inclui a etapa de purificação do material sintetizado devido ao longo tempo de centrifugação e dialise para retirada dos resíduos em suspensão (Ozyurt *et al.*, 2023). Além disso, podem utiliza ácidos fortes, condições hidrotermais com alta pressão e equipamentos específicos (Machado *et al.*, 2015).

Tabela 2.1 – Principais características dos métodos de síntese.

Métodos sintéticos	Vantagens	Desvantagens	Referência
Eletroquímico	Tamanho controlável; alta pureza; alto RQF.	Complicadas etapas de síntese; requer funcionalização.	Kurian e Paul, 2021.
Ablação a laser	Rápido; produção de nanopartículas semelhantes ao material de partida.	Baixo RQF; alto consumo de energia; difícil controle sobre o tamanho das nanopartículas.	Singh <i>et al.</i> , 2019; Kurian e Paul, 2021.
Tratamento ultrassônico	Rápido; ambientalmente amigável; custo reduzido.	Baixo controle sobre o tamanho das nanopartículas; baixo RQF.	Wu <i>et al.</i> , 2019
Combustão	Instrumentação simples.	Baixo controle sobre o tamanho das nanopartículas; uso de ácido ou base fortes; baixo RQF.	Jorns e Pappas, 2021
Carbonização hidrotérmica	Baixo custo; simples; ambientalmente amigável.	Baixo controle sobre o tamanho das nanopartículas; alta pressão; requer autoclave.	Hallaji <i>et al.</i> , 2021
Pirólise	Alto RQF.	Longo tempo de síntese; uso de ácido ou bases fortes.	Jorns e Pappas, 2021

Fonte: própria do autor.

2.7.1 Síntese de PQC assistido por micro-ondas

A síntese assistida por micro-ondas é um método que consiste da irradiação micro-ondas sobre um material que, sob o efeito de aquecimento homogêneo, absorve a radiação eletromagnética de micro-ondas liberando calor (Nair *et al.*, 2020; Ng; Lim; Leo; 2021). As vantagens desse método são a transferência de calor sem usar um suporte de contato com o material, altamente eficiente, alto RQF, curto tempo de síntese, fácil manipulação, economia de energia, temperatura controlada dependente do instrumento, tamanho controlado, seguro, melhor reprodutividade e custo-benefício, contudo, é uma síntese não controlável (Kurian e Paul, 2021; Nair *et al.*, 2020; Monte-Filho *et al.*, 2019).

Até os dias atuais, vários PQC foram produzidos pelo método assistido por micro-ondas usando diferentes precursores, incluindo Kundu, Maity e Basu (2023) que produziram PQC a partir do bagaço de laranja na determinação de íon cromo(VI) e 4-nitrofenol em água de torneira e lago; Hao e colaboradores (2023) produziram PQC utilizando os precursores ácido cítrico e ureia na determinação íon mercúrio(II) e AA em amostra de comprimidos de vitamina C, empregando a estratégia *on-off-on*; Zhao e colaboradores (2022) desenvolveram PQC a partir dos precursores ácido málico e levofloxacin na determinação de íon ferro(III) e AA em amostra de água, baseada na estratégia *on-off-on*.

Mediante as características dos PQC desde a formação da nanopartícula e os processos que envolvem os fenômenos de absorvância e fluorescência e sua interação com diferentes analitos, existem outros aspectos que complementam o estudo das nanopartículas, no caso, identificar a morfologia e a existências de grupos e elementos na estrutura dos PQC.

2.8 Caracterização da síntese dos PQC

A caracterização dos PQC são fatores que evidenciam a existência de constituintes químicos, estrutura, morfologia e dimensão das nanopartículas (Das *et al.*, 2021). Esses fatores podem ser analisados por várias técnicas, incluindo a microscopia eletrônica de transmissão (do inglês *Transmission Electron Microscopy* - TEM), difração de raios X (do inglês *X-Ray Diffraction* - XRD), espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (do inglês *X-ray Photoelectron Spectroscopy* - XPS), espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* - FT-IR), potencial Zeta, e espectroscopia de absorção e fluorescência moleculares (John; Abraham; Mathew; 2022). Vale destacar que a espectroscopia de absorção e fluorescência moleculares foram descritas anteriormente.

A TEM avalia a distribuição do tamanho, a morfologia e o aglomerado de partículas em solução. Além disso, a alta resolução da análise por microscopia eletrônica de transmissão possibilita visualizar o espaçamento das franjas reticuladas em torno de 0,24 nm, denominada de rede cristalina (John; Abraham; Mathew; 2022).

A XRD é uma técnica não destrutiva que fornece informações elementares sobre o estado cristalino do material. A resposta exibida no difratograma de raios X auxilia na determinação da estrutura cristalina e amorfa baseada no alargamento da linha dos picos registrados no difratograma (Das *et al.*, 2021).

A espectroscopia FT-IR é uma técnica utilizada na identificação dos grupos funcionais na superfície das nanopartículas, baseada em medidas de absorção de radiação eletromagnética na região do infravermelho na faixa de 4.000 a 400 cm^{-1} (John; Abraham; Mathew; 2022). Essa técnica possibilita a identificação de grupos funcionais a partir do princípio de estiramento vibracional de ligações individuais ou grupos de ligações como carbonila, carboxila, hidroxila, amidas e aminas, tióis, alquilas, entre outras (Das *et al.*, 2021).

O XPS é uma técnica utilizada na identificação de elementos químicos presentes na superfície das nanopartículas, com o intuito de informar o estado eletrônico do material, a composição elementar, as propriedades de superfície e estado de oxidação (John; Abraham;

Mathew; 2022; Das *et al.*, 2021). Além disso, evidencia a funcionalização de superfície com e sem a presença de heteroátomos nas estruturas do PQC (John; Abraham; Mathew; 2022).

O potencial Zeta é uma técnica que diferencia as espécies químicas pela diferença de potencial elétrico do material em suspensão. Essa técnica pode verificar a carga na superfície das nanopartículas, a troca iônica, partículas coloidais estáveis no fluido e interações eletrostáticas entre partículas (Madadzadeh; Sadeghein; Riahi; 2020).

O uso da caracterização é fundamental na verificação da morfologia, identificação dos constituintes elementares e grupos orgânicos na estrutura dos PQC. Além disso, os PQC possuem podem ser aplicados em diferentes analitos, como ácido ascórbico e riboflavina encontrados em suplementos vitamínicos e disponíveis na maioria das farmácias comerciais para a população.

2.9 Aplicações analíticas na determinação de ácido ascórbico e riboflavina

Na literatura diferentes técnicas analíticas como análise em fluxo (Supharoek *et al.* 2022; Vishnikin *et al.*, 2018.), cromatografia líquida de alto desempenho (Azmi *et al.*, 2022), colorimetria (Alowakennu; Adams; Abdulwahab; 2022; Tikeshwari *et al.*, 2023.), eletroquímica (Cioates, 2020), quimioluminescência (Li; Zhou; Du; 2022.), são descritas e aplicadas na determinação de AA e RB em suplementos vitamínicos. Essas técnicas possuem vantagens e desvantagens instrumentais (**Tabela 2.2**).

Tabela 2.2 – Diferentes técnicas analíticas aplicadas na determinação de ácido ascórbico e riboflavina.

Métodos sintéticos	Vantagens	Desvantagens	Referência
Análise em fluxo	Minimiza erros operacionais, automático, redução de desperdícios, rápida análise, precisão e exatidão, e baixa contaminação.	Vários parâmetros de otimização do instrumento, tempo e habilidade de montagem, habilidade operacional, fabricação da câmara de mistura.	Supharoek <i>et al.</i> 2022; Vishnikin <i>et al.</i> , 2018.
Cromatografia em fase líquida de alto desempenho	Múltiplas determinações, sensibilidade, precisão, separação de compostos interferentes	Preparo de amostra, alto custo instrumental e longo tempo operacional	Azmi <i>et al.</i> , 2022
Colorimetria	Alta seletividade e sensibilidade, baixo custo e fácil manuseio.	Várias etapas para obtenção do sinal analítico.	Alowakennu; Adams; Abdulwahab; 2022; Tikeshwari <i>et al.</i> , 2023.
Eletroquímica	Sensibilidade e rápida resposta instrumental.	Fabricação do eletrodo modificado, oxidação do analito gera um filme polimérico no eletrodo	Cioates, 2020

Quimioluminescência	Seletividade, sensibilidade, simples etapa de mistura.	Uso de catalizador e reagente luminol caro.	Li; Zhou; Du; 2022.
---------------------	--	--	------------------------

Fonte: Adaptado de RATNAM *et al.*, 2020.

No geral, a maioria dessas técnicas apresentam algumas dificuldades experimentais devido ao custo-benefício, tempo de análise e habilidade operacional (Jia *et al.*, 2022; Msto *et al.*, 2022). Portanto, o avanço na tecnologia e a abordagem na determinação de analitos de matrizes complexas utilizando instrumentos com alta sensibilidade, seletividade e baixo custo tem atraído vários pesquisadores (Ansari; Masoum; 2021). Nesse caso, em comparação a essas técnicas analíticas, a fluorimetria é uma técnica convencional que possibilita estratégias de determinação analítica com algumas vantagens, incluindo baixo custo-benefício em comparação ao HPLC-MS/MS, não destrutível, fácil controle operacional, sensibilidade e seletividade analíticas (Preethi *et al.*, 2022; Xiao *et al.* 2023).

Essas vantagens são ideias para o emprego dos sensores fluorescentes capazes de obter sinais analíticos aplicados em amostras de suplementos vitamínicos, incluindo vitamina C e riboflavina disponível em farmácias comerciais da cidade de João Pessoa.

2.9.1 Determinação de AA e RB em diferentes amostras

A determinação de AA e RB em amostras utilizando o método assistido por micro-ondas pode ser empregado em um forno de micro-ondas doméstico ou convencional de laboratório (Ng; Lim; Leo; 2021). Por exemplo, Jia e colaboradores (2022) produziram PQC a partir dos precursores ácido L-tartárico, ácido cítrico e ureia pelo método assistido por micro-ondas para a determinação de AA em frutas usando a estratégia *on-off-on* com íon cromo(VI), obtendo um limite de detecção (LOD) de 0,018 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Hamid e colaboradores (2023) sintetizaram PQC utilizando equipamento micro-ondas científico com os precursores ácido cítrico e L-cisteína para a determinação de AA em medicamentos, usando o sistema *on-off-on* com íon ferro(III), obtendo-se um LOD de 0,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Lin e colaboradores (2021) produziram PQC a partir dos precursores ácido cítrico, cloreto de cobre(II) e nitrato de amônio usando um micro-ondas de uso doméstico na determinação de AA pela estratégia *on-off-on* frente ao íon ferro(III), em medicamentos, adquirindo um LOD de 0,001 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Monte-Filho e colaboradores (2019) desenvolveram PQC a partir dos bioprecursores limão e cebola utilizando um micro-ondas de uso doméstico na determinação de riboflavina em suplementos polivitamínicos, obtendo um LOD de 0,001 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Sotolongo-García e

colaboradores (2021) produziram PQC a partir dos precursores ácido cítrico e etilenodiamino pelo método assistido por micro-ondas científico empregando a fluorescência raciométrica na determinação de RB em amostras de bebidas e realização de teste de citocompatibilidade das células de câncer de mama, adquirindo um LOD de $0,009 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Na próxima etapa desta tese, serão descritos os instrumentos e os procedimentos de preparo das medidas com seus respectivos reagentes e as quantidades aplicadas para obter o sinal de fluorescência. Além disso, os parâmetros utilizados para o desenvolvimento dos métodos de referência, incluindo a titulação iodométrica e por HPLC-DAD, empregados nesta pesquisa.

CAPÍTULO III EXPERIMENTAL

3 EXPERIMENTAL

3.1 Descrição instrumental e medida de sinal analítico

Um forno de micro-ondas de marca Philco, modelo PMO25B e potência de 1.400 W, equipado com um frasco de Erlenmeyer com volume máximo de 250 mL contendo EDTA, tiossulfato de sódio e ureia foram utilizados na síntese dos PQC pelo método assistido por micro-ondas. A etapa de purificação e separação de partículas requereu a filtração prévia em papel de filtro qualitativo marca Unifil com diâmetro de 15 cm, uma centrífuga compacta HERMLE, modelo Z206A, com velocidade de rotação máxima de 6.000 rpm e diálise Pur-A-Lyzer™ com membrana de 3.500 MWCO e capacidade de 20 mL.

Na investigação da morfologia e do tamanho dos PQC foi utilizado a Microscopia Eletrônica de Transmissão equipado com EDS (do inglês, *Energy Dispersive Spectroscopy*) e detector da *Thermo Scientific NSS Spectral Imaging*, modelo JEM-2100, Jeol, Tokyo (Japão), disponível no LabMic/UFG, com resolução em 200 kV, tensão de aceleração de 200kV e 100kV, câmera Orius™ SC 1000 CCS, marca Gatan e feixe eletrônico por filamento de hexaborato de lantânio.

Para aquisição dos dados de difração de raios X foi empregado um difratômetro de raios X Shimadzu, modelo XRD 6000, disponível no LACOM/DQ/UFPB, equipado com radiação monocromática de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) operando a 30 kV. A medida foi registrada no intervalo de 10 e 90 θ e velocidade de varredura de 0,5 deg min^{-1} .

A identificação dos grupos funcionais presentes nos PQC foi realizada por espectroscopia de infravermelho em equipamento FT-IR Shimadzu, modelo IR Prestigie-21, disponível do LASOM, na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , utilizando-se pastilha de KBr.

A composição elementar dos PQC foi analisada por espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X, modelo Scienta-Omicron ESCA, disponível no IFSC/USP, equipado com monocromador, fonte de raios X, analisador hemisférico de alto desempenho e fonte de elétrons de baixa energia.

O potencial Zeta foi determinado em analisador Maveln, modelo Zetasizer nano ZSP, disponível do LCCQS/DQ/UFPB, equipado com dispersor dinâmico de luz, célula de 200 μL e eletrodo com capacidade máxima de 150 eV.

A distribuição do tamanho das partículas foi investigada com o auxílio do programa ImageJ®, versão gratuita.

Com relação à investigação das propriedades ópticas dos PQC e as medidas analíticas empregadas na determinação de AA e RB, foi utilizado um espectrofluorímetro 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 3 mL. Além desse instrumento, foi usado um espectrômetro portátil de fluorescência *Ocean Optics*, modelo USB 4000, com detector TCD1304AP, resposta de 200 a 1.100 nm e tempo de integração de 3,8 ms a 10 s, controlado pelo programa SpectraSuite versão 2.0.162 de 64 bit, utilizando-se como fonte de emissão um LED ultravioleta com emissão máxima em 370 nm, nas determinações analíticas.

Para registro dos espectros de absorção molecular foi utilizado o espectrofotômetro UV-Vis Hewlett-Packard, modelo 8453, equipado com cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico e capacidade volumétrica de 3 mL, disponível no LAQA/DQ/UFPB.

Para o método de referência da RB foi utilizado um instrumento de cromatografia líquida de alta definição de marca Dionex da série ultimate 3000 equipado com DAD (do inglês, *Diode-Array Detection*), bomba quaternária, coluna Acclaim™ 120 de C18 (120 Å, 4,6 mm x 150 mm, tamanho de partícula 5,0 µm), fluxo 0,3 mL min⁻¹, injeção de 10 µm e fase móvel: metanol e formiato de amônio, disponível no LAQA/DQ/UFPB.

A sonicação para homogeneização dos PQC foi realizada por cavitação em banho de ultrassônico, UNIQUE, 40 Hz, modelo USC-1800^a, disponível no LAQA/DQ/UFPB.

A secagem dos PQC foi realizada em estufa microprocessada Sterilifer, disponível no LAQA/DQ/UFPB.

O cálculo do planejamento fatorial 2³ e 2⁴ foi realizado utilizando a versão gratuita do programa Minitab.

Uma balança analítica Shimadzu modelo AY220, disponível no LAQA/DQ/UFPB, foi utilizada para as medidas de massas das substâncias sólidas utilizadas nos diferentes procedimentos.

As medidas de pH 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.

3.2 Reagentes e soluções

3.2.1 Reagentes

- Analito: ácido ascórbico 99,0 % (Nuclear, Brasil) e riboflavina 98,5 % (Sigma-Aldrich, Brasil);

- Reagente supressor: dicromato de potássio 98,0 % (Sigma-Aldrich, Brasil);

- Solução-tampão: ácido bórico 99,5 % (Dinâmica Ltda, Brasil), ácido acético 99,7 % e ácido fosfórico 85,0 % (Neon, Brasil); o pH foi ajustado com hidróxido de sódio 98,0 % (Dinâmica Ltda, Brasil).

- Síntese: EDTA dissódico 99,0 % (Ecibra, Brasil), tiosulfato de sódio 99,5 % e ureia 99,5 % (Merck, Brasil).

- Substâncias interferentes: cloreto de ferro(III) hexahidratado 98,0 %, tiamina 99,0 %, L-isoleucina 98,0 %, L-prolina 99,0 %, ácido glutâmico 98,5 %, L-alanina 98,0 %, guanina 98,0 %, L-histidina 98,0 %, L-cistina 97,0 %, L-leucina 98,0 %, L-lisina 98,0 % e L-tirosina 98,0 %, ácido pantotênico 98,0 %, biotina 99,0 % (Sigma-Aldrich, Brasil); cloreto de manganês 99,0 %, cloreto de cálcio 99,0 %, D(+)sacarose 99,0%, ácido tartárico 99,0 %, ácido cítrico 99,5 % e glicose 99,5 % (Vetec, Brasil); cloreto de cobalto(II) hexahidratado 98,0 %, bicarbonato de sódio 99,7 %, cloreto de sódio 99,0 % (Synth, Brasil); amido solúvel, sulfato de cobre(II) hexahidratado 98,0 %, cloreto de potássio 99,0 %, sulfato de ferro(II) heptahidratado 99,0 % (Neon, Brasil).

- Para a iodometria: iodato de potássio 99,5 % (Vetec, Brasil) e tiosulfato de sódio 99,5% (Merck, Brasil); ácido clorídrico 37,0 %, ácido sulfúrico 98,0 %, amido solúvel 99,8 % e iodeto de potássio 99,0 % (Neon, Brasil) e carbonato de sódio anidro 99,5% (Dinâmica Ltda, Brasil).

- Para o HPLC-DAD: acetato de amônio 97,0 % (ACS, Brasil); formiato de amônio 98,0 % e ácido fórmico 85,0 % (Neon, Brasil); Metanol grau HPLC (Carlos Erba reagentes, Brasil) e material de referência padrão de RB (Sigma Aldrich, Brasil).

- Para o rendimento quântico: sulfato de quinina com RQF de 54,0 % (Analítica, Brasil).

3.2.2 Preparo de soluções

A solução estoque de dicromato de potássio na concentração de 400 mg L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se uma massa de 20 mg do reagente em água ultrapura e elevada ao volume final em balão volumétrico de 50 mL. Após homogeneização, a solução foi armazenada sob refrigeração a 4 °C. As diluições a partir da solução estoque foram realizadas no dia da análise,

preparadas nos seguintes níveis de concentração: 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 70,0; e 80,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as soluções foram transferidas para recipientes de vidro âmbar.

A solução estoque de ácido ascórbico na concentração de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 40 mg do reagente em água ultrapura, elevada ao volume final em balão volumétrico de 100 mL e armazenada sob refrigeração a 10 °C. As diluições foram preparadas diariamente a partir da solução estoque nos seguintes níveis de concentração: 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 70,0; 80,0; 90,0 e 100,0 mg L^{-1} .

A solução-estoque de riboflavina na concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi preparada diariamente a partir da dissolução de 4 mg do reagente sólido em água ultrapura, elevada ao volume final em balão volumétrico de 100 mL. As diluições foram preparadas a partir da solução estoque nos seguintes níveis de concentração: 0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 3,50; 5,00; 7,00; e 9,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

As soluções-tampão Britton-Robinson (BR) na faixa de pH de 2 a 12 foram preparadas utilizando-se as misturas da solução de ácido bórico (H_3BO_3) 0,1 mol L^{-1} , solução de ácido acético ($\text{H}_3\text{C}_2\text{O}_2\text{H}$) 0,1 mol L^{-1} e solução de ácido fosfórico (H_3PO_4) 0,1 mol L^{-1} , sendo o pH ajustado com a solução de hidróxido de sódio 2 mol L^{-1} (Morita e Assumpção, 2007; Pinar et al., 2020).

O preparo da solução de tiosulfato de sódio 0,05 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 dissolução em balão volumétrico de 1.000 mL com água ultrapura fervida; após homogeneização e completa solubilização, a solução resfriada foi armazenada em vidro âmbar com tampa esmerilhada para evitar a formação de produtos secundários e ação bacteriana. Para a padronização da solução de tiosulfato de sódio 0,05 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 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; após homogeneização, a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 1 L e completado 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 dissolvendo-se 1 g de amido em 50 mL de água ultrapura fervente. Após resfriamento 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 do solvente acetato de amônio foi preparada dissolvendo-se 0,38 g do sólido em um litro de água ultrapura. A solução do material de referencia padrão de RB 40 mg L⁻¹ usada no HPLC foi preparada dissolvendo-se 4 mg do sólido em 100 mL da solução de acetato de amônio 10 mmol L⁻¹ pH 6,8.

A solução estoque para todas a sínteses foi preparada diluindo o material sintetizado em 20 mL de água deionizada.

A solução de trabalho de PQC sintetizados pelos métodos, assistido por micro-ondas foi preparada na proporção 0,5/10 (v v⁻¹) por adição de 100,0 µL da suspensão obtida na síntese em 1.900 µL de água ultrapura.

3.3 Limpeza de vidrarias

A descontaminação da vidraria foi realizada em duas etapas: i) lavagem prévia com detergente seguido da imersão em recipiente com água e detergente por 24 h. Após, o material foi enxaguado com água corrente; ii) todo material foi imerso por 24 h em solução Triton X-100 1 % (m v⁻¹) preparada com água destilada. Por fim, foi lavado com água ultrapura produzida por sistema Milli-Q Plus® (Milipore, Bedford, MA), com resistividade de 18,2 MΩ.cm a 25 °C.

3.4 Amostras

As três amostras líquidas e duas amostras efervescentes de comprimidos de AA foram compradas em diferentes farmácias na cidade de João Pessoa, Paraíba. As quatro amostras em cápsulas de RB foram adquiridas em diferentes farmácias de manipulação localizadas na cidade de João Pessoa, Paraíba.

3.4.1 Amostras de AA

Para a determinação de AA, em cada amostra líquida de AA 200 µg mL⁻¹ foi retirado uma alíquota de 500 mL e adicionado no balão de 500 mL. Após homogeneização, a solução foi novamente diluída em um Eppendorf de 2,0 mL até conter uma concentração estimada em 10 µg L⁻¹.

Nas amostras de comprimidos efervescentes de AA, cada amostra de 1 g foi diluída em um balão de 500 mL com água ultrapura. Após homogeneização, a solução foi novamente diluída em um Eppendorf de 2,0 mL até conter uma concentração estimada em 10 µg L⁻¹.

Vale destacar que todas as amostras de AA foram medidas em replicatas.

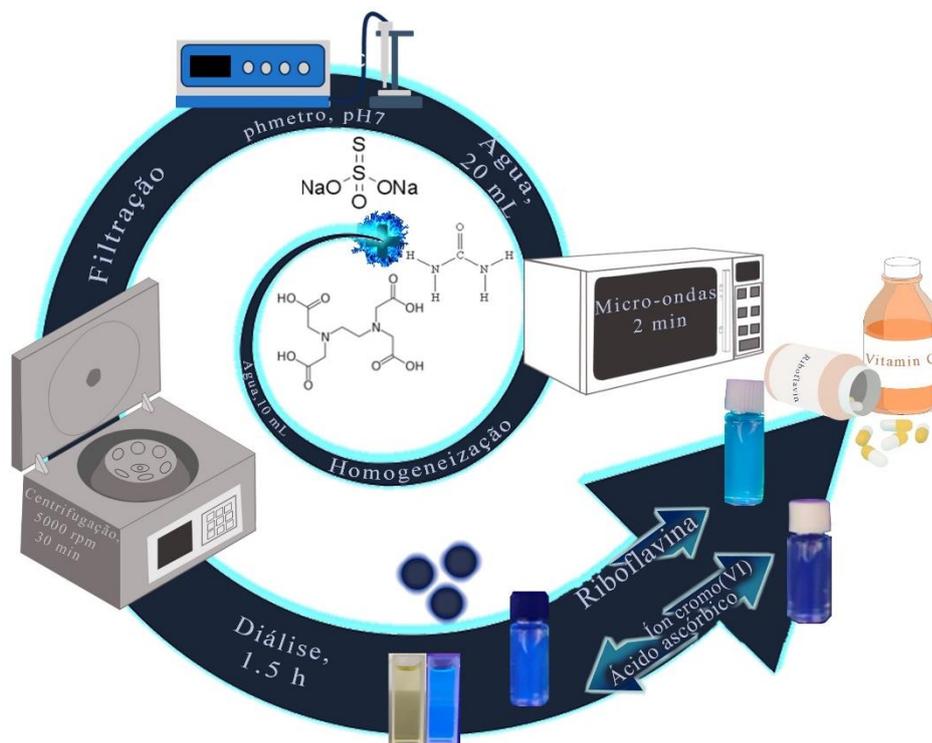
3.4.2 Amostras de RB

O procedimento das amostras de RB foi adaptado de Monte e colaboradores (2019), onde cinco comprimidos foram homogeneizados em um béquer, após, foram adicionadas 100 mL de água ultrapura, homogeneizados e submetidos à cavitação por 10 min em ultrassom. Após filtração, foram transferidos para balão de 250 mL e completado com água ultrapura. Então, a mistura foi diluída em um Eppendorf de 2,0 mL para conter uma concentração estimada de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$. Todas as amostras foram medidas em replicatas.

3.5 Síntese e purificação dos PQC

Os PQC foram produzidos a partir do método assistido por micro-ondas usando um instrumento doméstico, a partir dos precursores EDTA, tiosulfato de sódio e ureia, como ilustrado na **Figura 3.1**. A síntese consistiu dos seguintes procedimentos: primeiramente, foram medidas as massas dos reagentes EDTA (1,0 g), ureia (0,5 g) e tiosulfato de sódio (0,35 g) em erlenmeyer de 250 mL e adicionado 10 mL de água ultrapura. Após homogeneização manual da mistura, o material foi colocado no micro-ondas doméstico (1.400 W) e exposta a radiação micro-ondas variando os tempos em 1 (PQC1), 1,30 (PQC2), 2 (PQC3), 4 (PQC4), 6 (PQC5), 8 (PQC6) e 10 min (PQC7). Em seguida, o material carbonizado foi diluído com 20 ml de água ultrapura. As etapas de purificação dos PQC consistiram na neutralização com solução de NaOH 1 mol L^{-1} , filtração do material não solúvel, centrifugação em 5.000 rpm por 30 min e diálise utilizando uma membrana de 3.500 MWCO por 1h e 30 min para eliminação de resíduos. Finalmente, os PQC produzidos foram guardados em solução e armazenados em vidro âmbar sob refrigeração a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Um estudo comparativo de síntese foi conduzido utilizando-se ultrassom durante 5 min. Ainda, foram testadas sínteses de misturas de EDTA (1 g) + tiosulfato de sódio (0,35 g), EDTA (1 g) + ureia (0,5 g) e tiosulfato de sódio (0,35 g) + ureia (0,5 g) seguindo o procedimento de síntese de PQC3.

Figura 3.1. Esquema ilustrativo da síntese de PQC assistido por micro-ondas.



Fonte: própria do autor

3.6 Caracterização espectroscópica dos PQC

3.6.1 Microscopia eletrônica de transmissão

Uma pequena parte do sólido foi dissolvido em 5 mL de água ultrapura e homogeneizada utilizando um ultrassom por 10 min. Em seguida, gotas dessa solução são adicionadas num gride de cobre recoberto de carbono. Após a secagem do material em temperatura ambiente, o gride é colocado no instrumento para realização das medidas por imagem.

3.6.2 Difração de raios X

A medida de difração de raios X foram realizadas medindo-se a massa de 300 mg de sólido de PQC e adicionando-se no suporte instrumental para a realização da análise.

3.6.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Primeiramente foi medido a massa de 100 mg de KBr, após espalhamento do sólido no suporte, o material foi submetido a pressão para formação de uma pastilha de KBr. Em seguida,

foi medido a massa de 1 mg do sólido de PQC e adicionado sobre a pastilha de KBr. Essa mistura foi colocada no suporte instrumental e realizado a medida para obtenção do espectro.

3.6.4 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X

Uma pequena parte do sólido foi dissolvido em 5 mL de água ultrapura. Após a homogeneização, microgotas dessa solução são adicionadas sobre um substrato de silício(Si(100)/SiO₂) de largura e comprimento de aproximadamente 5 mm. A mistura do substrato de silício e PQC foram colocadas num suporte do instrumento para realização das medidas.

3.6.5 Potencial Zeta

As medidas de potencial Zeta foram realizadas em quatro misturas distintas, como PQC, PQC/Cr(VI), PQC/Cr(VI)/AA e PQC/RB. Após homogeneização, PQC e PQC/Cr(VI) foram medido imediatamente e a mistura contendo o padrão de AA e RB foram medidos depois de 3 min e 2 min de repouso, em temperatura ambiente, respectivamente. Segue a descrição das misturas: (i) 200 µL PQC, 200 uL tampão RB pH6, completado até 2 mL com água ultrapura; (ii) 200 µL PQC, 200 uL tampão RB pH6, 500 uL de solução de íon cromo(VI), completado até 2 mL com água ultrapura; (iii) 200 µL PQC, 200 uL tampão RB pH6, 500 uL de solução de íon cromo(VI), 500 µL de solução de AA 5 µg mL⁻¹, completado até 2 mL com água ultrapura; (iv) 200 µL PQC, 200 uL tampão RB pH6, 500 uL de solução de RB 1 µg mL⁻¹, completado até 2 mL com água ultrapura. Nas medidas foram realizadas em replicatas, no entanto, não foi adicionado a solução de NaCl 0,5 µg mL⁻¹.

3.6.6 Medidas espectrométricas

As medidas de absorbância molecular na região ultravioleta-visível (UV-Vis) foram realizados em cinco níveis de diluição para cada tipo de PQC sintetizados. As medidas foram feitas entre 0,10 e 0,03 unidades de absorbância para minimizar o IFE instrumental (Li *et al.*, 2017).

As soluções de trabalho de PQC foram diluídas utilizando um volume de 50 µL de solução estoque com adição de 2.950 µL de água ultrapura. Em seguida, foram retirados alíquotas entre 200 a 800 µL de solução de trabalho e adicionados em água ultrapura até volume final de 2 mL. As medidas, em replicatas, foram feitas após homogeneização e repouso das soluções por 2 min em temperatura ambiente, sendo realizadas no mesmo dia.

Utilizando as mesmas condições de preparo das medidas de absorvância, foram realizadas as medidas de fluorescência de cada uma das soluções, também no mesmo dia.

3.6.7 *Rendimento quântico de fluorescência*

O rendimento quântico de fluorescência (RQF) foi medido correlacionando-se os valores obtidos de absorvância e de intensidade de fluorescência dos PQC com os valores obtidos do padrão de referência da solução de sulfato de quinina (Preethi *et al.*, 2022). A solução de sulfato de quinina, RQF 54,0 %, foi preparada dissolvendo-se 10 mg desse padrão analítico em balão de 50 mL com solução de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ (Tang *et al.*, 2021). O RQF foi calculado conforme **Equação 3.1**.

$$\Phi_u = \Phi_s \left(\frac{A_u}{A_s} \right) \times \left(\frac{\eta_u}{\eta_s} \right)^2 \quad (3.1)$$

Onde Φ é o rendimento quântico de fluorescência molecular; u representa os PQC sintetizados; s o padrão de referência de sulfato de quinina em meio ácido; A é a inclinação da curva entre os valores da área integrada do espectro de emissão de fluorescência versus a absorvância no $\lambda_{\text{máx.exc.}} = 360$ nm, e η representa o índice de refração do solvente, onde η_u e η_s possuem valores de 1,33 (Jiao *et al.*, 2019).

3.7 Medidas realizadas no espectrofluorímetro Agilent

3.7.1 *Otimização das condições analíticas*

Os parâmetros de otimização experimentais utilizados no espectrofluorímetro Agilent para avaliar os PQC foram: (i) variação da solução de íon cromo(VI); (ii) efeito do pH; (iii) planejamento fatorial; (iv) tempo de repouso da mistura.

3.7.1.1 *Estudo da variação da solução de íon cromo(VI)*

Para a investigação do efeito *quenching* e formação do sensor PQC/Cr(VI) foram adicionados em microtubos tipo Eppendorf, 200 μ L da solução de trabalhos dos PQC 7,0 μ g mL⁻¹, 300 μ L tampão RB, 500 μ L de solução de íon cromo(VI) nas concentrações de 10 a 80 μ g mL⁻¹, 500 μ L de solução de AA 5 μ g mL⁻¹, completado até 2 mL com água ultrapura. Após homogeneização em temperatura ambiente, foi medido o sinal analítico de fluorescência em 430 nm ($\lambda_{\text{máx.exc.}} = 360$ nm).

3.7.1.2 Estudo da variação de pH

O estudo de pH aplicado na determinação de AA foi realizado em solução-tampão Britton-Robinson (BR) na faixa de pH de 2 a 12. A análise de cada solução tampão BR foi realizada, adicionando-se em microtubos tipo Eppendorf, 200 μL da solução de trabalhos dos PQC, 300 μL tampão RB, 500 μL de solução de íon cromo(VI) $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 500 μL de solução de AA $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, completado até 2 mL com água ultrapura. Após homogeneização em temperatura ambiente, foi medido o sinal analítico de fluorescência em 430 nm ($\lambda_{\text{máx.exc.}} = 360$ nm).

O estudo de pH aplicado na determinação de RB foi realizado em solução-tampão BR a faixa de pH variou de 2 a 8. A análise de cada solução tampão BR foi realizada adicionando-se, em microtubos tipo Eppendorf, 200 μL da solução de trabalhos dos PQC, 300 μL tampão RB e 500 μL de solução de RB $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, completado até 2 mL com água ultrapura. Após homogeneização em temperatura ambiente, foi medido o sinal analítico de fluorescência em 430 nm ($\lambda_{\text{máx.exc.}} = 360$ nm).

3.7.1.3 Planejamento fatorial

A otimização dos diferentes parâmetros analíticos para as determinações de RB e AA foi realizada utilizando-se planejamentos fatoriais 2^3 e 2^4 , respectivamente. A tabela de medidas aleatórias e a interpretação estatística das interações foram realizadas usando o software Minitab.

Para o estudo de AA, foram investigadas as variáveis de solução-tampão BR pH 6 (X1), os volumes de PQC (X2), concentração da solução de cloreto de sódio (X3) e concentração da solução de íon cromo(VI) (X4) (**Tabela 3.1** e **Tabela 3.2**).

Tabela 3.1 – Parâmetros de otimização para a determinação de AA

Fatores	-1	+1
Volume de tampão, μL	200	300
Volume de PQC, μL	100	200
NaCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	0	0,5
Concentração de cromo(VI), $\mu\text{g mL}^{-1}$	20	30

As variáveis do planejamento fatorial 2^4 são ajustadas em um modelo polinomial expressa na **Equação 3.2**.

$$Y = 0,326 - 0,00239 X1 - 0,00113 X2 + 1,08 X3 - 0,048 X4 + 0,000013 X1X2 - 0,0023 X1X3 + 0,000111 X1X4 + 0,0011 X2X3 + 0,000055 X2X4 - 0,022 X3X4 - 0,000014 X1X2X3 - 0,000 X1X2X4 + 0,00011 X1X3X4 + 0,00011 X2X3X4 - 0,00 X1X2X3X4 \quad (3.2)$$

Onde, Y é a resposta prevista; X1 a X4, variáveis codificadas com seu coeficiente linear; 0,326, o coeficiente constante; X1X3 a X3X4, possuem os coeficientes de interação entre duas variáveis; X1X2X3 a X2X3X4, possuem os coeficientes de interação entre duas variáveis; e X1X2X3X4, expressa o coeficiente de interação entre quatro variáveis (Cazetta, Spessato; Almeida, 2021).

Tabela 3.2 – Planejamento fatorial 2^4 de quatro variáveis independentes e a codificação dos parâmetros: X1 - Volume de tampão: 200 (-) e 300 (+), X2 - Volume de PQC: 100 (-) e 200 (+), X3 – Concentração de NaCl: 0 mol L⁻¹ (-) e 0,5 mol L⁻¹ (+) e X4 - Concentração de íon cromo(VI): 20 µg mL⁻¹ (-) e 30 µg mL⁻¹ (+).

Parâmetros	X1	X2	X3	X4
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+

Para o estudo da RB, foram investigados os fatores solução-tampão BR pH 6, volumes de solução de PQC e concentração da solução de cloreto de sódio (**Tabela 3.3** e **Tabela 3.4**).

Tabela 3.3 – Parâmetros de otimização para determinação de RB

Fatores	-1	+1
Volume de tampão, μL	200	300
Volume de PQC, μL	100	200
NaCl 0,5 mol L ⁻¹	0	0,5

As variáveis do planejamento fatorial 2³ são ajustadas em um modelo polinomial expressa na **Equação 3.3**.

$$Y = 0,01333 + 0,000011 X_1 + 0,000117 X_2 + 0,07503 X_3 - 0,000 X_1X_2 + 0,00004 X_1X_3 - 0,000380 X_2X_3 - 0,000001 X_1X_2X_3 \quad (3.3)$$

Onde, Y é a resposta prevista; X₁ a X₃, variáveis codificadas com seu coeficiente linear; 0,01333, o coeficiente constante; X₁X₃ a X₂X₃, possuem os coeficientes de interação entre duas variáveis; e X₁X₂X₃, representa o coeficiente de interação entre três variáveis (Cazetta, Spessato; Almeida, 2021).

Tabela 3.4 – planejamento fatorial 2³ de três variáveis independentes e a codificação dos parâmetros: X₁ - volume de tampão: 200 (-) e 300 (+); X₂ - volume de PQC: 100 (-) e 200 (+) e X₃ – concentração de NaCl: 0 mol L⁻¹ (-) e 0,5 mol L⁻¹ (+)

Parâmetros	X1	X2	X3
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Vale salientar que as medidas do planejamento fatorial foram realizadas aleatoriamente.

3.7.1.4 Tempo de repouso das misturas

O estudo do tempo de repouso da mistura com os analitos AA e RB, foi realizado após otimização das condições experimentais do estudo da variação de pH e planejamento fatorial, nos seguintes minutos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, 30, 60, 90, 120 e 180 e 240 min (Zhang *et al.*, 2019).

3.7.2 Curva analítica do método proposto

A estratégia *on-off-on* de fluorescência, em temperatura ambiente, foi utilizada para a determinação de AA. Assim, 500 μL de solução de íon cromo(VI) 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi adicionada na mistura de 200 μL de solução de trabalho de PQC 7,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 200 μL de solução-tampão BR e 500 μL de solução de NaCl 0,5 mol L^{-1} . Após homogeneização da mistura, foi adicionadas diferentes concentrações de solução de AA na faixa de trabalho de 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e completado com água ultrapura até o volume final de 2 mL. Em seguida, a mistura foi agitada manualmente e, após permanecer por 3 min em repouso, foi registrado o sinal analítico de fluorescência de fluorescência em 430 nm ($\lambda_{\text{máx.exc.}} = 360 \text{ nm}$).

Na determinação de fluorescência ratiométrica de RB, 500 μL de diferentes concentrações da solução de RB na faixa de trabalho de 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 3,5; 5,0; 7,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram adicionadas na mistura de 100 μL de solução de PQC 3,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 200 μL de solução-tampão BR pH 6 e 500 μL de solução de NaCl 0,5 mol L^{-1} , e completado com água ultrapura até o volume final de 2,0 mL. Após homogeneização, a mistura permaneceu por 2 min em repouso e foi registrado o sinal analítico de fluorescência de fluorescência em 430 nm ($\lambda_{\text{máx.exc.}} = 360 \text{ nm}$).

As medidas empregadas na determinação da solução padrão dos analitos foram realizadas em três replicatas autênticas, com excitação em 360 nm.

3.7.3 Validação do modelo linear

A validação do modelo linear para as soluções padrão de AA e RB foram realizadas para um modelo de calibração de univariado ($p=2$), em oito níveis de concentração ($m=8$) medidos em triplicatas. A falta de ajuste e a significância de regressão foram calculados com o auxílio do software Minitab e Excel, incluindo a avaliação do gráfico de resíduos, os coeficientes angular e linear da curva analítica e o coeficiente de regressão linear.

3.7.4 Precisão

Para o estudo da precisão para determinação de AA foi realizado em nove medidas com três níveis de concentração 0,5, 5,0 e 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da solução padrão de AA. As misturas foram preparadas, em tubos tipo Eppendorf, com adição de 200 μL da solução de trabalho dos PQC 7,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 200 μL de solução do tampão RB pH 6; 500 μL de solução de NaCl 0,5 mol L^{-1} , 500 μL da solução padrão AA nas concentrações de 0,5; 5,0 e 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e completado com água ultrapura até o volume final de 2,0 mL. Após homogeneização e repouso por 3 min em

temperatura ambiente, foi medido o sinal de emissão da fluorescência de cada mistura em 430 nm ($\lambda_{\text{máx.exc}} = 360$ nm) (Anvisa, 2017).

Para o estudo da precisão para determinação de RB foi realizado em nove medidas com três níveis de concentração 0,5, 3,5 e 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da solução padrão de RB. As misturas foram preparadas, em tubos tipo Eppendorf, com adição 100 μL de solução de PQC 3,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 200 μL de solução do tampão RB pH 6; 500 μL de solução de NaCl 0,5 mol L^{-1} , 500 μL da solução padrão AA nas concentrações de 0,5; 3,5 e 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e completado com água ultrapura até o volume final de 2,0 mL. Após homogeneização e repouso por 2 min em temperatura ambiente, foi medido o sinal de emissão da fluorescência de cada mistura em 430 nm ($\lambda_{\text{máx.exc}} = 360$ nm) (Anvisa, 2017).

3.7.5 Teste de recuperação

Os testes de recuperação das amostras líquidas e sólidas de AA foram feitos em quatro níveis de concentração: 0,0; 5,0; 20,0 e 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As misturas foram preparadas, em tubos tipo Eppendorf, com adição 200 μL da solução de trabalho dos PQC 7,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 200 μL de solução do tampão RB pH 6; 500 μL de solução de NaCl 0,5 mol L^{-1} , 500 μL da solução padrão AA nas concentrações de 0,0; 5,0; 20,0 e 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 100 μL de cada amostra diluída, e completado com água ultrapura até o volume final de 2,0 mL. Após homogeneização e repouso por 3 min em temperatura ambiente, foi medido o sinal de emissão da fluorescência de cada mistura em 430 nm ($\lambda_{\text{máx.exc}} = 360$ nm)

Os testes de recuperação das amostras de RB foram feitos em quatro níveis de concentração: 0,0; 0,5; 3,5 e 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As misturas foram preparadas, em tubos tipo Eppendorf, com adição 100 μL de solução de PQC 3,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 200 μL de solução do tampão RB pH 6; 500 μL de solução de NaCl 0,5 mol L^{-1} , 500 μL da solução padrão RB nas concentrações de 0,5; 3,5 e 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 500 μL de cada amostra diluída, e completado com água ultrapura até o volume final de 2,0 mL. Após homogeneização e repouso por 2 min em temperatura ambiente, foi medido o sinal de emissão da fluorescência de cada mistura em 430 nm ($\lambda_{\text{máx.exc}} = 360$ nm)

3.7.6 Sistema de detecção fluorescente

O espectrofluorímetro Agilent foi utilizado na detecção do sinal analítico dos analitos AA e RB, sendo ideal para uso de rotina nos laboratórios e aplicado em amostras fluorescentes, fosforescentes, quimioluminescentes e bioluminescentes. Esse instrumento possui lâmpada de

xenônio que permite uma rápida captura dos dados de fluorescência, acessório de fixação com regulador ajustável para cubeta de quartzo, suporte completamente fechado para bloquear de luz visível ambiente e faixa de comprimento de onda de emissão e excitação de 200 a 900 nm. O software *CaryWinFLR* é utilizado para controle da barra de ferramentas, incluindo alteração dos parâmetros instrumentais, zoom, gráficos 2D e 3D, e aquisição do sinal analítico de fluorescência. O espectrofluorímetro Agilent está descrito na

Figura 3.2 – Imagem do espectrofotômetro Cary Eclipse Agilent



Fonte: própria do autor

3.8 Espectrômetro *Ocean Optics*

3.8.1 Otimização das condições analíticas

Os parâmetros de otimização experimental utilizados no espectrômetro *Ocean Optics* para avaliar os PQC foram: (i) Estabilidade do LED; (ii) planejamento fatorial.

3.8.1.1 Estabilidade do LED 370 nm

O estudo de estabilidade do LED com excitação em 370 nm foi feito a partir do monitoramento da estabilidade de irradiação UV por tempo. As medidas foram realizadas irradiando o LED direto no detector ao longo de 90 min, sem uso de solução.

3.8.1.2. Planejamento fatorial

A otimização dos diferentes parâmetros analíticos para as determinações de RB e AA foi realizada utilizando-se planejamentos fatoriais 2^3 e 2^4 , respectivamente. O Minitab foi utilizado na interpretação estatística das interações analíticas. Para determinação de AA, foram investigadas as variáveis da solução-tampão BR pH 6 (X1), volumes de PQC (X2), concentração da solução de cloreto de sódio (X3) e concentração da solução de íon cromo(VI)(X4) (**Tabela 3.5** e **Tabela 3.6**).

Tabela 3.5 – Parâmetros de otimização para a determinação de AA.

Fatores	-1	+1
Volume de tampão, μL	200	300
Volume de PQC, μL	100	200
NaCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	0	0,5
Concentração de cromo(VI), $\mu\text{g mL}^{-1}$	20	30

As variáveis do planejamento fatorial 2^4 são ajustadas em um modelo polinomial expressa na **Equação 3.4**.

$$Y = 0,431 - 0,002073 X_1 - 0,00478 X_2 - 1,215 X_3 + 0,00541 X_4 + 0,000021 X_1X_2 + 0,00614 X_1X_3 + 0,000092 X_1X_4 + 0,01328 X_2X_3 + 0,000214 X_2X_4 + 0,0612 X_3X_4 - 0,000053 X_1X_2X_3 - 0,000001 X_1X_2X_4 - 0,000227 X_1X_3X_4 - 0,000498 X_2X_3X_4 + 0,000002 X_1X_2X_3X_4 \quad (3.4)$$

Onde, Y é a resposta prevista; X1 a X4, variáveis codificadas com seu coeficiente linear; 0,431, o coeficiente constante; X1X3 a X3X4, possuem os coeficientes de interação entre duas variáveis; X1X2X3 a X2X3X4, possuem os coeficientes de interação entre duas variáveis; e X1X2X3X4, expressa o coeficiente de interação entre quatro variáveis (Cazetta, Spessato; Almeida, 2021).

Tabela 3.6 – Planejamento fatorial 2^4 de quatro variáveis independentes e a codificação dos parâmetros: X1 - volume de solução-tampão: 200 (-) e 300 (+); X2 - volume de PQC: 100 (-) e 200 (+); X3 – concentração de NaCl: 0 mol L⁻¹ (-) e 0,5 mol L⁻¹ (+) e X4 - concentração de íon cromo(VI): 20 µg mL⁻¹ (-) e 30 µg mL⁻¹ (+).

Parâmetros	X1	X2	X3	X4
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+

Para o estudo da RB, foram investigados os fatores solução-tampão BR pH 6, volume de solução de PQC e concentração da solução de cloreto de sódio (**Tabela 3.7** e **Tabela 3.8**).

Tabela 3.7 – Parâmetros de otimização para determinação de RB.

Fatores	-1	+1
Volume de tampão, µL	200	300
Volume de PQC, µL	100	200
NaCl 0,5 mol L ⁻¹	0	0,5

As variáveis do planejamento fatorial 2^3 são ajustadas em um modelo polinomial expressa na **Equação 3.5**.

$$Y = 0,01333 + 0,000011 X1 + 0,000117 X2 + 0,07503 X3 - 0,000 X1X2 + 0,00004 X1X3 - 0,000380 X2X3 - 0,000001 X1X2X3 \quad (3.5)$$

Onde, Y é a resposta prevista; X1 a X3, variáveis codificadas com seu coeficiente linear; 0,01333, o coeficiente constante; X1X3 a X2X3, possuem os coeficientes de interação entre duas variáveis; e X1X2X3, representa o coeficiente de interação entre três variáveis (Cazetta, Spessato; Almeida, 2021).

Tabela 3.8 – Planejamento fatorial 2^3 de três variáveis independentes e a codificação dos parâmetros: X1 - volume de tampão: 200 (-) e 300 (+); X2 - volume de PQC: 100 (-) e 200 (+) e X3 – concentração de NaCl: 0 mol L⁻¹ (-) e 0,5 mol L⁻¹ (+).

Parâmetros	X1	X2	X3
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Vale salientar que as medidas do planejamento fatorial foram realizadas aleatoriamente.

3.8.2 Curva analítica do método proposto

A construção da curva analítica de AA, utilizando a estratégia *on-off-on*, foi realizada adicionando-se, em tubos tipo Eppendorf, 500 µL de solução de íon cromo(VI) 30 µg mL⁻¹, 200 µL de solução de trabalho de PQC 7,0 µg mL⁻¹, 200 µL de solução-tampão BR e 500 µL de solução de NaCl 0,5 mol L⁻¹. Após homogeneização da mistura, foram adicionadas diferentes concentrações de solução de AA na faixa de trabalho de 0,25; 0,5; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 µg mL⁻¹, e completado com água ultrapura até o volume final de 2 mL. Em seguida, a mistura foi agitada manualmente e, após permanecer por 3 min em repouso, foi registrado o sinal analítico de fluorescência em 440 nm ($\lambda_{\text{máx.exc.}} = 370 \text{ nm}$).

A curva analítica construída para determinação de RB foi realizada adicionando-se, em tubos tipo Eppendorf, 100 µL de solução de trabalho de PQC 3,5 µg mL⁻¹, 300 µL de solução-tampão BR pH 6 e 500 µL de solução de NaCl 0,5 mol L⁻¹, 500 µL da solução do padrão nas concentrações: 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4 e 4,5 µg mL⁻¹ e completado com água ultrapura até o volume final de 2,0 mL. Após homogeneização, a mistura permaneceu por 2 min em repouso e

foi registrado o sinal analítico de fluorescência de fluorescência em 440 nm ($\lambda_{\text{máx.exc.}} = 370$ nm).

As medidas empregadas na determinação da solução padrão dos analitos foram realizadas em três replicatas autênticas, com excitação em 370 nm.

3.8.3 Validação do modelo linear

A validação do modelo linear para a solução padrão de AA foi realizada para um modelo de calibração de univariado ($p=2$), em nove níveis de concentração ($m=9$) medidos em triplicatas. Com relação a RB, a validação foi feita para um modelo de calibração univariado ($p=2$), em oito níveis de concentração ($m=8$) medidos em triplicatas. A falta de ajuste e a significância de regressão foram calculados com o auxílio do software Minitab e Excel, incluindo a avaliação do gráfico de resíduos, os coeficientes angular e linear da curva analítica e o coeficiente de regressão linear.

3.8.4 Precisão

Para o estudo da precisão para determinação de AA foi realizado em nove medidas com três níveis de concentração 0,5; 5,0 e 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da solução padrão de AA. As misturas foram preparadas, em tubos tipo Eppendorf, com adição de 200 μL da solução de trabalho dos PQC 7,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 500 μL de solução de íon cromo(VI) 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 200 μL de solução do tampão RB pH6; 500 μL de solução de NaCl 0,5 mol L^{-1} , 500 μL da solução padrão AA nas concentrações de 0,5; 5,0 e 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e completado com água ultrapura até o volume final de 2,0 mL. Após homogeneização e repouso por 3 min em temperatura ambiente, foi medido o sinal de emissão da fluorescência de cada mistura em 440 nm ($\lambda_{\text{máx.exc}} = 370$ nm) (Anvisa, 2017).

Para o estudo da precisão para determinação de RB foi realizado em nove medidas com três níveis de concentração 0,5; 2,0 e 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da solução padrão de RB. As misturas foram preparadas, em tubos tipo Eppendorf, com adição 100 μL de solução de PQC 3,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 300 μL de solução do tampão RB pH 6; 500 μL de solução de NaCl 0,5 mol L^{-1} , 500 μL da solução padrão AA nas concentrações de 0,5; 2,0 e 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e completado com água ultrapura até o volume final de 2,0 mL. Após homogeneização e repouso por 3 min em temperatura ambiente, foi medido o sinal de emissão da fluorescência de cada mistura em 440 nm ($\lambda_{\text{máx.exc}} = 370$ nm) (Anvisa, 2017).

3.8.5 Teste de recuperação

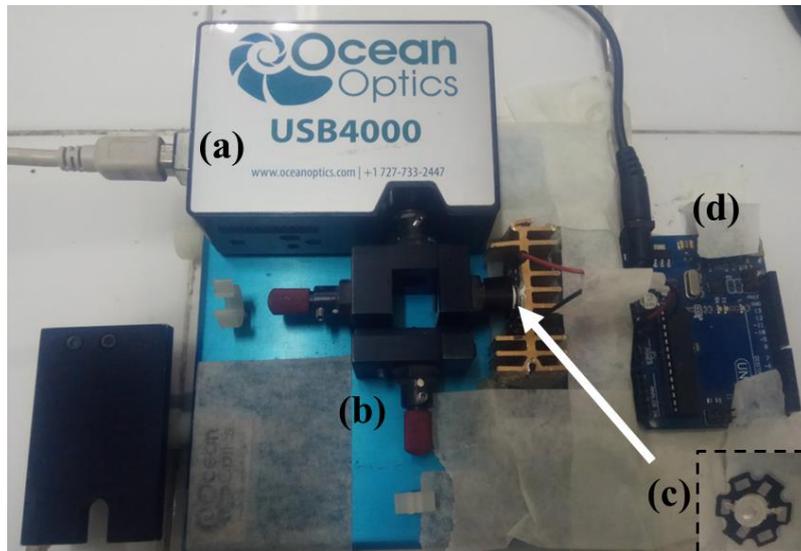
Os testes de recuperação das amostras líquidas e sólidas de AA foram feitos em quatro níveis de concentração: 0,0; 5,0; 20,0 e 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As misturas foram preparadas, em tubos tipo Eppendorf, com adição 200 μL da solução de trabalho dos PQC 7,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 500 μL de solução de íon cromo(VI) 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 200 μL de solução do tampão RB pH 6; 500 μL de solução de NaCl 0,5 mol L^{-1} , 500 μL da solução padrão AA nas concentrações de 0,0; 5,0; 20,0 e 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 100 μL de cada amostra diluída, e completado com água ultrapura até o volume final de 2,0 mL. Após homogeneização e repouso por 3 min em temperatura ambiente, foi medido o sinal de emissão da fluorescência de cada mistura em 440 nm ($\lambda_{\text{máx.exc}} = 370 \text{ nm}$)

Os testes de recuperação das amostras de RB foram feitos em quatro níveis de concentração: 0,0; 0,5; 2,0 e 3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As misturas foram preparadas, em tubos tipo Eppendorf, com adição 100 μL de solução de PQC 3,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 200 μL de solução do tampão RB pH 6; 500 μL de solução de NaCl 0,5 mol L^{-1} , 500 μL da solução padrão AA nas concentrações de 0,0; 0,5; 2,0 e 3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 500 μL de cada amostra diluída, e completado com água ultrapura até o volume final de 2,0 mL. Após homogeneização e repouso por 2 min em temperatura ambiente, foi medido o sinal de emissão da fluorescência de cada mistura em 440 nm ($\lambda_{\text{máx.exc}} = 370 \text{ nm}$).

3.8.6 Sistema de detecção fluorescente

O espectrômetro portátil *Ocean Optics*, modelo USB 4000 foi empregado na detecção do sinal analítico dos analitos AA e RB. Este instrumento possui detector específico para análises fluorescentes (a) e acessório de fixação para cubeta de quartzo (b). Na janela lateral do instrumento, foi inserido um LED 370 nm (c) conectado com uma placa de Arduino® para estabilização eletrônica da fonte de excitação (d). Para impedir a influência da luz do ambiente, o próprio instrumento possui uma tampa que bloqueia luz visível ambiente que é colocada durante a realização das medidas. O detalhamento dos componentes do sistema de detecção está ilustrado na **Figura 3.2**.

Figura 3.3 – Fotografia do sistema de detecção Ocean Optics: (a) detector fluorescente; (b) acessório de fixação da cubeta de quartzo; (c) LED-UV montado em dissipador de calor e (d) placa Arduino®.



Fonte: própria do autor.

Para a realização das medidas de fluorescência das amostras foi empregado um LED ultravioleta de alta potência (modelo LTPL-C034UVH370) como fonte de excitação em 370 nm. Esse LED foi inserido na parte lateral do acessório de fixação de cubeta, em ângulo de 90° em relação ao eixo de leitura do detector. Devido à grande quantidade de calor liberado pelo LED, foi acoplado a um dissipador de calor.

A placa de Arduino® UNO é composta por um microcontrolador com circuito integrado modelo U2-LP2985, suporte de entrada/saída embutido, interface USB e regulador que fornece uma tensão contínua de 3,3 V para alimentação do LED UV. Essa plataforma manipula, interpreta e transforma 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.

O detector do espectrômetro *Ocean Optics* não precisa de fonte de alimentação externa, portanto, foi conectado a um computador Samsung® modelo NP300ESK-KF1BR por via cabo USB para aquisição do sinal analítico gerado pelo software *SpectraSuite*. Esse programa trata dados espectrométricos baseado no programa Java, que opera em sistemas operacionais Windows e Linux. 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.

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 nos softwares *CaryWinFLR* e *SpetraSuite*, incluindo a construção de gráficos.

3.9 Estudos de seletividade

Para a realização do estudo de seletividade foram utilizados os compostos orgânicos e inorgânicos que estão listados abaixo.

- ✓ Compostos orgânicos: ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido pantatênico, ácido tartárico, biotina, niacina, tiamina, glucose, frutose, sacarose, amido de milho, L-isoleucina, L-prolina, ácido glutâmico, L-alanina, guanina, L-histidina, L-cistina, L-leucina, L-lisina e L-tirosina (Hu *et al.*, 2020).
- ✓ Compostos inorgânicos: CaCl_2 , NaCl , KCl , CuCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, MnCl_2 , CoCl_2 , $\text{FeSO}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Jiao *et al.*, 2019).

Para o estudo do efeito *quenching* de cada composto orgânico e inorgânico foi realizado adicionando-se, em tubos tipo Eppendorf, 200 μL de solução de trabalho de PQC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 200 μL de solução-tampão BR pH 6 e 500 μL de solução de NaCl 0,5 mol L^{-1} , 500 μL da solução padrão na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e completado com água ultrapura até o volume final de 2,0 mL. Após homogeneização, a mistura permaneceu por 2 min em repouso e foi registrado o sinal analítico de fluorescência em 430 nm ($\lambda_{\text{máx.exc.}} = 360 \text{ nm}$).

Para o estudo do retorno da fluorescência de cada composto inorgânico usando o AA 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi realizado adicionando-se, em tubos tipo Eppendorf, 200 μL de solução de trabalho de PQC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 200 μL de solução-tampão BR pH 6, 500 μL de solução de NaCl 0,5 mol L^{-1} , 500 μL da solução padrão na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e completado com água ultrapura até o volume final de 2,0 mL. Após homogeneização, a mistura permaneceu por 2 min em repouso e foi registrado o sinal analítico de fluorescência de fluorescência em 430 nm ($\lambda_{\text{máx.exc.}} = 360 \text{ nm}$).

Para o estudo do retorno da fluorescência do sensor PQC/Cr(VI) de cada composto orgânico foi realizado adicionando-se, em tubos tipo Eppendorf, 200 μL de solução de trabalho de PQC 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 500 μL de solução de íon cromo(VI) 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 200 μL de solução-tampão BR pH 6 e 500 μL de solução de NaCl 0,5 mol L^{-1} , 500 μL da solução padrão na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e completado com água ultrapura até o volume final de 2,0 mL. Após homogeneização, a mistura permaneceu por 3 min em repouso e foi registrado o sinal analítico de fluorescência de fluorescência em 430 nm ($\lambda_{\text{máx.exc.}} = 360 \text{ nm}$).

3.10 Estudo de estabilidade das nanopartículas

O estudo de estabilidade da solução dos PQC foi realizado adicionando-se em um béquer de 100 mL, 4 mL de solução de trabalho de PQC $7,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 36 mL água ultrapura. Após homogeneização foi realizado a medida do sinal de fluorescência das nanopartículas, em temperatura ambiente, e o restante da solução preparada foi armazenada em frasco tipo âmbar de 50 mL sob refrigeração a 10°C . O estudo foi desenvolvido ao longo de duzentos e quarenta dias: 1°, 2°, 3°, 4°, 5°, 6°, 7°, 8°, 9°, 10°, 15°, 20°, 30°, 45°, 60°, 90°, 120°, 180°, 210° e 240° dia (Ma *et al.*, 2019, Sahoo *et al.*, 2020).

3.11 Equação do fenômeno de fluorescência das nanopartículas

Para o estudo do efeito *quenching* e fluorescência ratiométrica foi usada a expressão matemática 3.6, de modo investigar a diminuição de fluorescência das nanopartículas (Ma *et al.*, 2019).

$$DF = \frac{F_0 - F}{F_0} \quad (3.6)$$

Onde, DF é a diminuição de fluorescência, F corresponde à fluorescência das nanopartículas ao interagirem com o íon cromo(VI) e a riboflavina, e F_0 corresponde ao sinal fluorescente da solução de trabalho dos PQC.

Para o estudo do retorno da fluorescência das nanopartículas foi aplicado a expressão matemática 3.7 (An *et al.*, 2021).

$$AF = \frac{F_r - F}{F} \quad (3.7)$$

Onde, AF é a retorno da fluorescência das nanopartículas, F_r corresponde à fluorescência do sensor PQC/Cr(VI) ao interagir com ácido ascórbico e F corresponde ao sinal fluorescente do sensor PQC/Cr(VI).

3.12 Determinação de ácido ascórbico e riboflavina em suplementos vitamínicos

3.12.1 Preparo de amostras

As três amostras líquidas e as duas amostras efervescentes de comprimidos de AA foram compradas em diferentes farmácias na cidade de João Pessoa, Paraíba. As três amostras em cápsulas de RB foram adquiridas em diferentes farmácias de manipulação localizadas na cidade de João Pessoa, Paraíba

Para a determinação de AA em amostra líquida contendo $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AA, foi retirada uma alíquota de $500 \mu\text{L}$ e transferida para balão volumétrico de 500 mL. Após

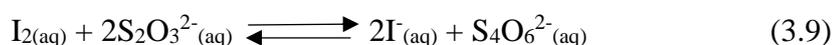
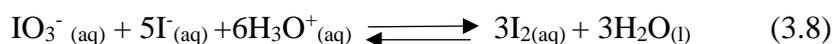
homogeneização, a solução foi novamente diluída em um Eppendorf de 2,0 mL até conter uma concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Nas amostras de comprimido efervescente de AA, cada amostra de 1 g foi diluída em balão volumétrico de 500 mL com água ultrapura. Após homogeneização, a solução foi novamente diluída em um Eppendorf de 2,0 mL, até conter uma concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

O procedimento das amostras de RB foi adaptado de Monte-Filho e colaboradores (2019), onde cinco comprimidos foram homogeneizados em um béquer usando um bastão de vidro; em seguida, foram adicionados 100 mL de água ultrapura, homogeneizados e submetidos à cavitação por 10 min em ultrassom. Após filtração, foram transferidos para balão volumétrico de 250 mL e completado o volume com água ultrapura. Então, a mistura foi diluída em um Eppendorf de 2,0 mL para conter uma concentração de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.12.2 Método de referência para a determinação de ácido ascórbico

Para a determinação de AA, o método de referência utilizado foi baseado na titulação iodométrica, conforme procedimento descrito na Farmacopeia Brasileira (Anvisa, 2019). Portanto, o procedimento consistiu-se na padronização da solução de iodo com solução de tiosulfato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ como padrão primário, contendo iodeto de potássio, até a mudança da coloração para verde amarelado. Em seguida, adicionou-se 3 mL da solução de amido 1 % (m v^{-1}) no titulado e continuou a titulação até a mudança de coloração para azul (Baccan *et al.*, 2001) As **Equações 3.8 e 3.9** representam as reações químicas e as respectivas estequiometrias.



Após a padronização, a solução de tiosulfato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ foi utilizada para padronizar a solução de iodo, resultando na concentração de $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. A solução de iodo padronizado foi empregada na determinação do teor de ácido ascórbico nas amostras líquidas e sólidas de vitamina C. Para tanto, adicionou-se em um erlenmeyer de 250 mL cerca de 0,2 g de cada amostra de vitamina C, 100 mL de água ultrapura, 25 mL de ácido sulfúrico 1 mol L^{-1} e 3,0 mL de solução de amido 1 % (m v^{-1}). Após homogeneização, a mistura foi imediatamente titulada com solução de iodo $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. Em amostras líquidas, mediu-se 1,0 mL de cada amostra para garantir a equivalência de 0,2 g de AA. Cada amostra foi realizada em replicada,

conforme recomendações da Anvisa. As **Equações 3.10 e 3.11** representam as reações químicas e as respectivas estequiometrias (Anvisa, 2019; Baccan *et al.*, 2001).



$\text{I}^-(\text{aq}) + \text{I}_2(\text{aq}) + (\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n(\text{aq}) \rightleftharpoons (\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n\text{I}_3^-$ Complexo amido-iodo de coloração azul intenso (3.11)

A concentração de AA na amostra foi calculada com base na **Equação 3.12** sendo que cada mL da solução de iodo $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ equivale a $7,04 \text{ mg}$ de AA.

$$C_{AA} = \frac{C_I * V_I}{V_{amostra}} \quad (3.12)$$

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 ($0,04 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$).

3.12.3 Método de referência para determinação de riboflavina

Para a determinação de RB, o método de referência foi baseado na cromatografia líquida de alta definição, conforme procedimento descrito na AOAC (2016). Dessa forma, o procedimento consistiu da homogeneização de 10 amostras em cápsulas utilizando um béquer e um bastão de vidro. Em cada mistura de amostra foi retirado 10 mg e dissolvido em 50 mL da solução de acetato de amônio 10 mmol L^{-1} em um recipiente vidro âmbar de 100 mL . Após agitação por 30 min , os frascos foram armazenados na geladeira a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 h . O extrato foi filtrado usando um filtro micropore $0,45 \text{ } \mu\text{m}$. Para a análise, a amostra filtrada foi diluída 20 vezes em solução de acetato de amônio 10 mmol L^{-1} . A análise instrumental de cada amostra, foi realizada injetando-se a mistura em replicata.

As análises por HPLC foram realizadas empregando-se duas fases moveis: (i) solução de formiato de amônio 10 mmol L^{-1} ajustando o pH para $3,8$ com ácido fórmico, e (ii) metanol. Antes das medidas, a estabilidade da coluna cromatografia foi feita com 3% de metanol por 15 min . A corrida com amostra foi realizada a partir do gradiente linear de $0-9 \text{ min}$, $3-15 \%$ B; $9-10 \text{ min}$, $15-20 \%$ B; $10-20 \text{ min}$, $20-25 \%$ B; e $20-30 \text{ min}$, $25-55 \%$ B, sendo 3% B por 15 min para limpeza e equilíbrio da coluna. A taxa de fluxo foi de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ e o volume injetado de amostra foi de $10 \text{ } \mu\text{L}$, usando o comprimento de onda máximo de excitação em 268 nm .

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

E

DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

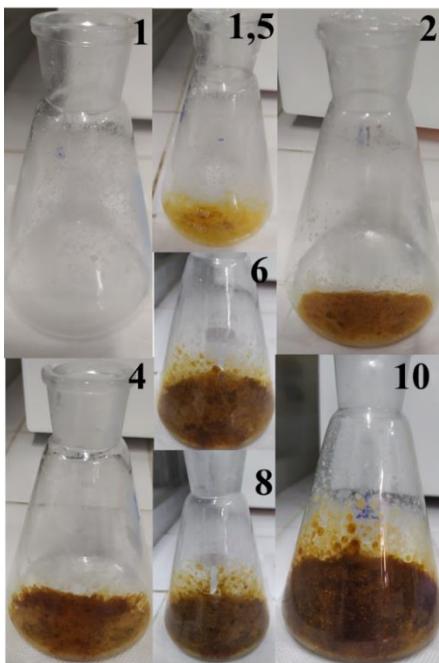
4.1 Sínteses e purificação dos pontos quânticos de carbono

As sete sínteses dos PQC foram produzidas mantendo-se constante a massa dos precursores EDTA, tiosulfato de sódio e ureia em 10 mL de água ultrapura, mas variando-se o tempo de permanência da mistura sob irradiação. Para retirada do material impregnado no frasco foi utilizado um bastão de vidro e 20 mL de água ultrapura para raspar e diluir o material. O pH do material sintetizado foi neutralizado usando hidróxido de sódio 2 mol L^{-1} e verificado num pHmetro. A purificação requereu uma filtração por gravidade, centrifugação (5.000 rpm, 30 min) e diálise utilizando uma membrana de 3.500 MWCO por 1h e 30 min para eliminação de resíduos.

Na **Figura 4.1** observa-se as sete sínteses produzidas de PQC, acompanhadas de uma mudança de coloração de amarelo no tempo de 1,5 min (PQC2) para castanho-alaranjado no tempo de 10 min (PQC7). Vale ressaltar que cada síntese foi realizada utilizando o tempo de síntese em modo contínuo. Para a confirmação de fluorescência das nanopartículas, a solução dos PQC emitiu forte fluorescência de coloração azul brilhante quando irradiada sob luz UV em 365 nm.

As sínteses de misturas de EDTA e tiosulfato de sódio, EDTA e ureia, e tiosulfato de sódio e ureia foram realizadas nas condições otimizadas da síntese de PQC3, mas não ocorreu a carbonização do material. Logo, as sínteses permaneceram misturadas no frasco e não fluoresceram quando submetido à irradiação UV 365 nm.

Figura 4.1 – Fotografia dos PQC sintetizados pelo método assistido por micro-ondas descrito em sequência nos tempos: 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 10 min.



Fonte: própria do autor.

O método assistido por micro-ondas é considerado o mais simples, pois permite um aquecimento rápido e localizado que aumenta a eficiência da digestão dos compostos orgânicos devido à forte interação da radiação eletromagnética com os precursores em solução (Jorns e Pappas, 2021).

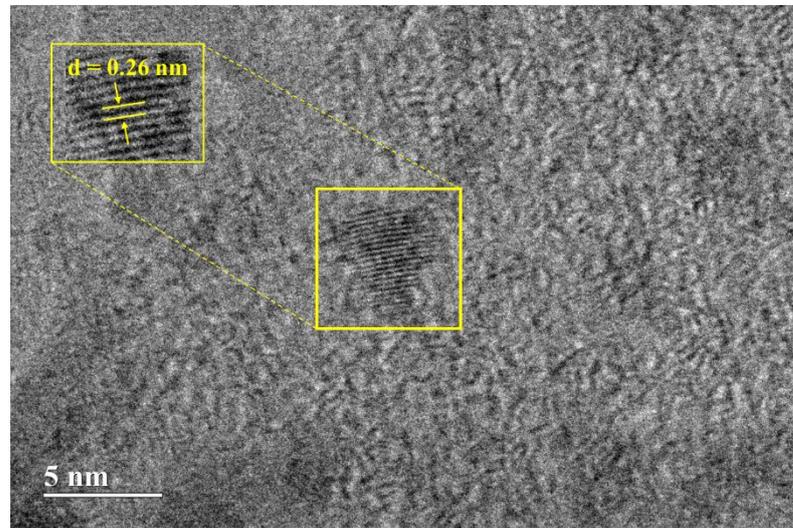
Após as sínteses, foi escolhido o PQC3 que resultou no melhor resultado de fluorescência, no qual foi empregado na investigação das propriedades fotoluminescentes das nanopartículas e sua interação com o analito, incluindo a caracterização e a otimização dos parâmetros dos PQC.

4.2 Caracterização dos pontos quânticos de carbono

4.2.1 Microscópio eletrônica de transmissão

A morfologia e o tamanho das partículas dos PQC foram analisados por TEM. Na **Figura 4.2** observa-se uma imagem de alta resolução de uma nanopartícula contendo uma estrutura fina e cristalina dos PQC, e uma rede média de espaçamento de 0,26 nm, atribuída ao plano cristalino de carbono grafítico (100). Esse resultado corresponde ao alto grau de carbonização no interior da estrutura dos PQC (Xiao *et al.*, 2023).

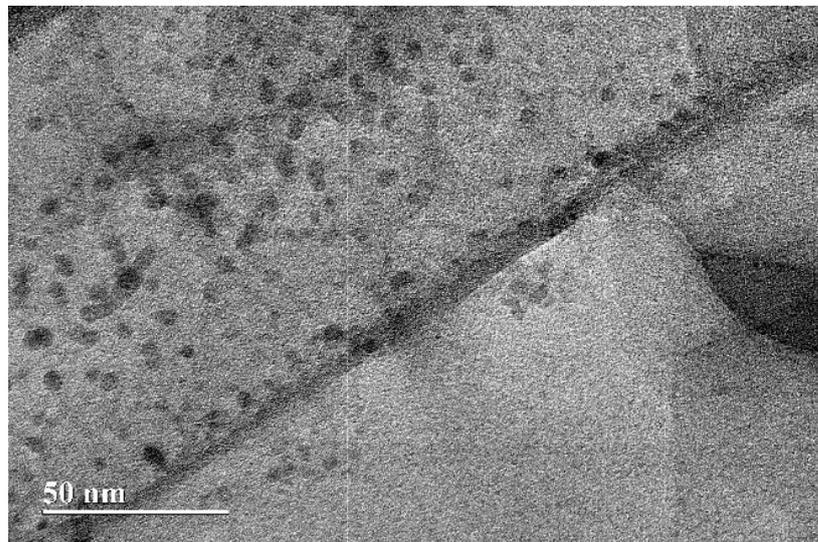
Figura 4.2 –Imagem por alta resolução de microscopia eletrônica de transmissão dos PQC com rede média de espaçamento de 0,26 nm.



Fonte: própria do autor.

Aproximadamente, 100 nanopartículas distribuídas pelo espaço amostral estão exibidas na **Figura 4.3**. Essas nanopartículas contém uma distribuição uniforme e uma estrutura morfológica esférica.

Figura 4.3 – Ilustração da imagem por TEM dos PQC com média de 100 nanopartículas em zoom de 50 nm

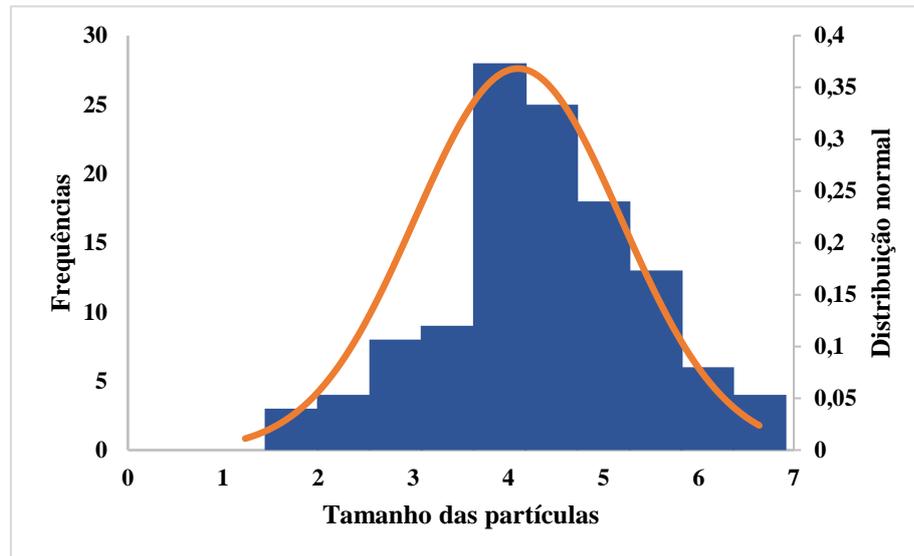


Fonte: própria do autor.

O tamanho médio das nanopartículas obtidas a partir do cálculo de distribuição normal, está ilustrado na **Figura 4.4**. Observa-se no histograma a uniformidade nos tamanhos dos PQC distribuídos na faixa de 1,0 a 7,0 nm e um diâmetro médio de $4,0 \pm 0,11$ nm. Esses resultados confirmam a morfologia quase esférica e o tamanho menor que 10 nm exigidos para a síntese

dos PQC, como também, a semelhança das nanopartículas descritas na literatura (John; Abraham; Mathew, 2022).

Figura 4.4 - Distribuição dos tamanhos das nanopartículas investigadas na Figura 4.3



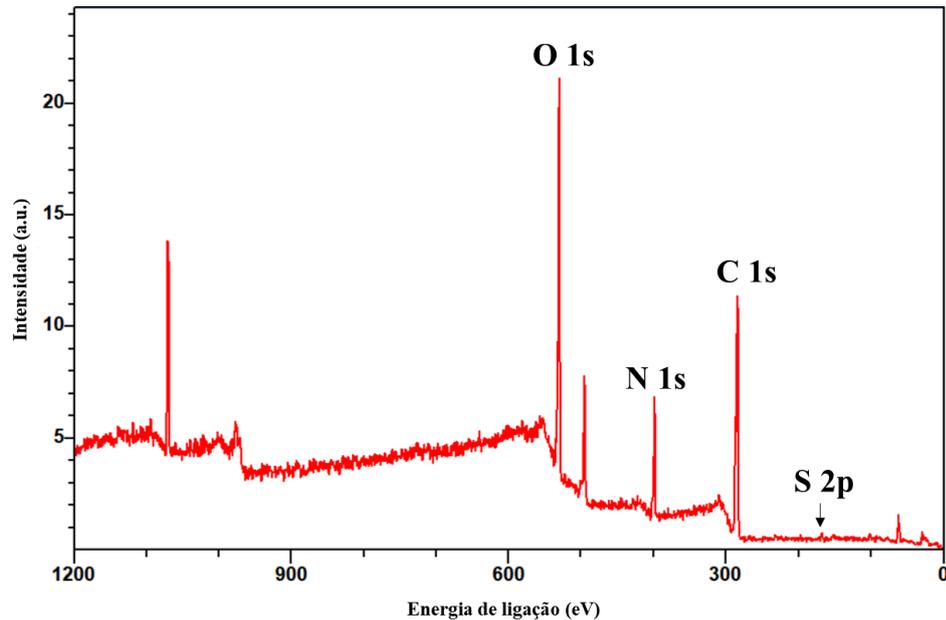
Fonte: própria do autor.

4.2.2 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X

O instrumento XPS foi utilizado na investigação dos elementos C, H, O, N e S que constituem os precursores empregados na síntese das nanopartículas. Na **Figura 4.5** observa-se o espectro das quatro cristas de C1s, N1s, O1s e S2p com seus respectivos valores de 284,50; 398,50; 530,00 e 167,00 eV (Ji *et al.*, 2021; Meng *et al.*, 2022). As porcentagens relativas aos elementos C, N, O e S foram identificadas em 39,47 %, 14,58 %, 44,87 % e 1,08 %, respectivamente, confirmando a adição desses elementos na síntese dos PQC (Jia *et al.*, 2022; Meng *et al.*, 2022).

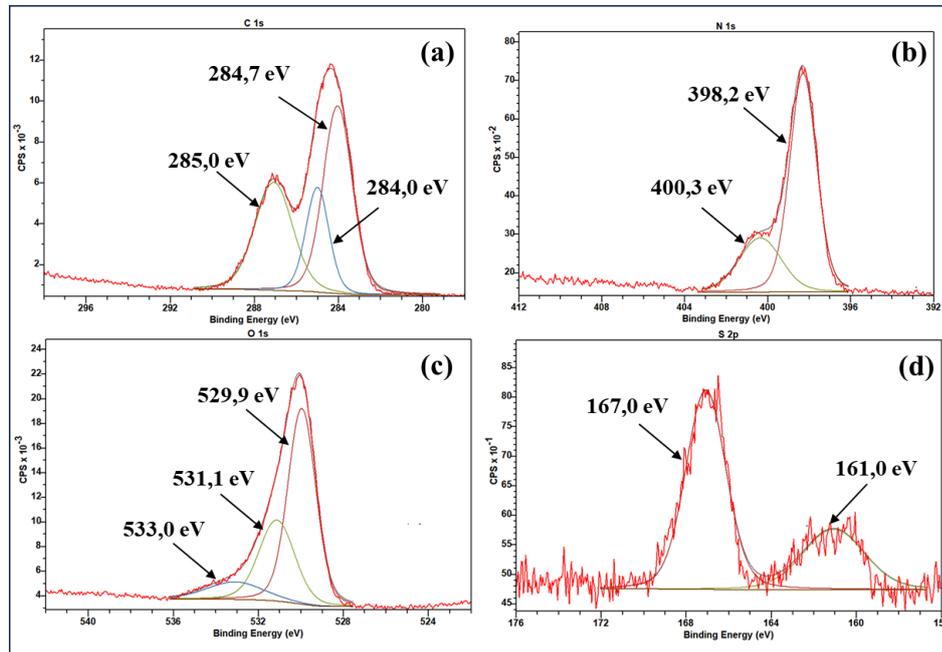
Figura 4.5 – Espectro de XPS dos elementos C, H, O, N e S encontrados na superfície dos PQC.

Fonte: própria do autor.



Na **Figura 4.6a** identifica-se no espectro de alta resolução do C1s, três picos que correspondem às ligações C-C, C=C (284,0 eV), C-N e C-O (284,7 eV), e C=N e C=O (285,0 eV) (Lin *et al.*, 2021). No espectro de alta resolução do N1 (**Figura 4.6b**), observa-se dois picos distintos em 400,3 e 398,2 eV, evidenciando a presença de pirrólico-N e piridínico-N, respectivamente (Meng *et al.*, 2022). Na **Figura 4.6c** observa-se no espectro de alta resolução do O1s, picos em 529,9; 531,1 e 533,0 eV, que indica a presença de ligações C=O, C-O e C-NO, e C-OH e C-O-C, respectivamente (Xiao *et al.*, 2023). Os dois picos em 167,0 e 161,0 eV, observados no espectro de alta resolução de S2p (**Figura 4.6d**), correspondem à presença de enxofre na forma de óxido S e C-S, respectivamente (Meng *et al.*, 2022). Assim, os resultados dos espectros de XPS contêm a confirmação dos grupos carboxila, carbonila, amino e sulfurados, coincidindo com a composição química dos precursores dos PQC, como também, evidenciam a funcionalização de grupos orgânicos na superfície das nanopartículas. Além disso, Tian e colaboradores (2021) complementam que a quantidade de grupos orgânicos contendo elemento oxigênio, aumentam a hidrofiliicidade e estabilidade dos PQC, confirmada pela alta quantidade percentual de O na superfície das nanopartículas.

Figura 4.6 – Espectro de XPS em alta resolução dos elementos C, H, O, N e S encontrados na superfície dos PQC

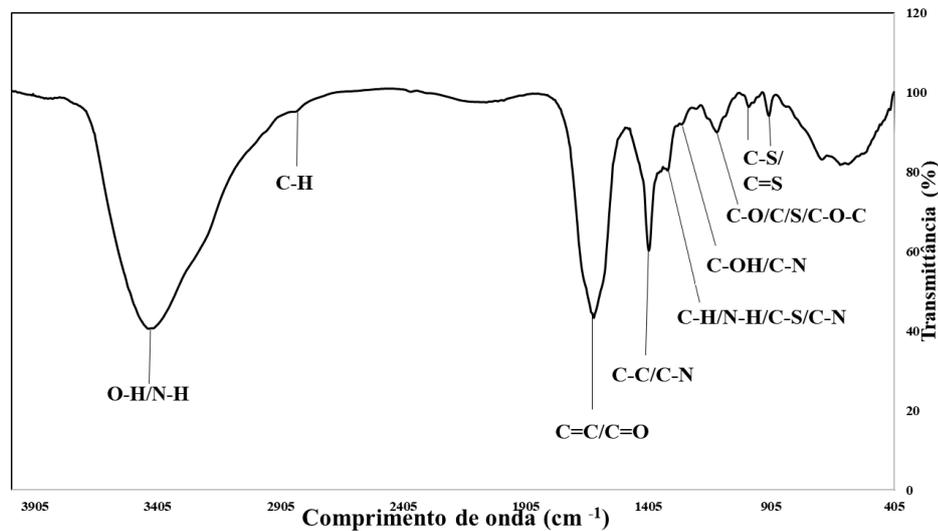


Fonte: própria do autor

4.2.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

A identificação dos grupos orgânicos presentes na superfície dos PQC foi investigada no resultado do espectro de FT-IR (**Figura 4.7**). No espectro de FT-IR, encontra-se uma banda em $3421,71\text{ cm}^{-1}$ e $2843,07\text{ cm}^{-1}$ de estiramento vibracional O-H e N-H, e C-H, respectivamente (Ji *et al.*, 2021; Jia *et al.*, 2022; Tian *et al.*, 2021). A confirmação de estiramento vibracional de hidrocarbonetos aromáticos policíclico C=C e grupo carbonil C=O na banda em $1627,92\text{ cm}^{-1}$ e estiramento vibracional de C-C e C-N na banda em $1404,17\text{ cm}^{-1}$ (Tian *et al.*, 2021; Meng *et al.*, 2022). Em $1327,02\text{ cm}^{-1}$, observam-se as flexões vibracionais de C-H, N-H, C-S e C-N e em $1269,16\text{ cm}^{-1}$ estiramentos vibracionais de C-OH, C-N (Ji *et al.*, 2021). Os estiramentos vibracionais C-O, C-S e C-O-C são encontradas na banda em $1126,42\text{ cm}^{-1}$ (Meng *et al.*, 2022). As bandas em $995,27$ e $914,25\text{ cm}^{-1}$ apresentam fraco estiramento de C-S ou C=S (Tian *et al.*, 2021; Ji *et al.*, 2021).

Figura 4.7 – Espectro de FTIR medido na faixa de 405 a 3905 cm^{-1} com bandas de estiramentos vibracionais.



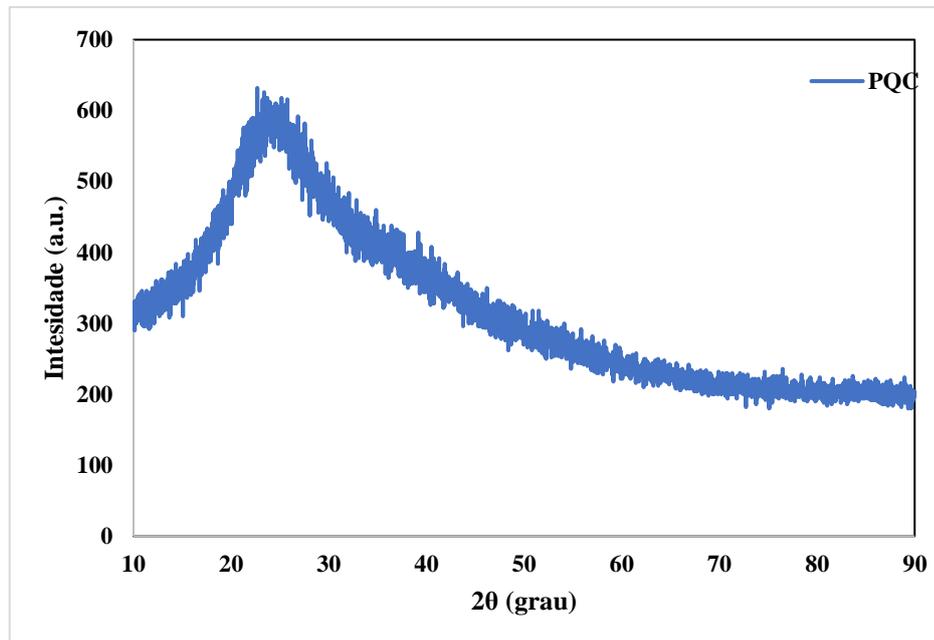
Fonte: própria do autor

Os resultados das análises de XPS e FTIR confirmaram a presença dos elementos químicos C, O, N e S, e a adição de grupos funcionais, como -COOH, -OH, -NH₂ e -SO, na superfície dos PQC. Esses grupos funcionais possibilitam a modificação da superfície da nanopartícula e auxiliam no aumento da hidrofiliabilidade dos PQC (Wang *et al.*, 2020; Gu *et al.*, 2022). Tu e colaboradores (2020) complementam que o excesso de grupos funcionais contendo O na superfície dos PQC podem favorecer a interação das nanopartículas com íons metálicos.

4.2.4 Difração de raios X

Na investigação da estrutura cristalina dos PQC, a medida de XRD está ilustrada na **Figura 4.8**. Nessa figura observa-se um pico de difração em torno de $2\theta = 23,7^\circ$, que corresponde ao plano cristalino de carbono grafítico (002) (Xiao *et al.*, 2023). Na faixa do pico de difração entre 20° a 40° , confirma-se a natureza amorfa dos nanomateriais carbonáceos (Fan *et al.*, 2022), como também, evidencia a existência de estrutura de grafite no núcleo das nanopartículas (Preethi *et al.*, 2022). Os resultados obtidos por TEM e XRD, confirmam a estrutura grafítica, amorfa e a conformação cristalina dos PQC.

Figura 4.8 – Espectro de medida de XRD com pico em 23,7°



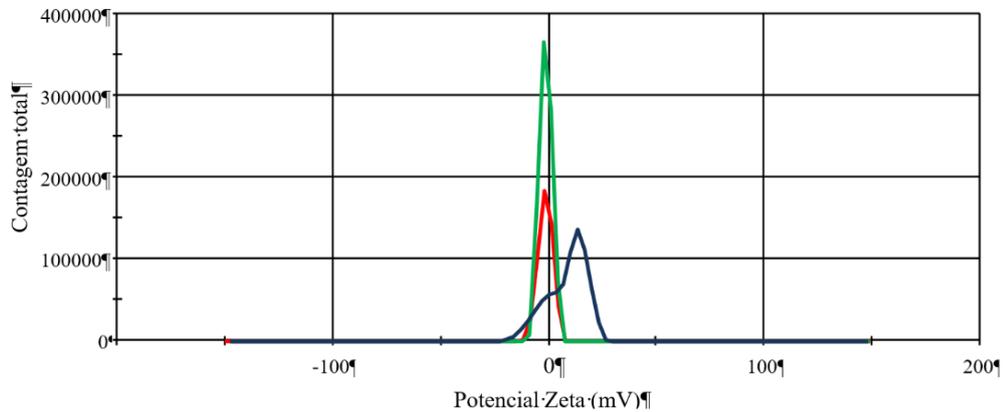
Fonte: própria do autor

4.2.5 Potencial Zeta

A diferença de potencial resultante da interação dos grupos funcionais carboxila, carbonila, hidroxila, amina ou sulfurados presentes na superfície de PQC com os analitos, AA e RB, foi realizada a partir das medidas de potencial Zeta. Conforme a **Figura 4.9**, observa-se que o valor medido de $-16,8$ mV de potencial Zeta corresponde a alta dispersividade em água, devido à presença de grupos hidrofílicos como hidroxila e carboxila na superfície dos PQC e corrobora para um longo tempo de estabilidade da solução dos PQC (Sahoo *et al.*, 2020, Xu *et al.*, 2020).

A medida de potência Zeta para formação do sensor PQC/Cr(VI) pela adição de íon cromo(VI) nos PQC resultou no valor de $-1,93$ mV. Essa distinta diferença no valor do potencial confirma a possível reação de coordenação entre o íon cromo(VI) e os grupos funcionais na superfície dos PQC ou oxidação e geração de íon cromo(III) em solução (Tu *et al.*, 2020; Fan *et al.*, 2022). A interação AA com o sensor PQC/Cr(VI) ocasionou alteração de potencial para o valor de $-18,7$ mV. Segundo Hao e colaboradores (2023), essa alteração de potencial resulta da retirada do íon metálico da superfície dos PQC pelo AA, restaurando a fluorescência das nanopartículas.

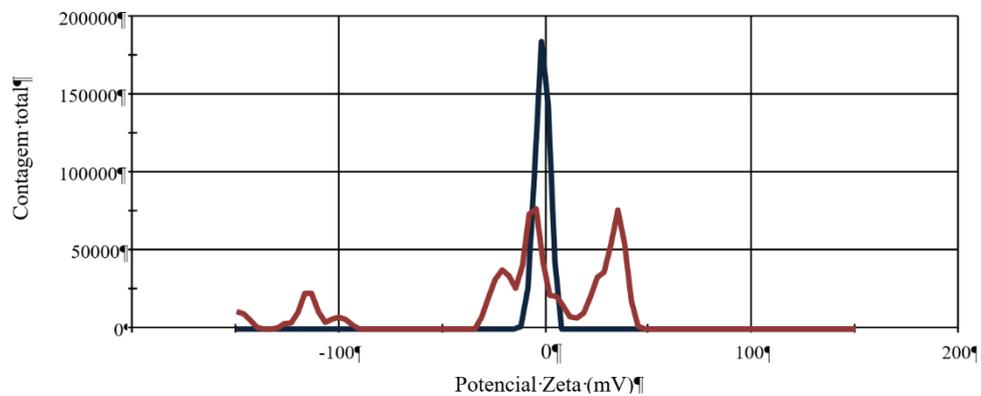
Figura 4.9 – Gráfico de potencial Zeta nos PQC (vermelho), sensor PQC/Cr(VI) (azul) e PQC/Cr(VI)/AA (verde).



Fonte: própria do autor

Na **Figura 4.10** observa-se o potencial Zeta da interação dos PQC e da RB que resultou no valor de potencial de -28,3 mV. Portanto, os grupos funcionais presentes na superfície dos PQC, confirmados nas análises de XPS e FTIR, alteraram o potencial Zeta na presença dos analitos.

Figura 4.10 – Gráfico de potencial Zeta dos PQC (azul) e PQC/RB (vermelho).



Fonte: própria do autor

4.2.6 Propriedades ópticas dos PQC

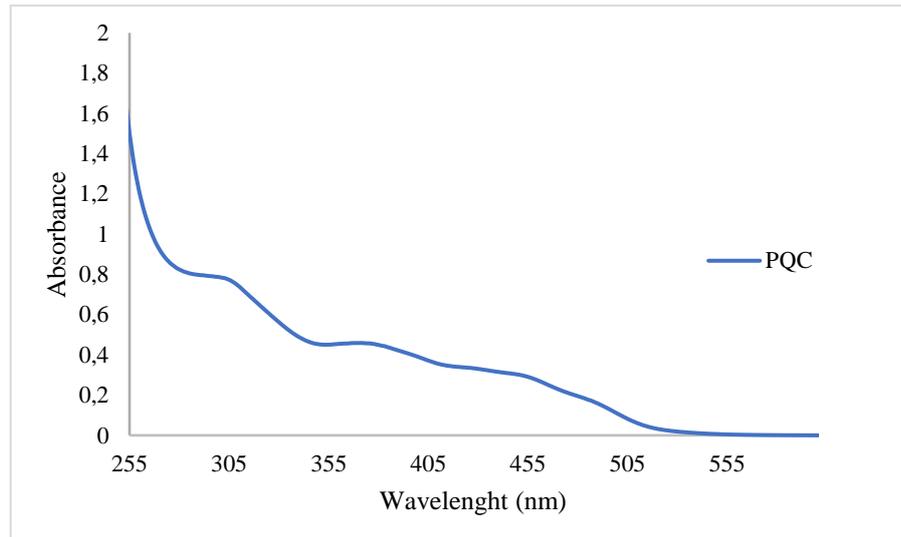
As propriedades ópticas das sínteses dos PQC foram analisadas por espectrofotometria de absorção UV e fluorescência molecular.

4.2.6.1 Espectrofotometria de absorção UV dos pontos quânticos de carbono

A investigação da absorção dos PQC foi realizada com a síntese que resultou no maior RQF. Na **Figura 4.11** observa-se uma forte banda de absorção em 305 nm que corresponde as ligações C=C e C=N de transição eletrônica $\pi-\pi^*$ de anéis aromáticos e outra banda em 380 nm de transição eletrônica $n-\pi^*$ de ligação C=O que confirma a presença de grupos orgânicos

contendo oxigênio nos PQC (Long *et al.*, 2020; Jia *et al.*, 2022). Ozyurt e colaboradores (2023) complementa que bandas acima de 500 nm correspondem as ligações C=S e S=O de transição π - π^* e n- π^* , respectivamente.

Figura 4.11 – Espectros de absorção molecular da síntese de PQC pelo método assistido por micro-ondas



Fonte: própria do autor

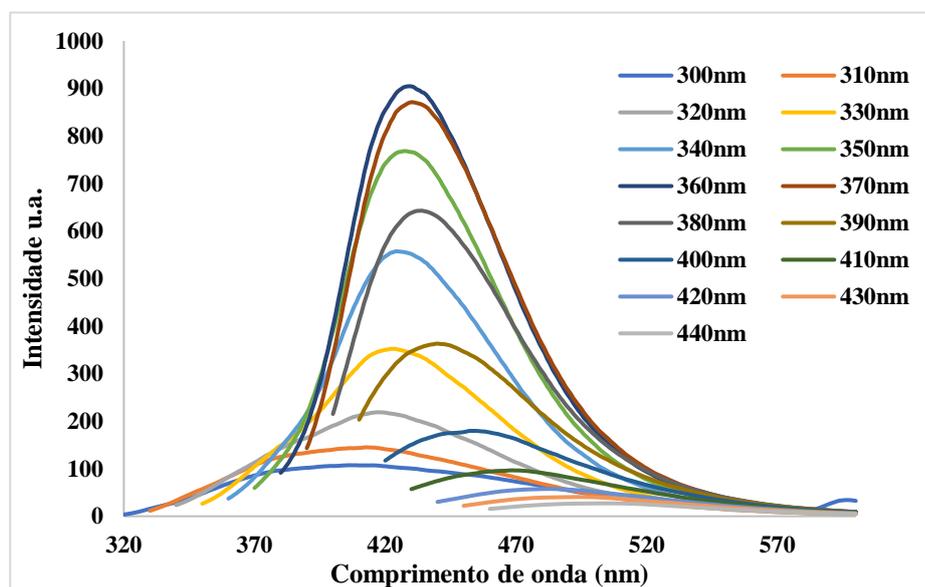
Segundo Nair e colaboradores (2020) a funcionalização produz efeitos significativos na banda de absorção dos PQC, devido a adição de elementos químicos ou grupos orgânicos que alteram a estrutura das nanopartículas quando empregado diferentes métodos de síntese. Machado e colaboradores (2015) complementam que as propriedades ópticas de absorção são dependentes do tamanho das nanopartículas e, diferentes de sínteses podem deslocar o comprimento de onda da banda.

4.2.6.2 Fluorescência molecular dos pontos quânticos de carbono

O espectro de emissão de fluorescência dos PQC foi investigado variando o comprimento de onda de excitação de 300 nm a 440 nm com um incremento de 10 nm. Na **Figura 4.12** observa-se o espectro de fluorescência molecular das nanopartículas que exibem um comprimento de onda de emissão de maior intensidade em 430 nm para comprimento de onda excitação máxima de 360 nm. Além disso, verifica-se a diminuição de intensidade das bandas do comprimento de onda de emissão na faixa de 433 nm a 520 nm com notável deslocamento para maiores comprimentos de onda.

O sinal de emissão de fluorescência exibe um comportamento dependente da excitação que pode ser atribuída ao tamanho das nanopartículas, a quantidade de ligações C=C de anéis aromáticos, e ao estado de superfície produzidos pelos grupos oxigenados e nitrogenados na superfície dos PQC (Long *et al.*, 2020; Jorns e Pappas, 2021). Tang e colaboradores (2021) complementa que essa dependência está associada a homogeneidade do tamanho das nanopartículas e a quantidade de armadilhas emissivas dos grupos funcionais hidroxilas, carboxilas e amidas que possivelmente existem nas nanopartículas desse trabalho.

Figura 4.12 – Espectros de emissão de fluorescência dos PQC em função do comprimento de onda de excitação variando de 300 a 440 nm.



Fonte: própria do autor

Vale ressaltar que os espectros de fluorescência molecular mostrados na **Figura 4.12** foram medidos com o PQC que obteve maior RQF, sem a otimização dos parâmetros e empregando o espectrofluorímetro da Agilent Cary Eclipse.

4.3 Rendimento quântico de fluorescência dos pontos quânticos de carbono

O RQF dos PQC foi utilizado na investigação do fenômeno de fluorescência das nanopartículas sintetizadas pelo método assistido por micro-ondas de uso doméstico nos tempos de 1 a 10 min, baseado na **Equação 3.1**.

Na **Tabela 4.1**, observa-se que PQC3 com 8,9 % obteve o melhor RQF no estudo da variação do tempo de síntese, mantendo-se as concentrações dos precursores constantes. As demais sínteses obtiveram valores de RQF abaixo de 8,9 %. Compreende-se que a formação de

PQC consiste nas etapas de desidratação, polimerização, carbonização e funcionalização (Li *et al.*, 2023). Dessa forma, o curto tempo de síntese resulta em processos de carbonização e funcionalização incompletos, dificultando a formação de grupos funcionalizados na superfície das nanopartículas (Li *et al.*, 2021). Em contrapartida, o aumento de tempo e temperatura pode ocasionar a decomposição dos grupos funcionalizados na superfície dos PQC, provocando a diminuição da intensidade de fluorescência (Tian *et al.*, 2021; Sahoo *et al.*, 2020).

Tabela 4.1 – Dados do RQF dos PQC produzidos a partir precursores EDTA, tiosulfato de sódio e ureia variando o tempo de síntese pelo método assistido por micro-ondas.

Síntese	Tempo (min)	RQF (%)
PQC1	1,0	0
PQC2	1,5	3,2
PQC 3	2,0	8,9
PQC4	4,0	7,6
PQC5	6,0	7,3
PQC6	8,0	6,5
PQC7	10,0	7,3

Para a complementação do estudo foi utilizado o sistema de ultrassom por 5,0 min para efetuar a homogeneização das misturas dos precursores, seguido de uso do sistema de micro-ondas em condições otimizadas de síntese. Contudo, a homogeneização usando o sistema de ultrassom, resultou em diminuição do RQF para 8,1 %. Segundo Das e colaboradores (2021) o uso do sistema de ultrassom promove a formação de nanomateriais por cavitação podendo alterar a formação das nanopartículas baseado na viscosidade do solvente, na potência e frequência do instrumento e no tempo de permanência da mistura. Portanto, o uso do sistema de ultrassom possivelmente modificou as propriedades das nanopartículas diminuindo o RQF.

As misturas de EDTA e tiosulfato de sódio, EDTA e ureia e tiosulfato de sódio e ureia empregando o tempo de síntese de 2,0 min foram avaliadas, mas não exibiram fluorescência. Segundo Li e colaboradores (2021) para a obtenção de PQC com alto RQF, deve-se utilizar uma adequada temperatura que garanta a formação de ligações sp² no núcleo de carbono e a funcionalização da superfície das nanopartículas. Contudo, baixa temperatura não favorecem a funcionalização e alta temperatura provoca deficiência na funcionalização, levando a formação de PQC não fluorescentes ou com baixo RQF. Logo, uma nova otimização dos parâmetros de síntese deveria ser realizada, a partir dessas misturas, para investigar o aumento do RQF.

Para os estudos subsequentes, foram definidos o tempo de 2,0 min e RQF de 8,9 % para a síntese das nanopartículas a partir de EDTA, tiosulfato de sódio e ureia. Dessa forma, o

estudo de otimização dos parâmetros analíticos utilizando os PQC viabilizará a determinação de AA e RB empregando dois instrumentos de fluorescência molecular.

4.4 Medidas no espectrofluorímetro Cary Eclipse Agilent

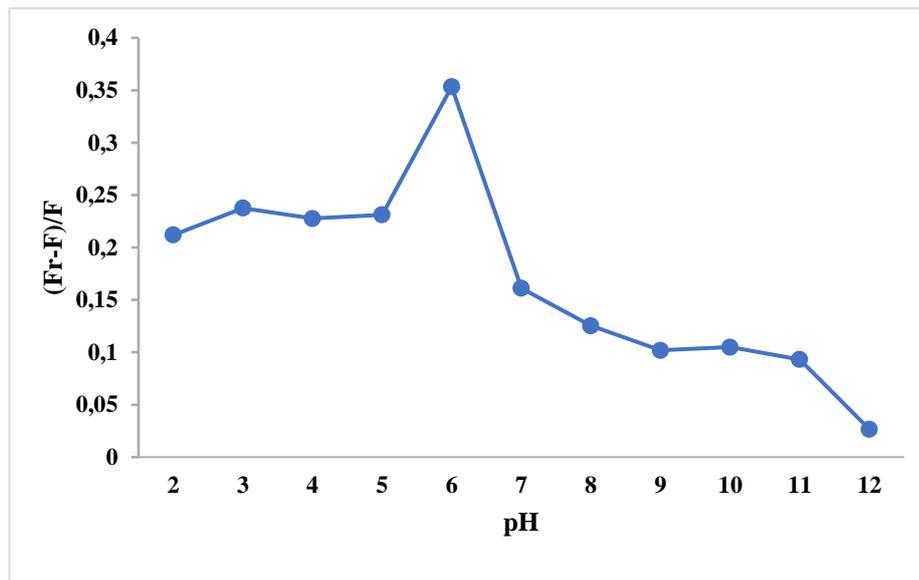
4.4.1 Otimização dos parâmetros analíticos

Com o intuito de avaliar as condições experimentais do uso dos PQC na determinação da solução padrão de AA e RB, foram estudados alguns fatores que podem afetar a detecção incluindo a variação do pH, a concentração dos PQC, o volume de tampão BR, a concentração do NaCl, a concentração de íon cromo(VI) e tempo de reação, sendo que alguns desses fatores foram otimizados empregando o planejamento fatorial 2^4 e 2^3 .

4.4.1.1 Estudo do efeito do pH

O estudo do efeito do pH foi realizado de forma univariada, devido a sua importância nas medidas de fluorescência dos PQC. Na determinação da solução padrão de AA, o melhor resultado do estudo do efeito do pH foi em meio levemente ácido empregando o tampão BR pH 6. Na **Figura 4.13** observa-se o comportamento crescente e decrescente do sinal de retorno da fluorescência dos PQC na faixa de pH 2 a 6 e pH 6 a 12, respectivamente.

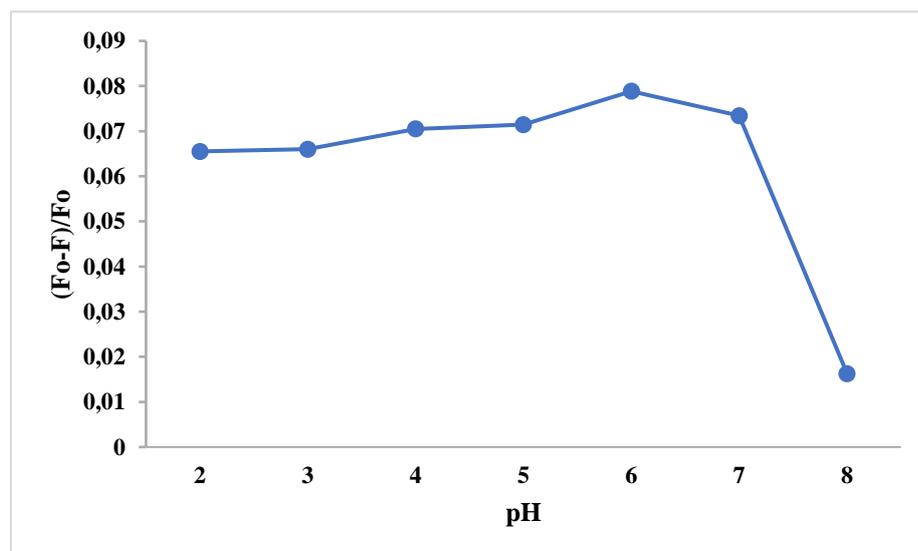
Figura 4.13 – Variação da intensidade de fluorescência dos PQC em função do pH para ácido ascórbico



Fonte: própria do autor

No estudo de variação de pH para a solução padrão de RB, o melhor resultado correspondeu à solução-tampão BR pH 6. Conforme a **Figura 4.14** observa-se o comportamento crescente e decrescente do sinal de fluorescência na faixa de pH 2 a 6 e 6 a 8, respectivamente.

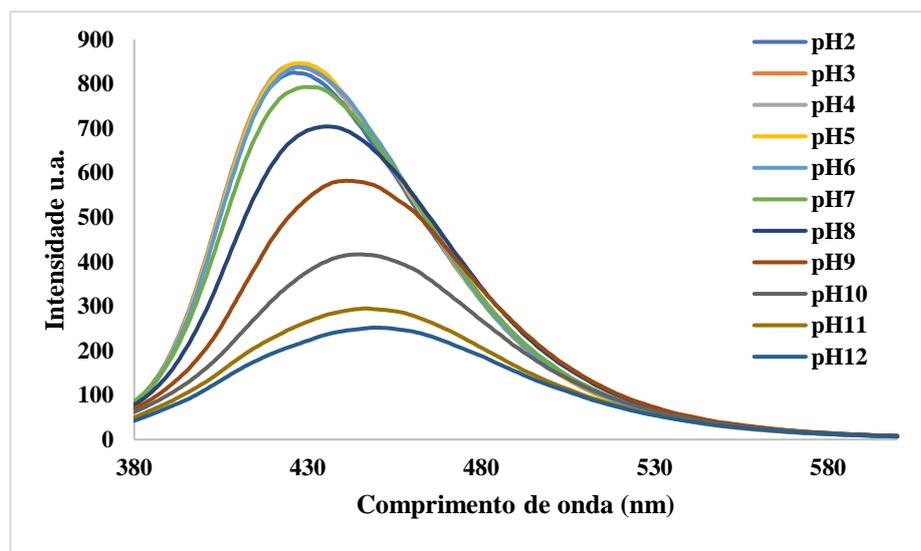
Figura 4.14 – Variação da intensidade de fluorescência dos PQC em função do pH para riboflavina.



Fonte: própria do autor

Em suma, percebe-se a dependência da intensidade de fluorescência na faixa de 2 a 12 para o AA e 2 a 8 para a RB, sendo a condição de pH 6 a melhor para os dois analitos. Segundo Meierhofer e colaboradores (2020) a natureza do meio pode alterar a intensidade de fluorescência dos PQC e sua interação com o analito. Hu, Zhu e Zhao (2021) complementam que essa alteração nas propriedades fluorescentes dos PQC é evidenciada pela presença de grupos orgânicos funcionalizado na superfície dos PQC como -OH, -COOH, -NH₂ e HS-, com capacidade de protonação e desprotonação. Portanto, a funcionalização dos PQC e a natureza do meio provoca à competição entre os processos de transição não radiativa e a luminescência do material, modificando a intensidade do espectro de emissão (**Figura 4.15**) (Hu; Zhu; Zhao, 2021).

Figura 4.15 – Variação da intensidade de fluorescência dos PQC em função do pH sem a presença dos os analitos.



Fonte: própria do autor

4.4.1.2 Planejamento fatorial

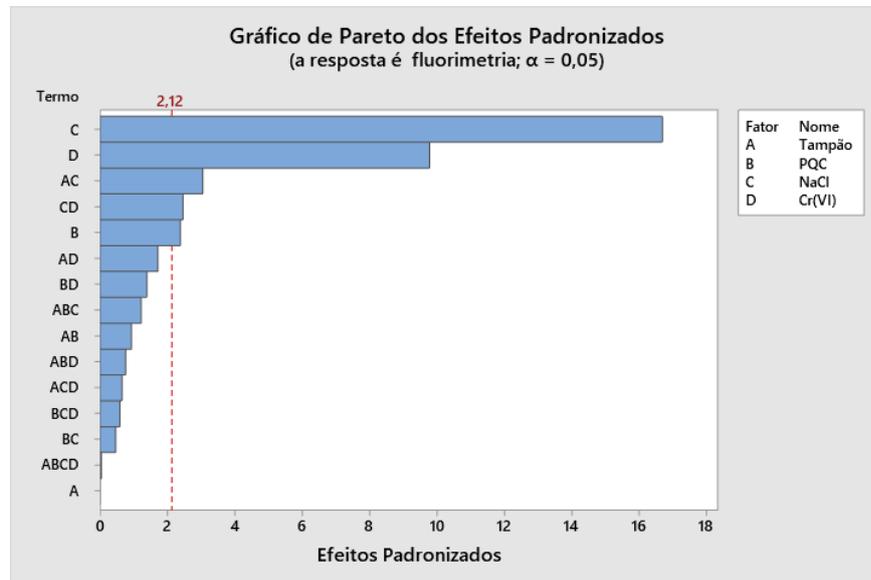
O planejamento fatorial 2⁴ foi realizado na determinação de AA. Na **Tabela 4.2**, consta-se que os valores das medidas são significativos na presença do sal NaCl. Contudo, o melhor resultado foi a medida número 15 composta das variáveis volume de tampão 200 µL, volume de PQC 200 µL, concentração de NaCl 0,5 mol L⁻¹ e concentração de íon cromo(VI) 30 µg mL⁻¹.

Tabela 4.2 – Planejamento fatorial 2^4 de quatro variáveis independentes e a codificação dos parâmetros: **X1** - Volume de tampão: 200 (-) e 300 (+), **X2** - Volume de PQC: 100 (-) e 200 (+), **X3** – Concentração de NaCl: 0 mol L⁻¹ (-) e 0,5 mol L⁻¹ (+), e **X4** -Concentração de íon cromo(VI):20 µg mL⁻¹ (-) e 30 µg mL⁻¹ (+)

Parâmetros	X1	X2	X3	X4	Fluorescência (média)
1	-	-	-	-	0,26±0,001
2	+	-	-	-	0,28±0,001
3	-	+	-	-	0,32±0,001
4	+	+	-	-	0,38±0,022
5	-	-	+	-	0,56±0,039
6	+	-	+	-	0,50±0,018
7	-	+	+	-	0,64±0,0002
8	+	+	+	-	0,52±0,028
9	-	-	-	+	0,39±0,065
10	+	-	-	+	0,47±0,019
11	-	+	-	+	0,41±0,101
12	+	+	-	+	0,47±0,005
13	-	-	+	+	0,73±0,009
14	+	-	+	+	0,77±0,008
15	-	+	+	+	0,80±0,019
16	+	+	+	+	0,74±0,0137

As variáveis relevantes, com base na interpretação do diagrama de Pareto, foram a concentração da solução de NaCl, a concentração de íon cromo(VI), a interação do volume de solução-tampão BR pH 6 com a solução de NaCl 0,5 mol L⁻¹, a interação da solução de NaCl 0,5 mol L⁻¹ com a concentração de íon cromo(VI), e volume de PQC, seguido das demais interações (**Figura 4.16**).

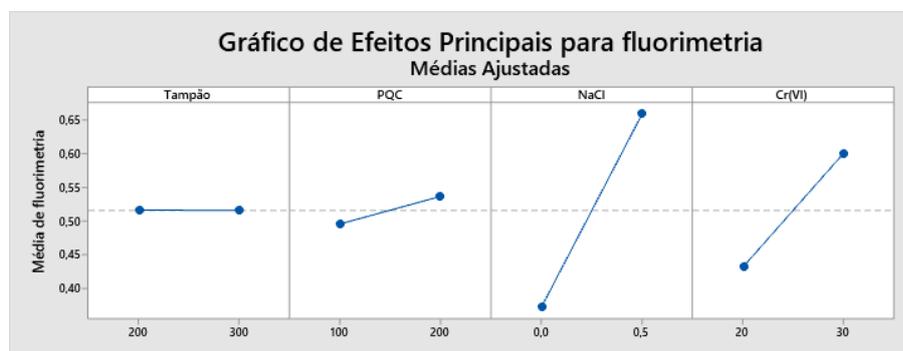
Figura 4.16 – Diagrama de Pareto com as variáveis volume de tampão, volume de PQC, concentração de NaCl e concentração de íon cromo(VI), e suas respectivas interações.



Fonte: própria do autor

Na **Figura 4.17** observa-se que o efeito da variável volume de tampão não afeta significativamente a intensidade de fluorescência dos PQC, sendo usando o volume de 200 μL evidenciado na **Tabela 4.2**. Com relação ao volume de PQC, o melhor resultado foi o volume de 200 μL . As variáveis concentração de NaCl 0,5 mol L^{-1} e concentração de íon cromo(VI) 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtiveram valores significativos que intensificam o retorno da fluorescência dos PQC.

Figura 4.17 – Gráfico dos efeitos das variáveis volume de tampão, volume de PQC, concentração de NaCl e concentração de íon cromo(VI) analisadas individualmente

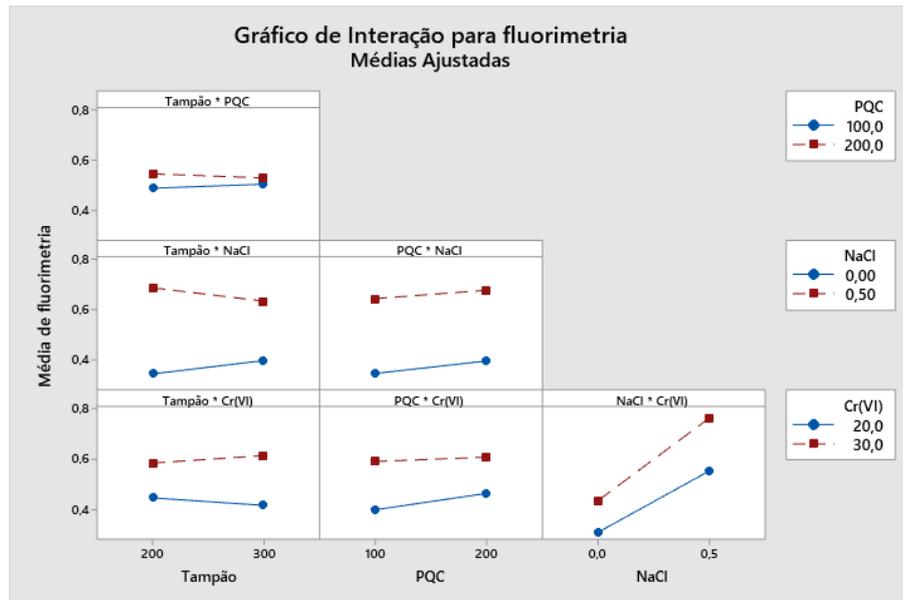


Fonte: própria do autor

Conforme observado na **Figura 4.18** a interação da concentração de íon cromo(V) 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com concentração de NaCl 0,5 mol L^{-1} resultou no melhor sinal do retorno de fluorescência, seguido da interação volume de PQC com concentração de íon cromo(VI) correspondendo ao volume de 200 μL . O volume da solução-tampão correspondeu a um valor

acentuado apenas na concentração de íon cromo(VI) $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, considerando o melhor resultado no volume de $200 \mu\text{L}$. A concentração de NaCl obteve melhor resposta em todas as interações, exceto no volume de tampão de $300 \mu\text{L}$ que ocasionou a diminuição da intensidade de fluorescência.

Figura 4.18 – Gráfico das interações das variáveis volume de tampão, volume de PQC, concentração de NaCl e concentração de íon cromo(VI)



Fonte: própria do autor

Segundo Das e colaboradores (2017) a alteração da intensidade de fluorescência dos PQC pode estar associada a presença da solução de NaCl. Esse efeito contribui para a agregação ou dispersão dos PQC, que pode ser controlada pelas interações iônicas do sal. A importância desse efeito na emissão de fluorescência é a viabilidade em aplicações sob condições ambientais extremas, devido à alteração das propriedades de fluorescência na presença de concentrações elevadas de sal (Das *et al.*, 2017).

Com relação a variáveis concentrações íon cromo(VI), consta-se que a sensibilidade analítica é dependente da concentração do sensor com PQC, portanto, em concentrações abaixo de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de íon cromo(VI) a supressão da fluorescência dos PQC não é significativa, resultando numa estreita faixa linear para a determinação de AA. Em concentrações acima de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ de íons cromo(VI) nesse sistema, o AA reage tanto com o sensor PQC/Cr(VI) quanto com os íons cromo(VI) dispersos na solução, diminuindo a sensibilidade de determinação de AA (Jia *et al.*, 2022). Assim, a melhor resposta foi a concentração de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ de íon cromo(VI). Sobre os volumes de solução-tampão BR pH 6 e de solução de PQC,

não houve mudanças significativas ao analisá-los individualmente e sob a influência da interação entre eles.

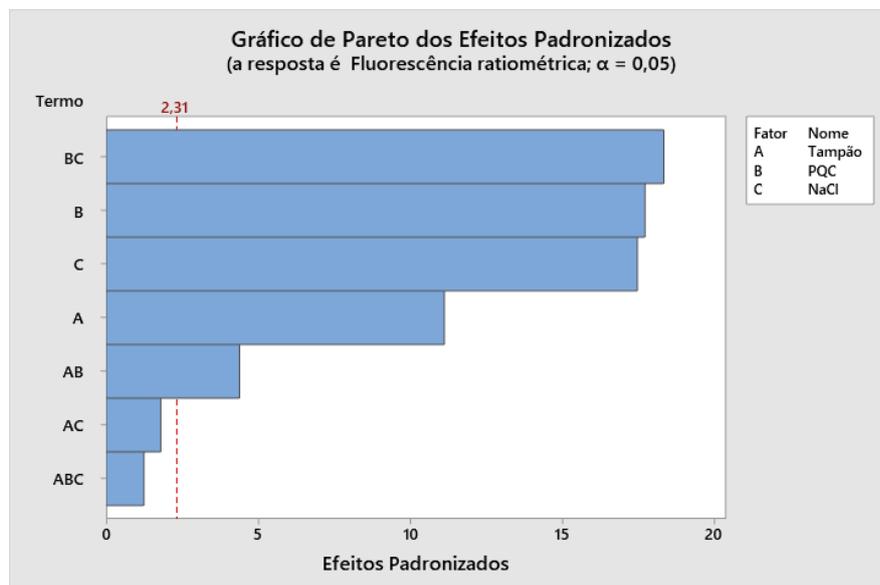
No planejamento fatorial 2^3 usado na determinação de RB, consta-se que o melhor resultado foi a medida número 5 composta das variáveis volume de tampão 200 μL , volume de PQC 100 μL e concentração de NaCl 0,5 mol L^{-1} (**Tabela 4.3**).

Tabela 4.3 – planejamento fatorial 2^3 de três variáveis independentes e a codificação dos parâmetros: **X1** - Volume de tampão: 200 (-) e 300 (+); **X2** - Volume de PQC: 100 (-) e 200 (+); e **X3** – Concentração de NaCl: 0 mol L^{-1} (-) e 0.5 mol L^{-1} (+)

Parâmetros	X1	X2	X3	Fluorescência (média)
1	-	-	-	0,018 \pm 0,0002
2	+	-	-	0,015 \pm 0,0002
3	-	+	-	0,020 \pm 0,0005
4	+	+	-	0,013 \pm 0,0007
5	-	-	+	0,037 \pm 0,0004
6	+	-	+	0,033 \pm 0,0003
7	-	+	+	0,021 \pm 0,0014
8	+	+	+	0,011 \pm 0,0011

As variáveis relevantes, com base na interpretação do diagrama de Pareto, foram a concentração da solução de NaCl com o volume dos PQC, volume dos PQC, a concentração da solução de NaCl, volume do tampão, seguido das demais interações (**Figura 4.19**).

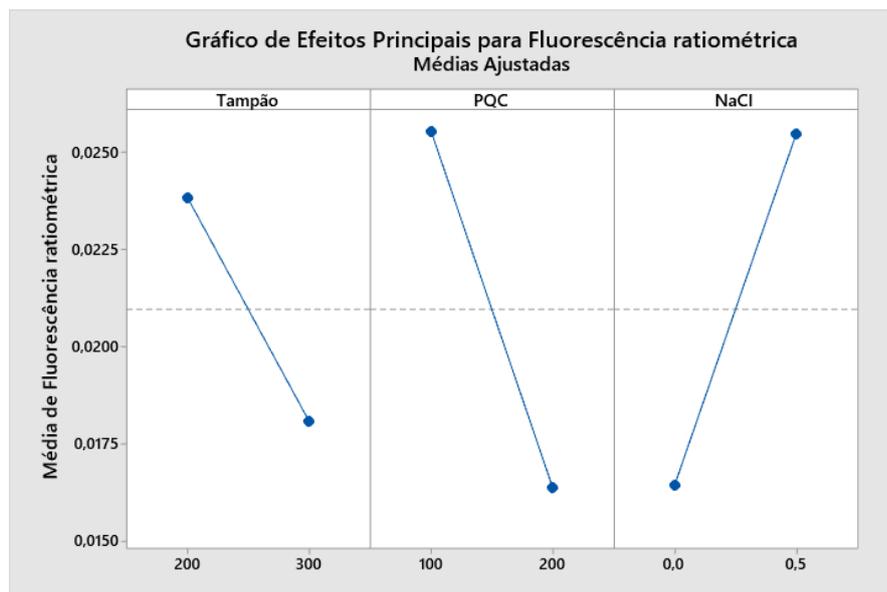
Figura 4.19 – Diagrama de Pareto com a variáveis volume de tampão, volume de PQC e concentração de NaCl, e suas respectivas interações.



Fonte: própria do autor

Na **Figura 4.20**, consta-se que o estudo de efeito das variáveis obteve valores significativos para a intensidade de fluorescência dos PQC. Dessa forma, o volume de tampão que obteve o melhor resultado foi o volume de 200 μL . As variáveis concentração de NaCl 0,5 mol L^{-1} e volume de PQC 100 μL resultaram nos melhores valores da intensidade de fluorescência.

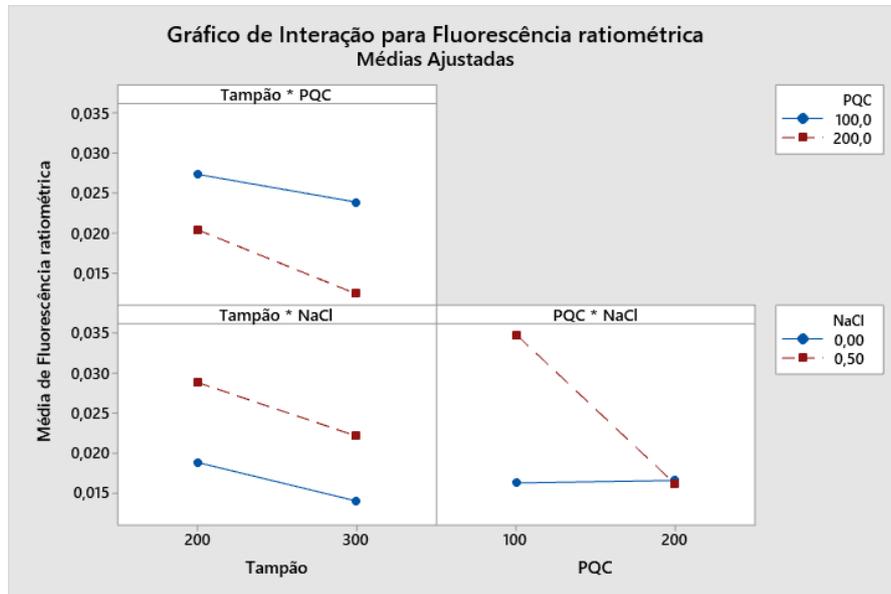
Figura 4.20 – Gráfico dos efeitos das variáveis volume de tampão, volume de PQC, concentração de NaCl e concentração de íon cromo(VI) analisadas individualmente



Fonte: própria do autor

Na **Figura 4.21**, observa-se que a interação do volume de tampão e volume de PQC a intensidade de fluorescência diminuiu quando o volume de tampão aumentou para 300 μL . Seguindo o mesmo fenômeno, o volume de tampão e concentração de NaCl diminuíram com o aumento do volume de tampão. A interação volume de PQC 100 μL e concentração de NaCl 0,5 mol L^{-1} é significativa e aumenta a resposta de efeito *quenching*.

Figura 4.21 – Gráfico das interações das variáveis volume de tampão, volume de PQC e concentração de NaCl



Fonte: própria do autor

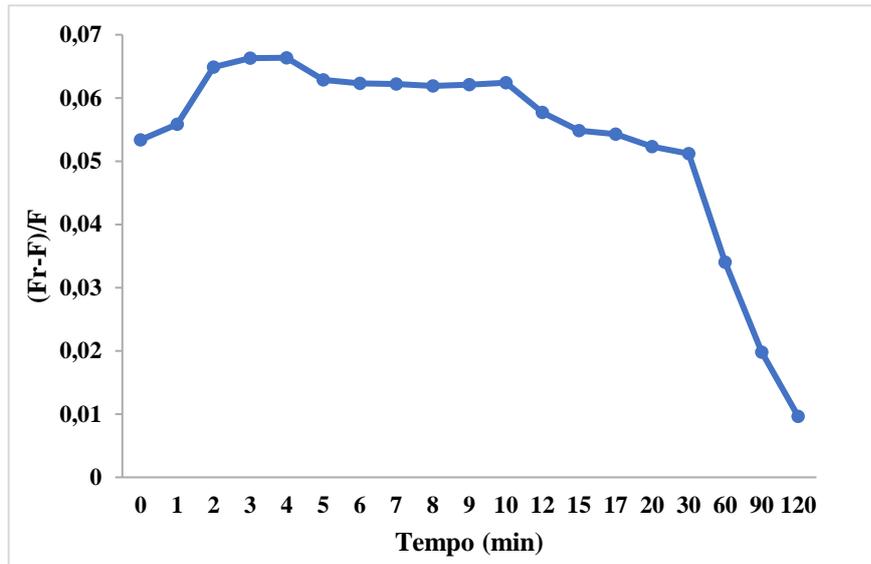
Nos dois sistemas a maior influência na intensidade de fluorescência é a presença desse sal na mistura. Segundo Zulfajri, Rassol e Huang (2020) a alteração da emissão de fluorescência é possivelmente favorecida pela presença de grupos orgânicos ionizáveis na superfície dos PQC que promovem interações eletrostáticas com o analito.

Outra variável destacada é o volume da solução dos PQC que resultou na melhor resposta para o volume de 100 µL. Esse comportamento para volume menor de PQC pode estar associado ao processo de reabsorção de fluorescência em solução contendo quantidade elevada de nanopartículas de carbono (Fonin *et al.*, 2014). Portanto, o processo de otimização dos PQC melhora a sensibilidade do método e a intensidade de fluorescência.

4.4.1.3 Tempo de repulso da solução analítica

O efeito do tempo repouso da solução analítica foi investigado na determinação de AA e RB, individualmente. Para a determinação de AA, verifica-se que ocorre a estabilização da intensidade de fluorescência em 2 min após homogeneização do sistema PQC/Cr(VI)/AA (**Figura 4.22**). Contudo, a fluorescência diminui a partir de 10 min, evidenciando a rápida reação entre o sensor PQC/Cr(VI) e o AA. Logo, o tempo de repouso utilizado na determinação de AA foi 3 min.

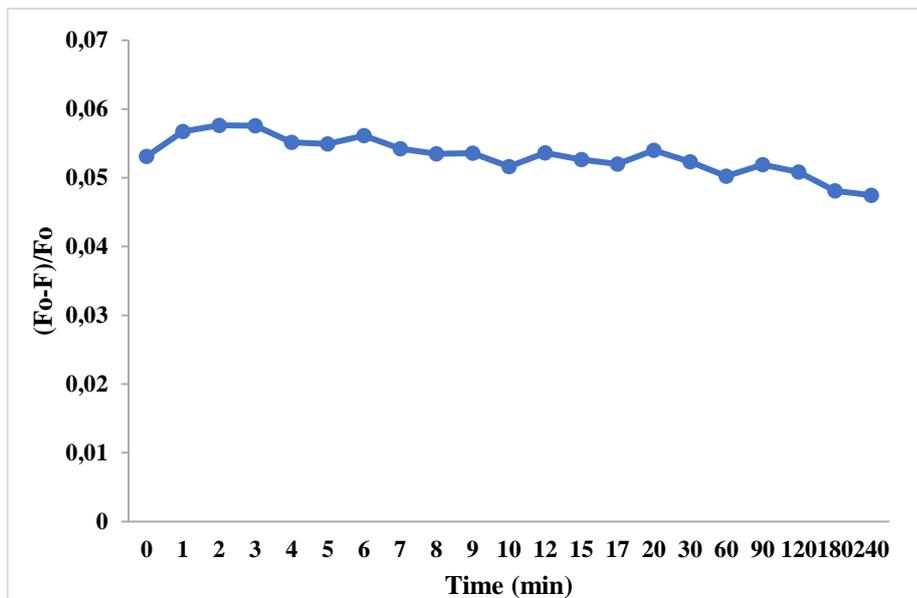
Figura 4.22 – Efeito do tempo repouso de solução analítica PQC/Cr(VI)/AA $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ na faixa de 0 a 120 min.



Fonte: própria do autor

Na **Figura 4.23** verifica-se que a intensidade de fluorescência decresce suavemente a partir de 4 min, após a homogeneização da solução analítica de PQC/RB. Portanto, o tempo de repouso empregado nas medidas experimentais de RB foi 2 min.

Figura 4.23 – Efeito do tempo de repouso de solução analítica PQC/RB $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ na faixa de 0 a 240 min



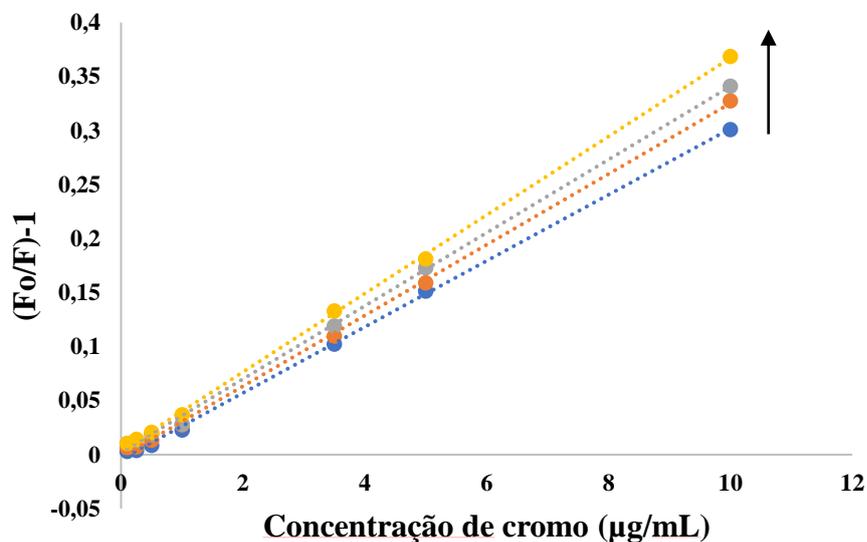
Fonte: própria do autor

Esses resultados foram melhores que o tempo reacional de Msto e colaboradores (2023) ao determinarem o teor de ácido ascórbico em fruta laranja por 15 min, após a formação do sensor PQC/Fe³⁺, e Chen e colaboradores (2024) ao determinarem o teor de riboflavina em soro humana com agitação por 8 min seguido da realização das medidas no instrumental.

4.4.2 Mecanismo *quenching* de Fluorescência

O mecanismo *quenching* foi realizado em quatro diferentes mecanismos descritos na literatura, incluindo *quenching* estático, dinâmico, IFE e FRET (Hu *et al.*, 2022). Inicialmente, observa-se a diferença entre *quenching* estático e dinâmico pela equação de Stern-Volmer. Na **Figura 4.24** verifica-se que o aumento de sensibilidade analítica com o aumento de temperatura, corresponde ao *quenching* dinâmico causado pelo aumento das colisões entre o íon cromo(VI) e os PQC (Zu *et al.*, 2017). Vale ressaltar que a adição da solução de AA no sensor PQC/Cr(VI) suprimiu o efeito *quenching*, desativando ou enfraquecendo o mecanismo de fluorescência (Tian *et al.*, 2021).

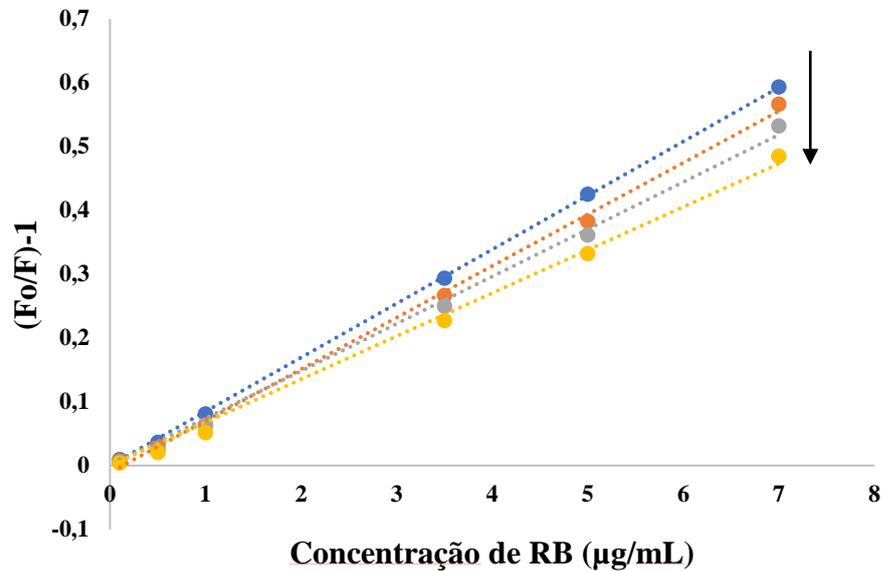
Figura 4.24 – Curva analítica entre a intensidade de fluorescência dos PQC e concentrações da solução de íon cromo(VI) em quatro temperaturas diferentes: 13°C; 25°C; 30°C e 40 °C



Fonte: própria do autor

Com relação interação PQC/RB, a sensibilidade analítica diminui com o aumento de temperatura de 13 a 40 °C, evidenciando o *quenching* estático (**Figura 4.24**) no qual a diminuição de temperatura favorece a formação do complexo no estado fundamental (Zu *et al.*, 2017; Molaei, 2020).

Figura 4.25 – Curva analítica entre a intensidade de fluorescência dos PQC e concentrações da solução de RB em quatro temperaturas diferentes em quatro temperaturas diferentes: 13°C; 25°C; 30°C e 40 °C

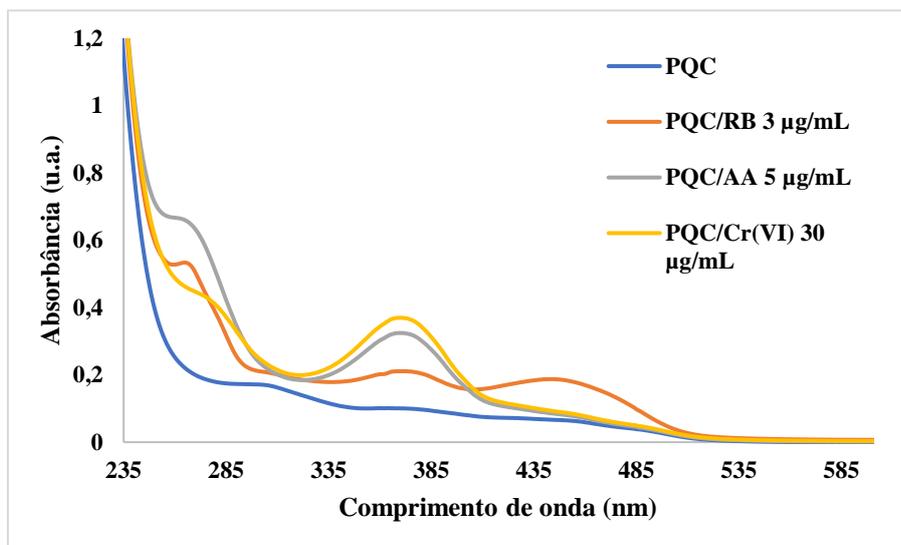


Fonte: própria do autor

O espectro de absorção dos PQC com e sem a presença dos analitos foi investigado para a possível da formação dos complexos PQC/Cr(VI) e PQC/RB. Na **Figura 4.26** observa-se outra possível confirmação do *quenching* dinâmico quando a adição do íon cromo(VI) na solução de PQC exibe apenas uma banda em 373 nm, que sobrepõe a banda registrada em 376 nm da solução de PQC (Jayweera *et al.*, 2018). Além disso, destaca-se a estratégia *on-off-on* na diminuição da banda em 373 nm, devido a adição da solução de AA no sensor PQC/Cr(VI), resultando no retorno do sinal de absorção dos PQC.

Para o sistema PQC/RB, o efeito *quenching* estático é evidenciado pela possível formação do complexo avaliado pela comparação dos espectros com e sem RB. Em geral, o efeito *quenching* gerado nos mecanismos estático e dinâmico promove a distribuição dos estados de energia e aumenta a recombinação não radiativa de elétron/buraco dos PQC (Xu *et al.*, 2022).

Figura 4.26 – Espectro de absorção dos PQC com e sem a presença dos analitos

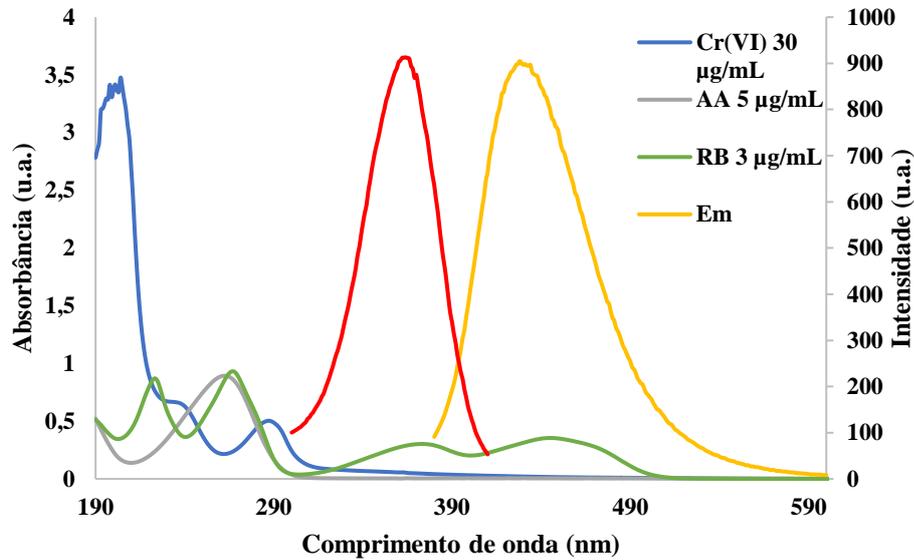


Fonte: própria do autor

Os mecanismos FRET e IFE são inicialmente identificados pela sobreposição espectral entre o espectro de absorção do analito e o espectro de emissão e/ou excitação da solução de PQC (Zu *et al.*, 2017). Na **Figura 4.27** o mecanismo IFE e FRET não são aplicados aos analitos íon cromo(VI) e AA devido à ausência de sobreposição espectral. Contudo, verifica-se que ocorre sobreposição espectral entre a banda de RB em 372 nm e 450 nm, e a banda de emissão e excitação dos PQC em 367 nm e 430 nm, respectivamente (Molaei, 2020). Dessa forma, a equação de Parker e Förster foram utilizadas para distinguir os mecanismos IFE e FRET.

A equação de Parker (Equação 2.2) foi calculada a partir das concentrações analíticas de 0,1; 3 e 7 µg mL⁻¹, resultando nos valores 1,07; 1,25 e 1,51, respectivamente, que possivelmente confirmam o mecanismo IFE. Para a confirmação do mecanismo FRET, foi calculado o raio de transferência de energia usando a equação da distância de Förster (Equação 2.4 e 2.5). Segundo Zu e colaboradores (2017) a distância entre o *quencher* ou analito e os PQC deverá ocorrer na faixa de 1 a 10 nm, e no mecanismo IFE poderá exceder 10 nm. Para tanto, verificou-se que o valor da integral de sobreposição espectral, $J(\lambda)$, é de $1.62 \times 10^{13} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ nm}^4$ e calculou-se o raio de transferência de energia (R_0), resultando em um raio de 34,0 nm, maior que 10 nm, excluindo o mecanismo FRET.

Figura 4.27 – Ilustração dos espectros de emissão e excitação em 430 nm e 360 nm, respectivamente, e bandas de absorbância da solução de íon cromo(VI) e dos analitos AA e RB.

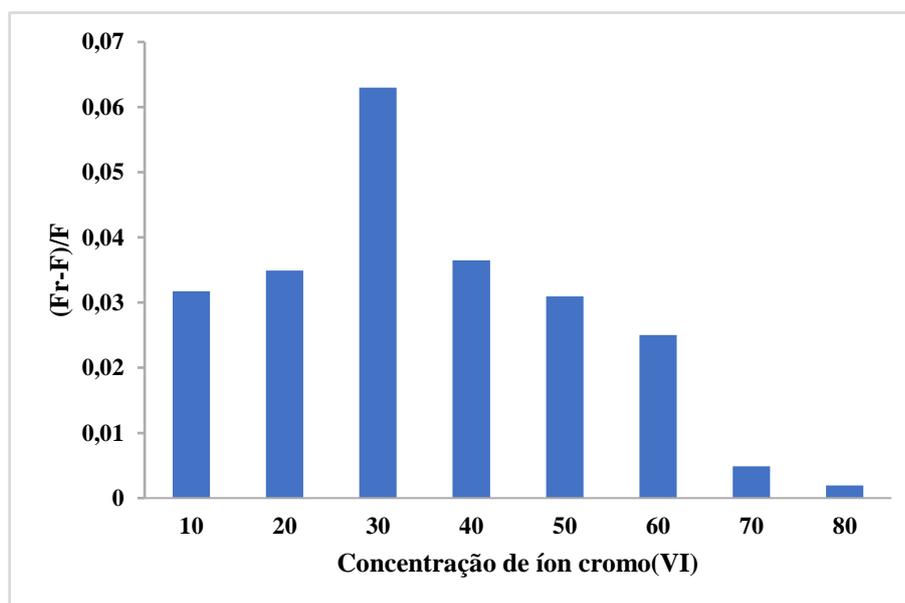


Fonte: própria do autor

4.4.3 Estudo da sensibilidade analítica do sensor PQC/Cr(VI)

A estratégia *on-off-on* foi utilizada na determinação de AA pela formação do sistema *on-off* de sensor PQC/Cr(VI) que diminuí a fluorescência por efeito *quenching*, e formação do sistema *off-on* que restaura a fluorescência quando adicionado soluções de AA na mistura. Portanto, na **Figura 4.28** observa-se crescentes valores de restauração de fluorescência usando a faixa da concentração de íon cromo(VI) 10 a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e decréscimo de 40 a 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Com base nesses resultados a melhor restauração da fluorescência foi a concentração de íon cromo(VI) de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 4.28 – Gráfico do retorno da fluorescência dos PQC variado a concentração de íon cromo(VI) na faixa de 10 a 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$



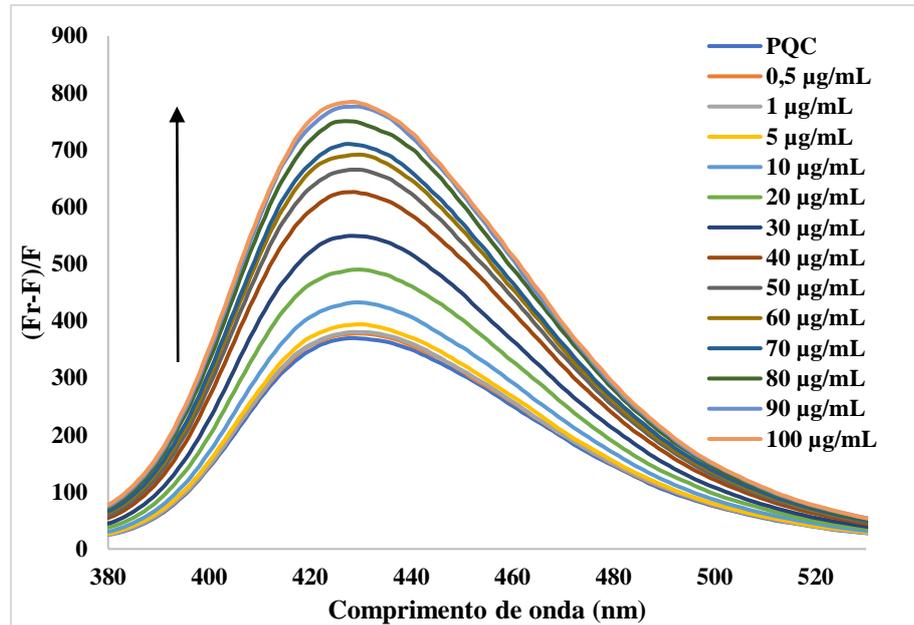
Fonte: própria do autor

Segundo Lathe e Palve (2023), a estratégia *on-off-on* é uma importante ferramenta que reduz íon cromo(VI) a cromo(III) na presença de um agente oxidante que restaura a fluorescência dos PQC. Jia e colaboradores (2022) complementam que a concentração de íon cromo(VI) pode alterar a sensibilidade analítica do sistema devido a competitividade do sensor PQC/Cr(VI) e os íons cromo(VI), ao interagirem com AA, suspensos em solução. Portanto, é demonstrado que a estratégia *on-off-on*, possibilita a determinação quantitativa de AA que será avaliada na curva analítica desse método.

4.4.4 Curva analítica

Sob condições otimizadas, as concentrações de 0,5 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AA foram adicionadas na solução do sensor PQC/Cr(VI) e medido os espectros de emissão de fluorescência. Na **Figura 4.29** observa-se o aumento gradativo da intensidade de fluorescência baseada na supressão do efeito *quenching*. Dessa forma, o íon cromo(VI) no sensor PQC/Cr(VI) propicia a redução a íon cromo(III) pela adição de concentrações crescentes da solução de AA, retornando a fluorescência dos PQC.

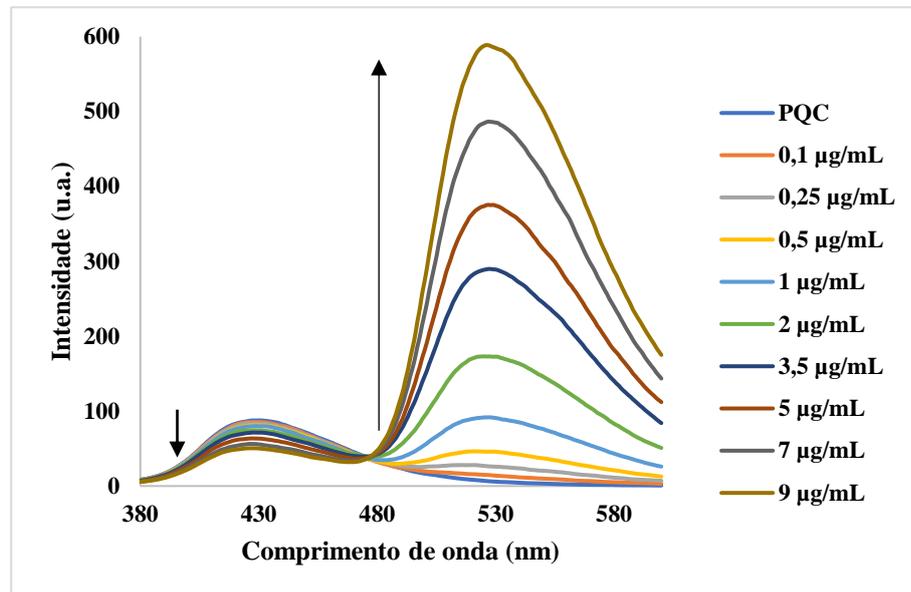
Figura 4.29 – Espectro de fluorescência do sensor PQC/Cr(VI) em diferentes concentrações de AA (0,5 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$).



Fonte: própria do autor

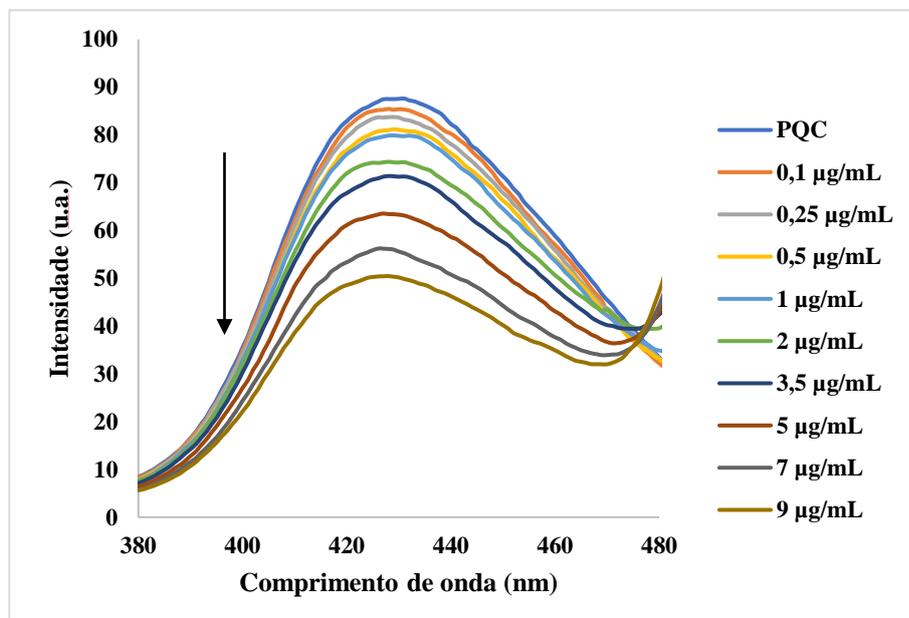
Sob condições otimizadas, os espectros de emissão de fluorescência foram construídos a partir das concentrações de 0,1 a 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de RB adicionadas na solução dos PQC. Na **Figura 4.30** consta-se o decréscimo gradativo da intensidade de fluorescência dos PQC em 430 nm e o aumento gradativo da banda em 530 nm, característica da RB, em função da concentração. Na **Figura 4.31** observa-se apenas o decréscimo da intensidade de fluorescência dos PQC em 430 nm. Vale destacar que a curva analítica foi plotada utilizando as bandas do comprimento de onda emissão em 430 nm. Aplicando-se a equação (I_{430}/I_{530}) , que utiliza a razão entre as duas bandas do espectro, foi evidenciada tendência estatística no gráfico de resíduos, sendo descartada nesse estudo (Lu *et al.*, 2020).

Figura 4.30 – Espectro de fluorescência da solução de PQC em diferentes concentrações de RB (0,1 a $9 \mu\text{g mL}^{-1}$) com banda decrescente em 430 nm e crescente em 530 nm.



Fonte: própria do autor

Figura 4.31 – Espectro de fluorescência da solução de PQC em diferentes concentrações de RB (0,1 a $9 \mu\text{g mL}^{-1}$) com banda decrescente em 430 nm.

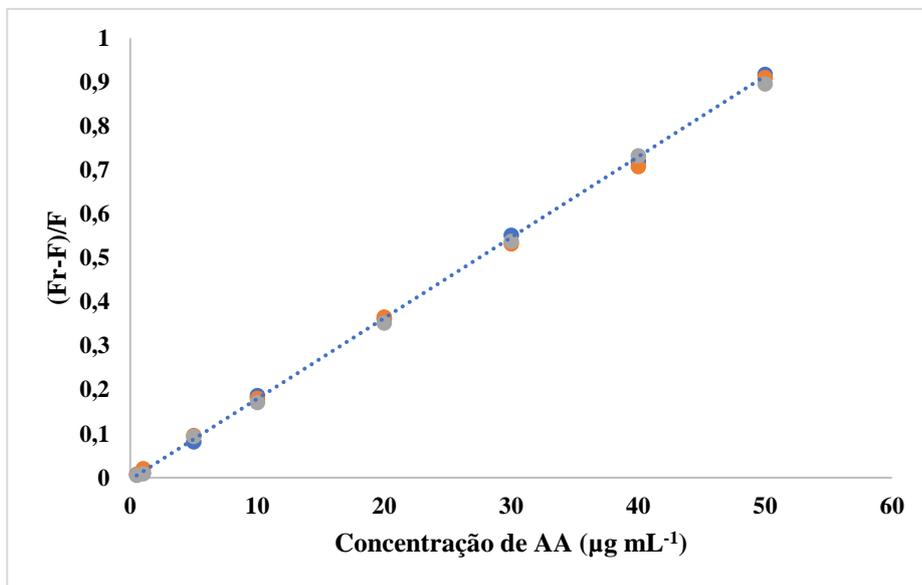


Fonte: própria do autor

4.4.5 Validação do modelo linear

A curva analítica foi construída baseada no retorno de fluorescência, que corresponde ao sinal analítico, utilizando o sensor PQC/Cr(VI) com adição de concentrações da solução de AA na faixa de 0,5 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Na **Figura 4.32**, a correlação entre a supressão do efeito *quenching* e a concentração de AA resultou na relação linear $(Fr-F)/F = 0,0181x - 0,0026$, R^2 igual a 0,9997 e uma faixa linear de trabalho de 0,5 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O resultado do cálculo do limite de detecção e quantificação do AA foi de 0,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,49 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

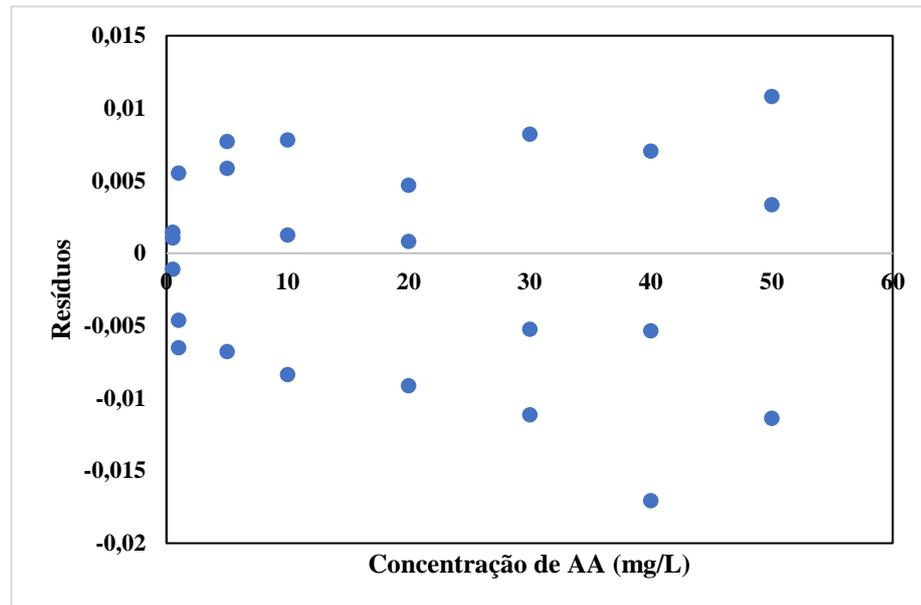
Figura 4.32 – Curva analítica entre a intensidade de fluorescência do sensor PQC/Cr(VI) baseada na equação $(Fr-F)/F$ e concentrações de AA



Fonte: própria do autor

Na **Figura 4.33** consta-se que não existe perfil sistemático que indique falta de ajuste do modelo ao avaliar a distribuição dos resíduos.

Figura 4.33 – Gráfico da distribuição de resíduos pelo modelo na faixa de concentração de 0,50 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AA.



Fonte: própria do autor

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada para avaliar o ajuste do modelo linear da curva analítica e investigar os testes de falta de ajuste e significância estatística de regressão do modelo.

Tabela 4.4 - Resultado da ANOVA calculados para avaliação do modelo com relação ao analito AA

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma quadrática (SQ)	Média quadrática (MQ)
Regressão	1	7.394,16	7.394,16
Resíduo	22	3,91	0,18
Falta de ajuste	6	0,30	0,05
Erro puro	16	3,61	0,23
Total	23	7.398,07	

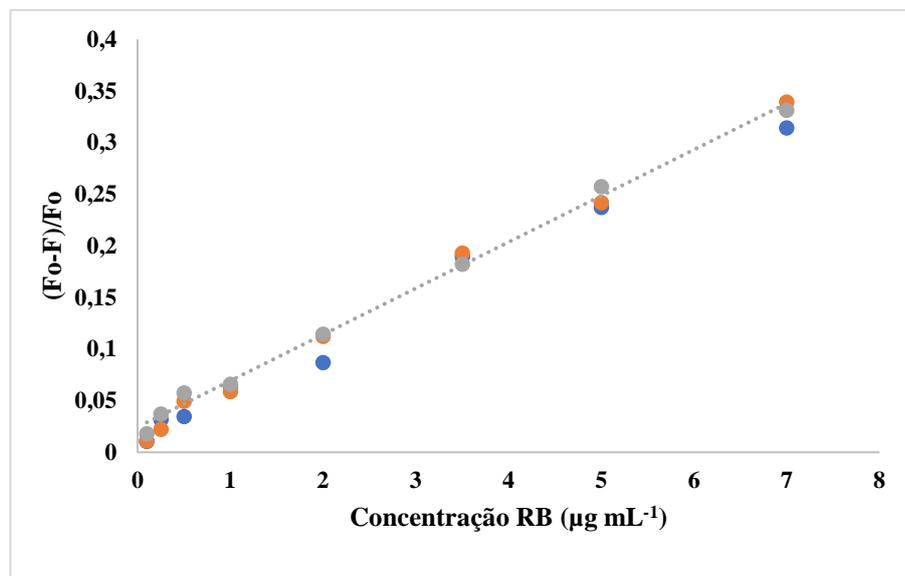
Tabela 4.5 - Resultado dos testes de falta de ajuste e significância de regressão

Sistema proposto		
Grau de liberdade	Falta de ajuste	6
	Significância de regressão	1
Teste F tabelado, 95 % de confiança	Falta de ajuste	0,22
	Significância de regressão	2,74

Nas **Tabela 4.4** e **4.5**, observam-se que a significância de regressão foi avaliada por comparação do valor obtido na razão média quadrática da regressão (MQ_{reg})/ média quadrática residual (MQ_{res}) correspondendo a 41.078,66, com valor crítico de 4,30 de distribuição F a 95 % de confiança. Na falta de ajuste, a razão media quadrática da falta de ajuste ($MQ_{fal.aj.}$) / média quadrática do erro puro (MQ_{er}) corresponde a 0,22, valor inferior quando comparado com o valor tabelado da distribuição F de 2,74, para o nível de confiança estatística de 95 %. Em suma, o modelo linear evidencia uma regressão significativa e não há falta de ajuste de linearidade.

Na **Figura 4.34**, a correlação entre o efeito *quenching* do PQC/RB aplicada na banda em 430 nm e a concentração de RB resultou em uma relação linear expressa pela equação $(F_0 - F)/F_0 = 0,0466x + 0,0156$, com um coeficiente de correlação R^2 igual a 0,9950 e uma faixa linear de trabalho de 0,1 a 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O limite de detecção e quantificação da RB resultou no valor de 0,09 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

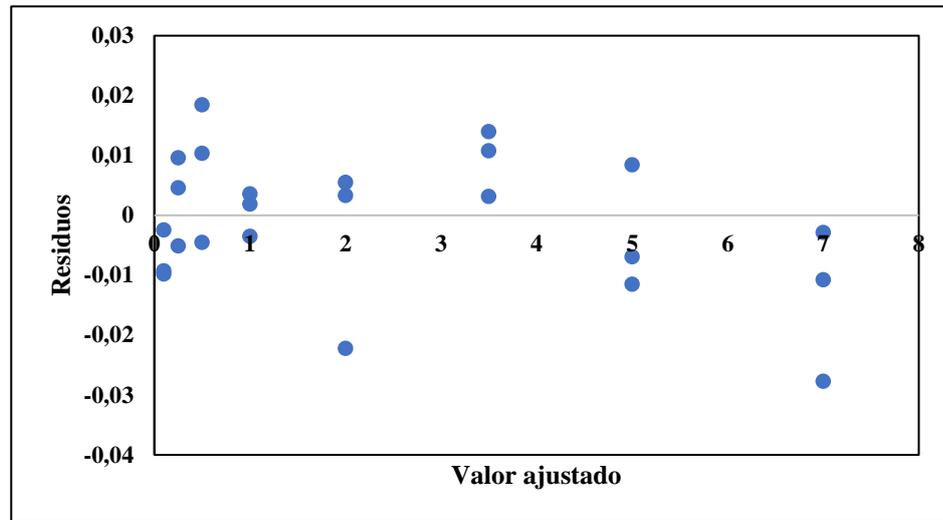
Figura 4.34 – Espectro de fluorescência da solução de PQC em diferentes concentrações de RB (0,1 a 9 $\mu\text{g mL}^{-1}$) no comprimento de onda emissão em 430 nm



Fonte: própria do autor

A distribuição dos resíduos, ilustrada na **Figura 4.35**, evidencia um perfil não sistemático que indique falta de ajuste significativa para modelo.

Figura 4.35 - Gráfico da distribuição de resíduos pelo modelo na faixa de concentração de 0,1 a 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de RB.



Fonte: própria do autor

Baseada nos cálculos da ANOVA foi verificado o ajuste do modelo linear da curva analítica e investigar os testes de falta de ajuste e significância estatística de regressão do modelo (**Tabela 4.6 e 4.7**).

Tabela 4.6 - Resultado da ANOVA calculados para avaliação do modelo para RB

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma quadrática (SQ)	Média quadrática (MQ)
Regressão	1	124,019	124,019
Resíduo	22	1,012	0,046
Falta de ajuste	6	0,325	0,054
Erro puro	16	0,687	0,043
Total	23	125,031	

Tabela 4.7 - Resultado dos testes de falta de ajuste e significância de regressão

Sistema proposto		
Grau de liberdade	Falta de ajuste	6
	Significância de regressão	1
Teste F tabelado, 95 % de confiança	Falta de ajuste	0,12
	Significância de regressão	2,74

Com relação aos resultados das **Tabela 4.6 e 4.7**, verifica-se que a significância de regressão da razão MQ_{reg}/MQ_{res} correspondendo a 2.066,98 obteve um valor superior ao valor crítico de 4,30 de distribuição F a 95 % de confiança. Na falta de ajuste, a razão $MQ_{fal.aj}/MQ_{er}$

corresponde 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 %. Em suma, o modelo linear evidencia uma regressão significativa e não há falta de ajuste de linearidade.

4.4.6 Precisão do método

A investigação da precisão dos métodos analíticos é realizada pela repetitividade, precisão intermediária ou reprodutividade, sendo expressas pelo coeficiente de variação (CV) (Anvisa, 2017). Contudo, nesse trabalho não foi realizado a reprodutividade.

Considerando a primeira semana das medidas na **Tabela 4.8** como repetitividade do método proposto, observa-se que os valores de CV das concentrações de 0,5, 5 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AA correspondem a 3,47 %, 1,82 % e 0,14 %, respectivamente. Esses valores são inferiores ao valor crítico de 5,3 % para concentrações até 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (AOAC, 2016).

Tabela 4.8 – Resultados da precisão intermediária, por três semanas, avaliada para soluções do padrão de AA nas concentrações de 0,5, 5 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$; n = 3.

Semana	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Valor médio da Equação 3.2 (u.a.)	Desvio padrão ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV (%)
1ª semana	0,5	0,0087	0,0003	3,47
	5	0,0722	0,0013	1,82
	20	0,2968	0,0004	0,14
2ª semana	0,5	0,0098	0,0001	1,25
	5	0,0715	0,0011	1,53
	20	0,3028	0,0013	0,44
3ª semana	0,5	0,0092	0,00001	0,49
	5	0,0670	0,0015	2,20
	20	0,3403	0,0022	0,64
4ª semana	0,5	0,0099	0,0004	4,18
	5	0,0695	0,0005	0,70
	20	0,3013	0,0025	0,84

Em comparação com os valores do CV entre semanas, resulta-se que o menor valor obtido foi 0,14 % e o maior valor, 4,18 %. Logo, os valores encontram-se abaixo do valor crítico exigido de 5,3 % para concentrações até 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (INMETRO, 2020).

Na primeira semana das medidas na **Tabela 4.9**, observa-se que a repetitividade do método proposto obteve valores de CV nas concentrações de 0,5, 5 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AA correspondem a 3,61 %, 1,43 % e 0,68 %, respectivamente. Esses valores são inferiores ao valor crítico de 5,3 % para concentrações até 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (AOAC, 2016).

Tabela 4.9 – Resultados da precisão intermediária, por três semanas, avaliada para soluções do padrão de RB nas concentrações de 0,5, 3,5 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; $n = 3$.

Semana	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Valor médio da Equação 3.1 (u.a.)	Desvio padrão ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV (%)
1ª semana	0,5	0,054	0,0019	3,61
	3,5	0,189	0,0027	1,43
	5	0,277	0,0019	0,68
2ª semana	0,5	0,043	0,0003	0,79
	3,5	0,193	0,0029	1,51
	5	0,264	0,0012	0,44
3ª semana	0,5	0,058	0,0016	2,73
	3,5	0,174	0,0011	0,63
	5	0,270	0,0007	0,25
4ª semana	0,5	0,047	0,0018	3,84
	3,5	0,182	0,0006	0,36
	5	0,287	0,0025	0,88

Em comparação com os valores do CV entre semanas, resulta-se que o menor valor obtido foi 0,36 % e o maior valor, 3,84 %. Logo, os valores encontram-se abaixo do valor crítico exigido de 5,3 % para concentrações até 100 mg L^{-1} (INMETRO, 2020).

4.4.7 Recuperação das amostras

Para investigar a recuperação das concentrações de AA utilizando o sensor PQC/Cr(VI), foram selecionadas três amostras líquidas e duas amostras sólidas efervescentes de vitamina C. Na **Tabela 4.10** observa-se a fortificação das amostras empregando as concentrações de AA de 0, 5,0, 20 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ adicionadas individualmente no sensor PQC/Cr(VI). Segundo a Anvisa (2017) a recuperação deverá estar na faixa de 80 a 120 % e um CV menor do que 5 %. Dessa forma, o resultado da recuperação das amostras de AA está na faixa entre 80,72 a 107,72 %, e um CV entre 0,43 e 3,86 %.

Tabela 4.10– Recuperação de AA em suplementos vitamínicos líquidos e efervescentes de vitamina C ($n=3$).

Amostra	Concentração na amostra ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Valor encontrado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV (%)	Recuperação (%)
Amostra líquida 1	0	9,66	2,02	-
	5	14,87	2,75	102,97
	20	28,75	0,54	96,56
	40	46,82	0,65	93,46
Amostra líquida 2	0	9,72	2,75	0
	5	15,03	3,86	106,14

	20	31,27	0,43	107,75
	40	48,12	0,49	95,99
Amostra líquida 3	0	9,88	2,88	-
	5	14,97	2,89	101,97
	20	30,49	0,62	103,06
	40	46,74	0,58	92,17
Amostra sólida 1	0	9,66	0,75	-
	5	14,60	2,68	97,54
	20	28,93	2,55	96,99
	40	46,00	0,64	91,18
Amostra sólida 2	0	9,94	1,44	-
	5	15,55	1,21	97,62
	20	31,57	0,35	102,64
	40	53,39	0,57	107,46

A recuperação da concentração de RB foi avaliada utilizando o efeito *quenching* em amostras de cápsulas de suplementos vitamínicos de RB. Na **Tabela 4.11**, observa-se a recuperação da concentração do padrão de RB de 0, 0,5, 3 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aplicadas nos PQC e nas amostras. Os valores de recuperação das amostras apresentam uma variação entre 85,07 e 112,23 % e um CV entre 0,07 e 4,81 %, a faixa considerada aceitável pela Anvisa.

Tabela 4.11– Recuperação de RB em suplementos vitamínicos de farmácia de manipulação (n=3)

Amostra	Concentração na amostra ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Valor encontrado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV (%)	Recuperação (%)
Amostra 1	0	0,42	3,08	-
	0,5	0,82	4,81	85,07
	3,5	3,86	0,31	98,39
	5	5,54	0,74	98,39
Amostra 2	0	0,52	2,62	-
	0,5	0,97	2,19	95,34
	3,5	4,08	2,27	102,54
	5	5,30	0,92	96,08
Amostra 3	0	0,52	3,28	-
	0,5	1,04	2,77	103,48
	3,5	4,45	1,30	112,23
	5	5,77	3,26	105,21

Amostra 4	0	0,50	3,17	-
	0,5	1,04	2,32	108,03
	3,5	3,81	0,39	94,68
	5	5,20	0,07	94,02

4.4.8 Determinação de ácido ascórbico e Riboflavina em suplementos vitamínicos

O método proposto aplicado na determinação de AA foi comparado ao método de referência IF011-00, por volumetria iodométrica da Farmacopéia Brasileira, em três amostras líquidas e duas amostras sólidas efervescentes de vitamina C. A aplicação do teste t pareado utilizando o software Minitab para as amostras líquidas resultou em um valor calculado de 1,88 e, para amostras sólidas, 0,6. Considerando-se 95 % de confiança, o valor crítico para amostras líquidas e sólidas correspondem a 4,30 e 6,31, respectivamente. Portanto, os resultados confirmam que não houve diferença estatística significativa entre os valores médios de AA calculados pelo método fluorimétrico desenvolvido neste estudo e o método referência (**Tabela 4.12**).

Tabela 4.12 - Teste t pareado para as amostras de AA, NC = 95 %.

Amostra	Concentração de AA					
	Método proposto			Método de referência		
	Nominal	Média ± desvio padrão	CV (%)	Média ± desvio padrão	CV (%)	E _{rel} (%)
A1, mg mL ⁻¹	200	193,2 ± 3,0	1.67	186,1 ± 2,6	1,5	3,8
A2, mg mL ⁻¹	200	194,4 ± 0,4	0.23	193,7 ± 4,2	2,4	0,4
A3, mg mL ⁻¹	200	197,5 ± 2,5	1.34	194,1 ± 2,7	1,6	1,8
A4, mg	1.000	1.092,8 ± 7,1	0.68	1.075,4 ± 1,3	1,2	1,6
A5, mg	1.000	1.046,4 ± 10,1	1.05	1.061,8 ± 3,6	0,3	-1,4

O método proposto para determinação de RB foi comparado ao método de referência para riboflavina empregado por Sim, Kim e Lee [23]. O teste t pareado para amostras de cápsulas resultou em um valor calculado de 0,74, com um valor t crítico de 4,30 para 95 % de confiança. Os resultados confirmam que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores médios de RB calculados pelo método fluorimétrico desenvolvido neste estudo e o método de referência.

Tabela 4.13 - Teste t pareado para as amostras de RB, NC = 95 %.

Amostra	Concentração de RB					
	Nominal	Método proposto		Método de referência		
		Média ± desvio padrão	CV (%)	Média ± desvio padrão	CV (%)	E _{rel} (%)
A1, mg	1,0	0.99 ± 0.022	2.60	0.99 ± 0.36	0.41	0.47
A2, mg	1,0	1.04 ± 0.032	3.30	1.07 ± 0.36	1,00	-2.18
A3, mg	1,0	0.99 ± 0.004	3.20	0.95 ± 0.33	1.08	4.13

Os valores médios de RB calculados encontram-se entre 0,99 a 1,04 mg por cápsula. Assim, o erro relativo percentual variou de -0,01 a + 0,04 %, em comparação ao valor nominal, indicando a exatidão dos resultados, uma vez que os valores determinados pelo método de fluorescência são inferiores a 10 %, conforme recomendação da Anvisa (**Tabela 4.13**). Em termos de precisão do método proposto, os valores de CV (%) correspondem ao intervalo de 2,60 a 3,30 %, inferiores ao valor 5 % exigido pela Anvisa (2017). Estes resultados demonstram que as nanopartículas sintetizadas podem ser empregadas na quantificação de RB em suplementos vitamínicos comerciais encontradas em farmácias de manipulação.

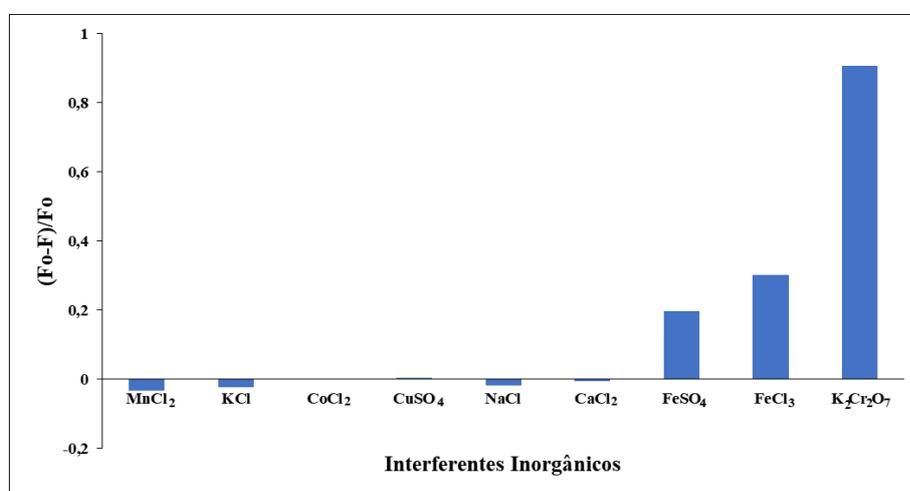
No próximo tópico observa-se os resultados da investigação de substância capazes de interagir com os PQC, podendo provocar a diminuição da sensibilidade analítica. Nisso, o estudo de seletividade é de importância para monitorar o resultado obtido na análise e intensificar o sinal das medidas.

4.4.9 Seletividade analíticas dos PQC/analito

Na investigação de formação do sensor PQC/Cr(VI) foi realizado um estudo baseado no efeito *quenching* com cátions metálicos que suprimem a fluorescência dos PQC, incluindo

Mn^{2+} , K^+ , Co^{2+} , Cu^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} e Cr^{6+} , sob as mesmas condições, na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, exceto para o íon cromo(VI) de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$. Baseado nos resultados da **Figura 4.36**, a melhor resposta analítica que provocou a diminuição da fluorescência foi usando o íon cromo(VI) seguido de íon ferro(III) e íon ferro(II), enquanto os demais íons metálicos não exibiram resposta significativa nesse efeito. Segundo Jia e colaboradores (2022), a forte afinidade do íon cromo(VI) é possivelmente atribuída ao processo de quelação entre o cátion metálico e os grupos orgânicos funcionalizados na superfície dos PQC.

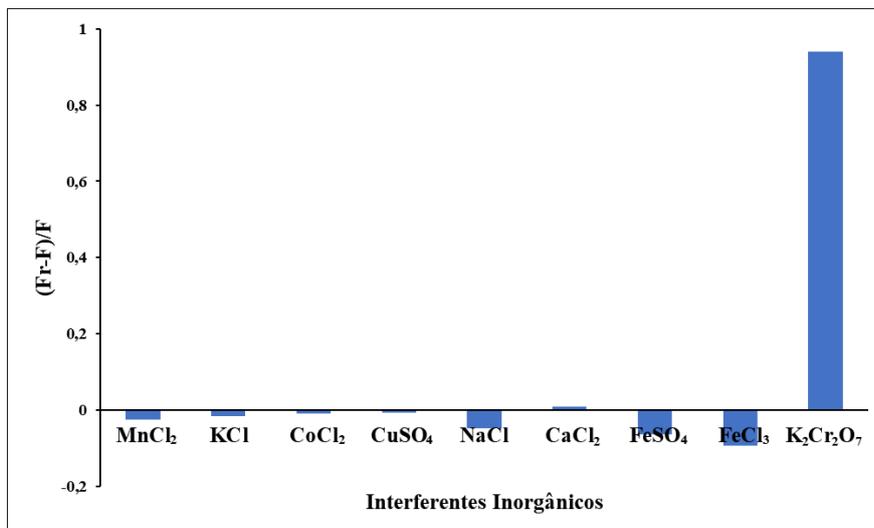
Figura 4.36 - Seletividade na resposta analítica do efeito *quenching* utilizando diferentes cátions metálicos.



Fonte: própria do autor

O estudo do retorno da fluorescência foi realizado usando a solução padrão de AA aplicado nesses cátions metálicos. Conforme **Figura 4.37**, os íons metálicos não produziram valores significativos de retorno da fluorescência, exceto o íon cromo(VI), que suprimiu o efeito *quenching* de fluorescência, evidenciando a seletividade do sensor PQC/Cr(VI) para AA.

Figura 4.37 - Seletividade na resposta analítica de AA aplicada na supressão do efeito *quenching* utilizando diferentes sensores

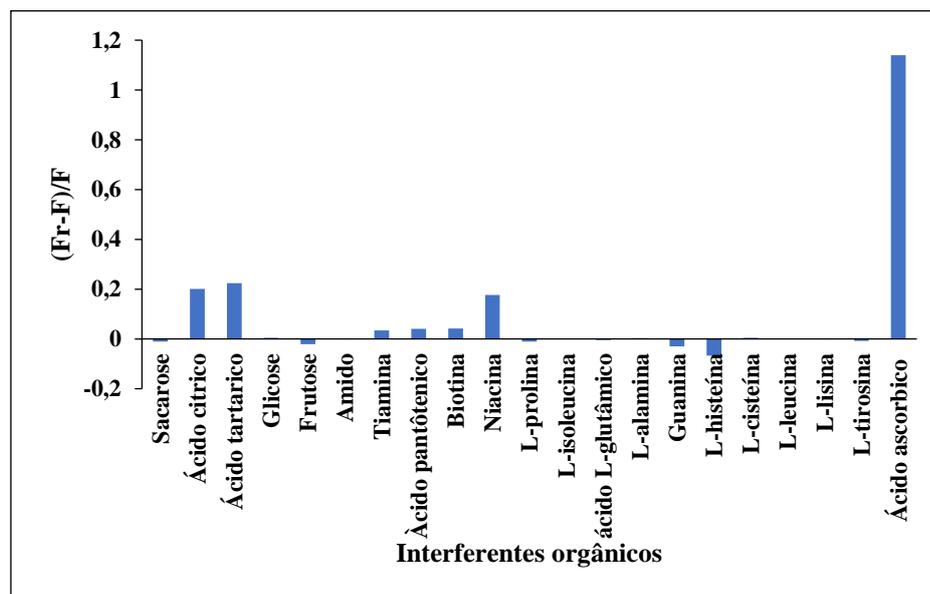


Fonte: própria do autor

De forma complementar, a seletividade foi investigada para sacarose, ácido cítrico, ácido tartárico, glicose, frutose, amido de milho, L-isoleucina, tiamina, L-prolina, ácido glutâmico, L-alanina, guanina, L-histidina, L-cistina, L-leucina, L-lisina e L-tirosina ácido pantotênico, biotina e niacina na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Conforme observado na **Figura 4.38**, o melhor valor obtido na recuperação da fluorescência foi do AA, seguido do ácido tartárico, ácido cítrico e niacina. Ressalta-se que os suplementos vitamínicos utilizados neste estudo não continham ácido tartárico, ácido cítrico e niacina em suas formulações, assegurando a seletividade do método nas condições experimentais aplicadas.

Segundo Ji e colaboradores (2021) especula-se que a restauração de fluorescência usando AA pode ocorrer pela remoção do íon cromo(VI) da superfície das nanopartículas por efeito quelante entre os grupos orgânicos pertencentes ao AA e o cátion metálico.

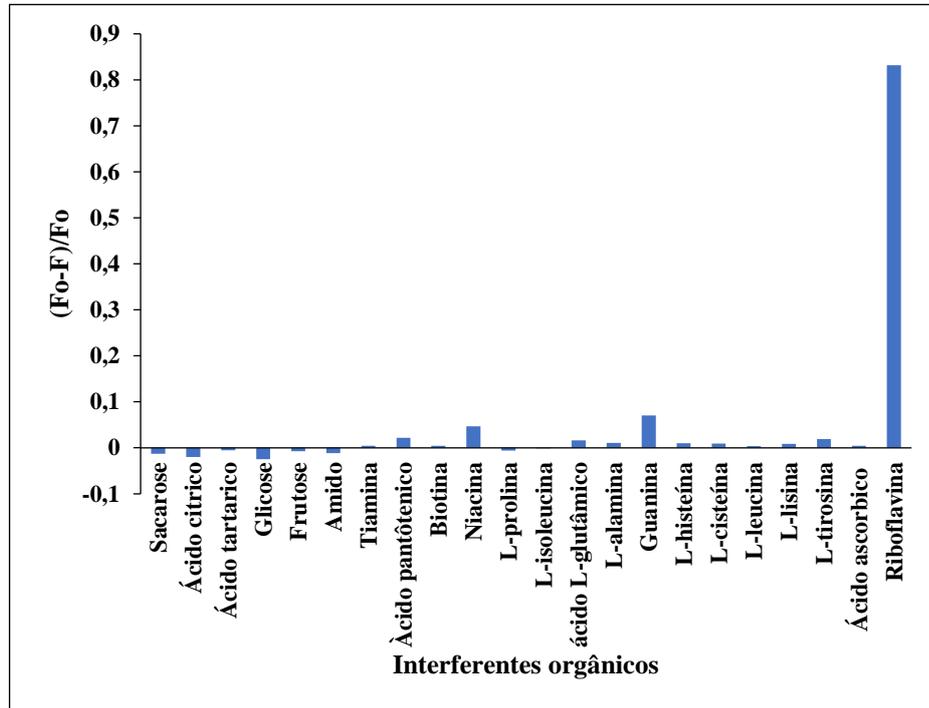
Figura 4.38 - Seletividade do sensor PQC/Cr(VI) nos diferentes compostos orgânicos



Fonte: própria do autor

A seletividade para a determinação da RB foi avaliada para os possíveis interferentes sacarose, ácido cítrico, ácido tartárico, glicose, frutose, amido de milho, L-isoleucina, tiamina, L-prolina, ácido glutâmico, L-alanina, guanina, L-histidina, L-cistina, L-leucina, L-lisina e L-tirosina ácido pantotênico, biotina e niacina na relação de concentração interferente/RB de 100:1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Na **Figura 4.39**, os interferentes não causaram mudança significativa de fluorescência na solução de PQC, permanecendo inferior a $\pm 5\%$ em comparação com valor obtido na sua ausência (Monte-Filho *et al.*, 2019). Portanto, o método proposto foi seletivo nas condições experimentais aplicadas.

Figura 4.39 – Seletividade dos PQC em diferentes compostos orgânicos.

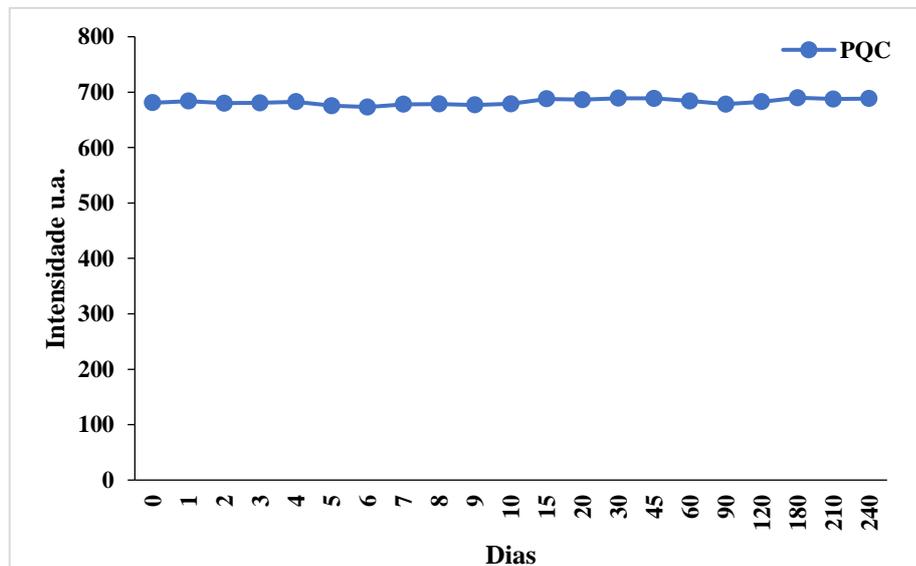


Fonte: própria do autor

4.4.10 Estabilidade dos pontos quânticos de carbono

A estabilidade dos PQC foi monitorada num período de 8 meses e as alterações sofridas durante o tempo foram insignificantes, confirmando a boa estabilidade das nanopartículas (**Figura 4.40**). Portanto, o armazenamento em vidro do tipo âmbar e sob refrigeração a 10 °C manteve as propriedades ópticas das nanopartículas estáveis (Long *et al.*, 2020).

Figura 4.40 – Estabilidade da solução dos PQC analisada durante 8 meses.



Fonte: própria do autor

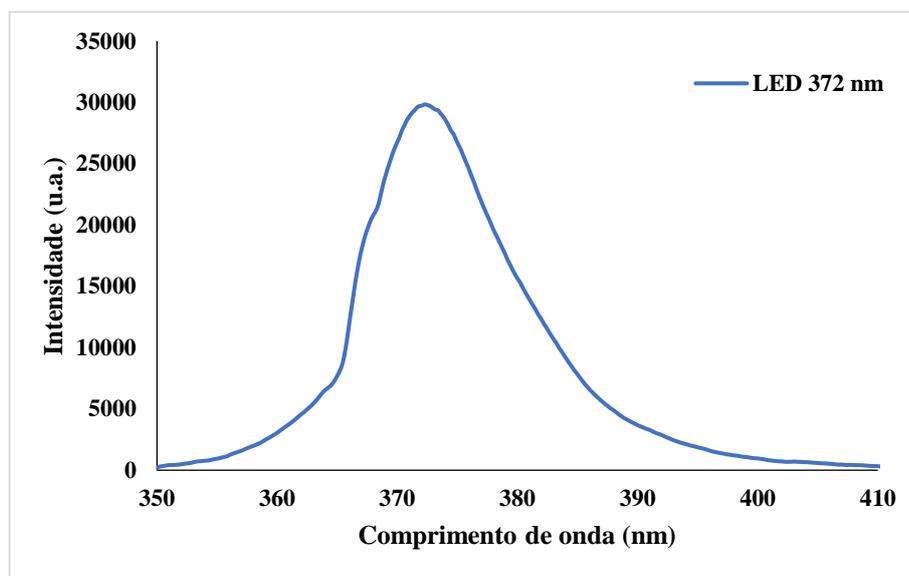
Baseado nesses resultados, confirma-se a vantagem da longa estabilidade do uso dos PQC no sinal de fluorescência. Resultados similares foram encontrados por Zhao e colaboradores (2022) em minutos, e Fan e colaboradores (2022) e Jia e colaboradores (2022) ao longo dos dias.

4.5 Espectrômetro de fluorescência molecular *Ocean Optics*

4.5.1 Fonte de irradiação: LED em 372 nm

O comprimento de onda de excitação da fonte de irradiação foi investigado. Conforme **Figura 4.41**, o espectro exibe uma banda em 372 nm que confirma o comprimento de onda de excitação emitido pelo LED.

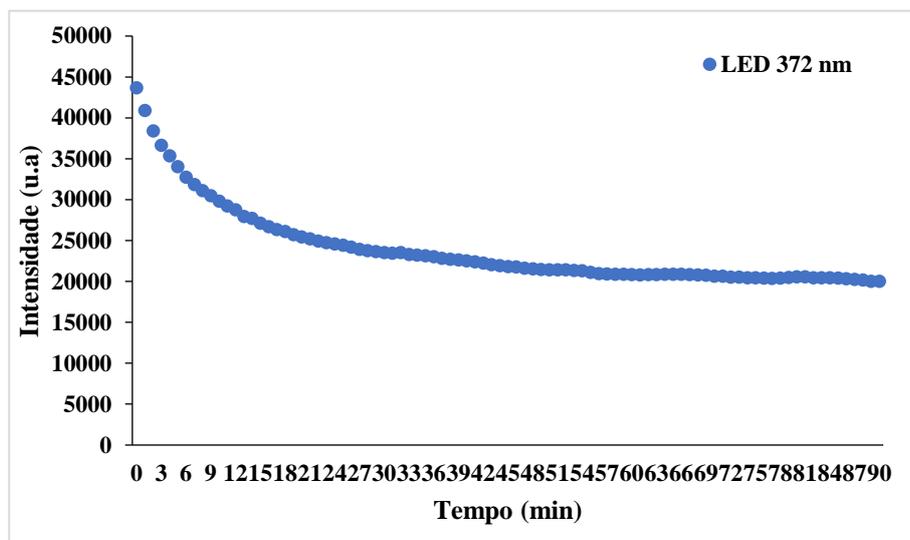
Figura 4.41 – Espectro de excitação do LED em 372 nm



Fonte: própria do autor

A estabilidade do LED foi realizada investigando-se a oscilação da fonte de irradiação por tempo para não afetar o sinal analítico das medidas de fluorescência. Na **Figura 4.42** observa-se o decrescimento da intensidade da fonte de irradiação em torno de 0 a 60 min, seguindo da constância de intensidade do LED. Portanto, as medidas foram realizadas a partir de 60 min após ligar a fonte de irradiação.

Figura 4.42 – Estabilidade do LED em 372 nm ao longo de 90 min



Fonte: própria do autor

Após a confirmação do comprimento de onda de excitação e estabilidade do LED, inicia-se as etapas de otimização e validação do método proposto utilizando o instrumento portátil *Ocean Optics*.

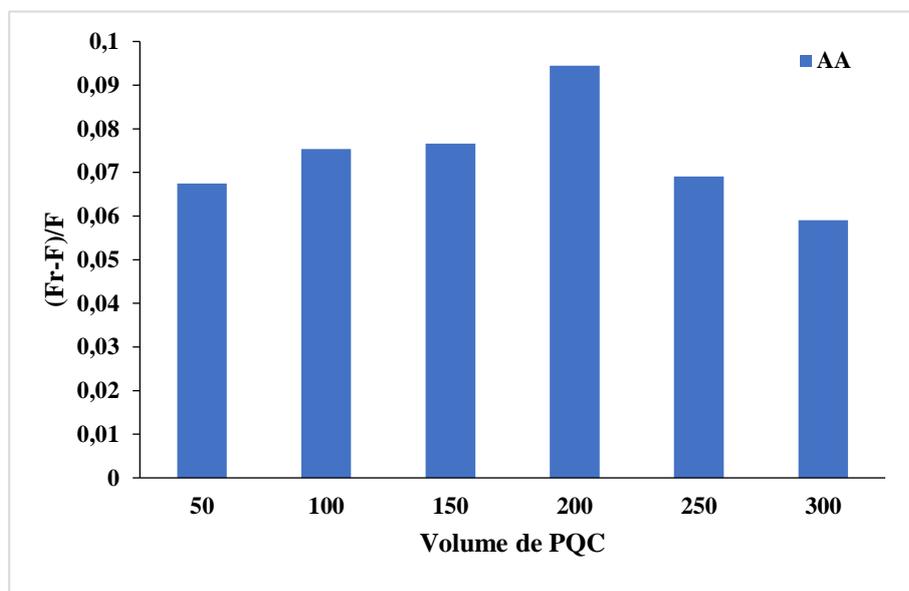
4.5.2 Otimização dos parâmetros analíticos

Com o intuito de avaliar as condições experimentais de uso dos PQC na determinação da solução padrão de AA e RB, foram estudados alguns fatores que podem afetar a detecção incluindo o estudo prévio do efeito de diluição dos PQC e planejamento fatorial 2^4 e 2^3 . O estudo de pH, tempo reacional e o estudo de interferentes não foram avaliados nesse sistema devido ao fenômeno de fluorescência ser o mesmo nos dois instrumentos.

4.5.2.1 Efeito de diluição dos PQC

O estudo do efeito de diluição dos PQC foi realizado para auxiliar na escolha do volume que foi aplicado no planejamento fatorial para AA e RB. Com relação retorno da fluorescência dos PQC, o sinal analítico cresce de 50 a 200 μL e, em seguida, decresce até 300 μL (**Figura 4.43**). Portanto, o melhor volume investigado no retorno da fluorescência foi de 200 μL .

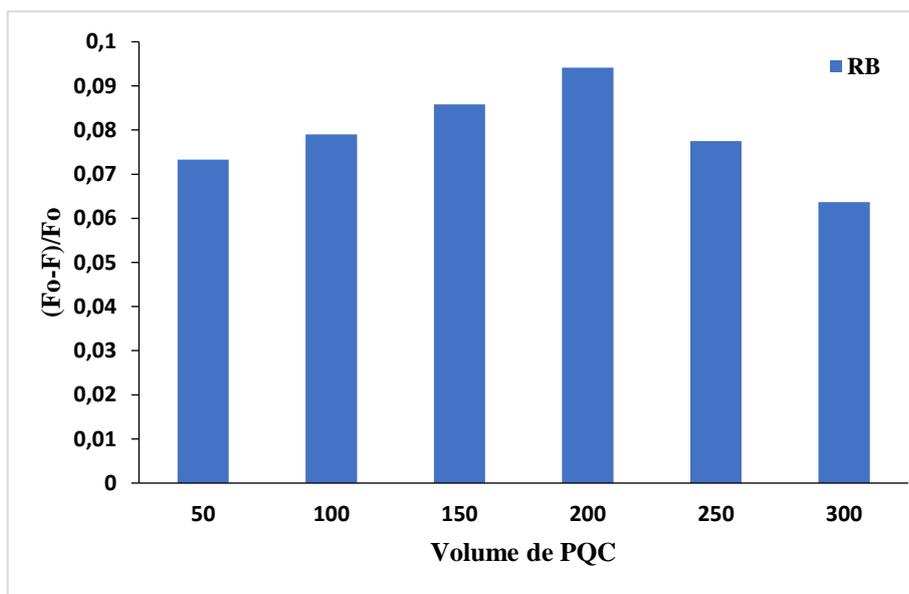
Figura 4.43 – Variação de fluorescência dos PQC em função do volume utilizando o analito AA $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.



Fonte: própria do autor

O efeito *quenching* foi empregado no estudo do efeito da diluição dos PQC com solução de RB $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Na **Figura 4.44** consta-se que o sinal analítico cresce de 50 a 200 μL e, em seguida, decresce até 300 μL . Portanto, o melhor resultado da diluição dos PQC utilizando a solução padrão de RB foi 200 μL .

Figura 4.44 – Variação de fluorescência dos PQC em função do volume utilizando o analito RB $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.



Fonte: própria do autor

A diluição da solução de trabalho dos PQC diminui as colisões moleculares que afetam a intensidade de fluorescência devido a distância entre as nanopartículas (Hoan *et al.*, 2019). Sahoo e colaboradores (2020) complementa que a diminuição da fluorescência é causada pela aglomeração de partículas em suspensão pelas altas concentrações das nanopartículas. Portanto, o processo de otimização da diluição dos PQC melhora a sensibilidade do método e a intensidade de fluorescência, evitando problemas de efeito do filtro interno.

4.5.2.2 Planejamento fatorial

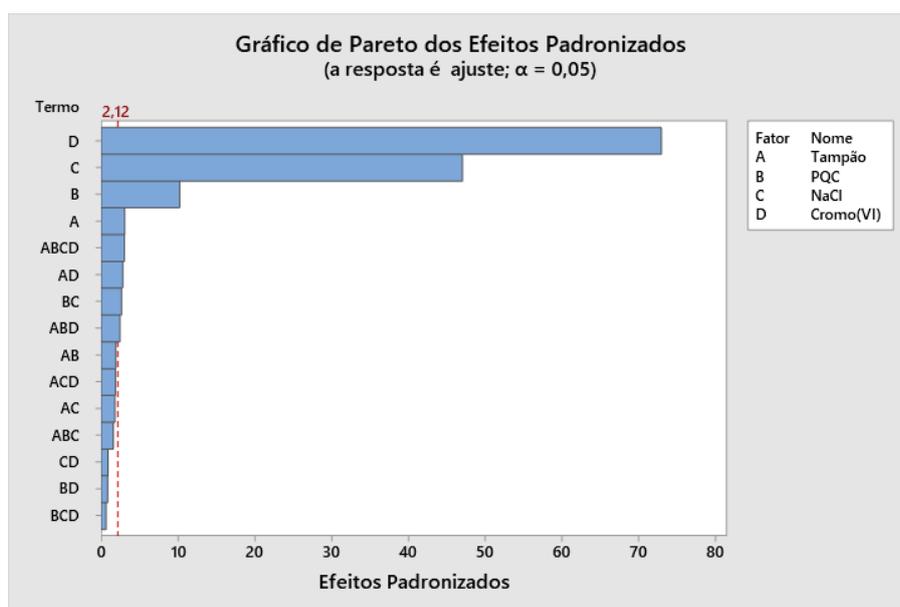
O planejamento fatorial 2^4 foi realizado na determinação de AA. Na **Tabela 4.14**, consta-se que os valores crescem correlacionado com o número de medidas. As medidas de 13 a 16 com a presença do sal NaCl obtiveram valor semelhantes no sinal de retorno de fluorescência. Contudo, o melhor resultado foi a medida número 15 composta das variáveis volume de tampão 200 μL , volume de PQC 200 μL , concentração de NaCl 0,5 mol L^{-1} e concentração de íon cromo(VI) 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 4.14 – planejamento fatorial 2^4 de quatro variáveis independentes e a codificação dos parâmetros: X1 - Volume de tampão: 200 (-) e 300 (+), X2 - Volume de PQC: 100 (-) e 200 (+), X3 – Concentração de NaCl: 0 mol L^{-1} (-) e 0,5 mol L^{-1} (+), e X4 -Concentração de íon cromo(VI):20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (-) e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (+)

Parâmetros	X1	X2	X3	X4	Fluorescência (média)
1	-	-	-	-	0,52±0,002
2	+	-	-	-	0,54±0,005
3	-	+	-	-	0,55±0,003
4	+	+	-	-	0,61±0,022
5	-	-	+	-	0,71±0,002
6	+	-	+	-	0,73±0,004
7	-	+	+	-	0,76±0,011
8	+	+	+	-	0,75±0,056
9	-	-	-	+	0,80±0,001
10	+	-	-	+	0,83±0,005
11	-	+	-	+	0,88±0,002
12	+	+	-	+	0,86±0,014
13	-	-	+	+	1,01±0,003
14	+	-	+	+	1,02±0,052
15	-	+	+	+	1,05±0,006
16	+	+	+	+	1,04±0,002

As variáveis relevantes, com base na interpretação do diagrama de Pareto, foram a concentração do íon cromo(VI), concentração da solução de NaCl, a concentração de íon cromo(VI), volume de PQC, e volume de tampão, e a interação entre todas a variáveis, seguido das demais interações (**Figura 4.45**). Em destaque, observa-se que as variáveis individuais obtiveram respostas significativas em comparação as interações das variáveis.

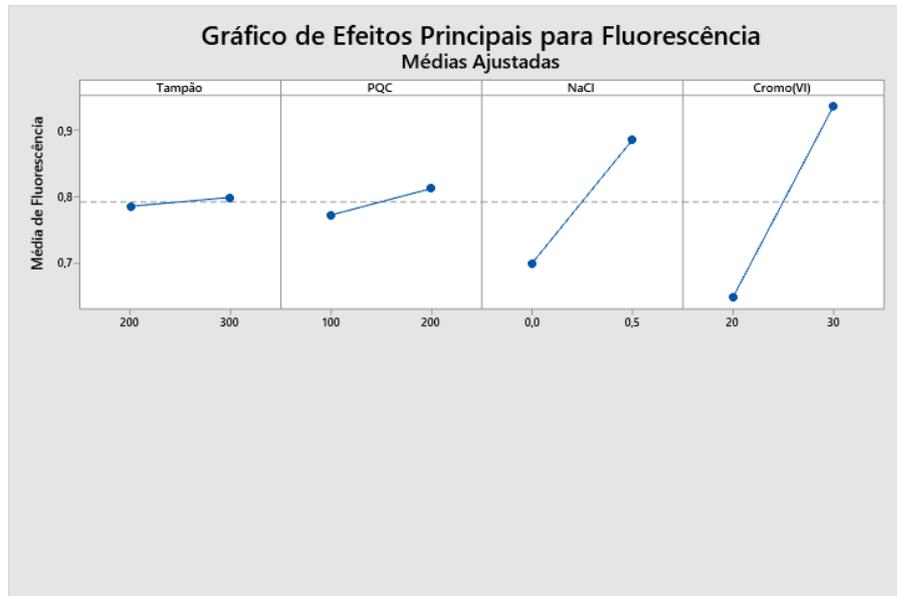
Figura 4.45 – Diagrama de Pareto com a variáveis volume de tampão, volume de PQC, concentração de NaCl e concentração de íon cromo(VI), e suas respectivas interações.



Fonte: própria do autor

Na **Figura 4.46** observa-se que o efeito da variável volume de tampão não afeta significativamente a intensidade de fluorescência dos PQC, sendo usando o volume de 200 μL evidenciado na **Tabela 4.14**. Com relação ao volume de PQC, o melhor resultado foi o volume de 200 μL . As variáveis concentração de NaCl 0,5 mol L^{-1} e concentração de íon cromo(VI) 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtiveram valores significativos que intensificam o retorno da fluorescência dos PQC.

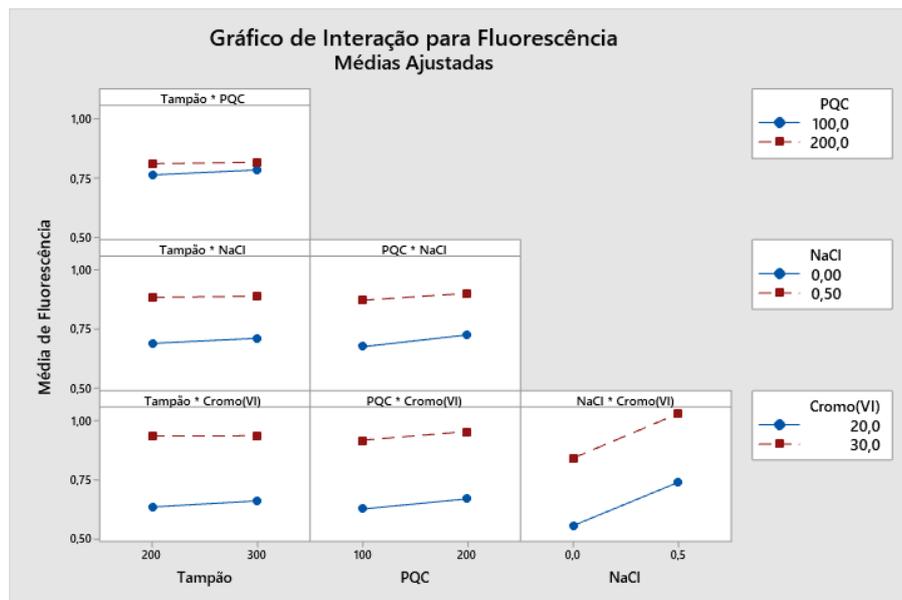
Figura 4.46 – Gráfico dos efeitos das variáveis volume de tampão, volume de PQC, concentração de NaCl e concentração de íon cromo(VI) analisadas individualmente



Fonte: própria do autor

Conforme observado na **Figura 4.47**, o volume do tampão não afeta significativamente as interações das variáveis. Com relação ao volume de PQC, o volume de 200 μL obteve um leve aumento na resposta analítica ao interagir com as variáveis concentração de íon cromo(VI) e concentração de NaCl. A interação da concentração de íon cromo(V) 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com concentração de NaCl 0,5 mol L^{-1} obteve a melhor sinal de retorno da fluorescência.

Figura 4.47 – Gráfico das interações das variáveis volume de tampão, volume de PQC, concentração de NaCl e concentração de íon cromo(VI)



Fonte: própria do autor

O planejamento fatorial 2^3 foi utilizado na avaliação da melhor medida para determinação de RB. Na **Tabela 4.15**, consta-se os valores crescem nas medidas de 1 a 4, exibe uma leve constância até 6 e decresce até a medida 8. Para tanto, os melhores valores foram as medida 4 e 6 compostas das variáveis volume de tampão, volume de PQC e concentração de NaCl.

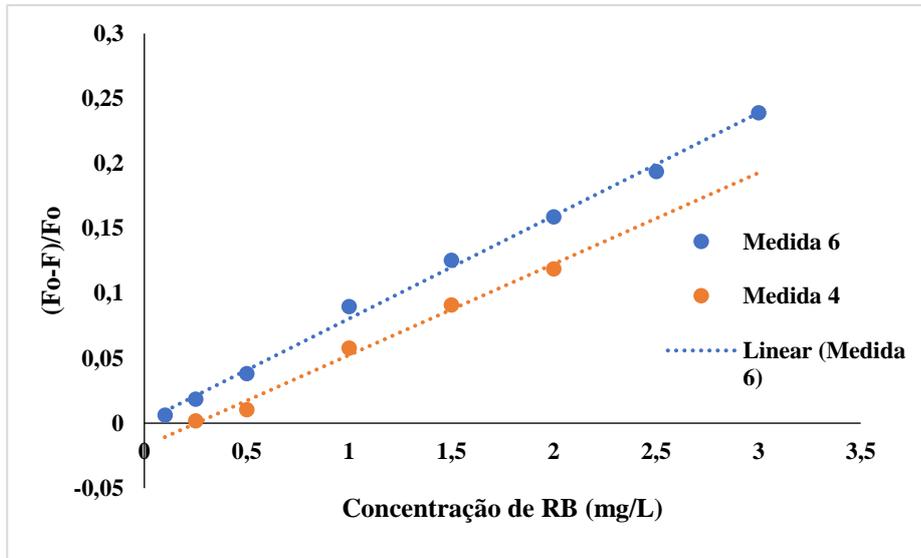
Baseado nos resultados, o volume dos PQC pode alterar a intensidade de fluorescência pelo processo reabsorção molecular devido a quantidade de partículas aglomeradas em suspensão ou a distância existente entre as nanopartículas (Fonin *et al.*, 2014; Hoan *et al.*, 2019). Com relação a variável concentração de íon cromo(VI), observa-se que a sensibilidade analítica do sistema pode ser alterada, devido a competitividade do sensor PQC/Cr(VI) e os íons cromo(VI) ao interagirem com o AA, suspensos em solução (Jia *et al.*, 2022).

Tabela 4.15 – Planejamento fatorial 2^3 de três variáveis independentes e a codificação dos parâmetros: X1 - Volume de tampão: 200 (-) e 300 (+); X2 - Volume de PQC: 100 (-) e 200 (+); e X3 – Concentração de NaCl: 0 mol L⁻¹ (-) e 0.5 mol L⁻¹ (+)

Parâmetros	X1	X2	X3	Fluorescência (média)
1	-	-	-	0,076±0,0010
2	+	-	-	0,083±0,0001
3	-	+	-	0,091±0,0003
4	+	+	-	0,101±0.0012
5	-	-	+	0,094±0.0002
6	+	-	+	0.102±0.0002
7	-	+	+	0,090±0.0008
8	+	+	+	0.088±0.0001

Para distinguir os resultados das medidas 4 e 6 foi realizado um estudo de sensibilidade analítica empregando uma curva analítica com os parâmetros otimizados dessas medidas. Na **Figura 4.48** observa-se que a medida 6 obteve melhor resposta analítica, devido a melhor sensibilidade e a ampla faixa linear de 0,1 a 3 µg mL⁻¹ em comparação a medida 4 com faixa linear de 0,25 a 2 µg mL⁻¹.

Figura 4.48 – Curva analítica da RB com a medida 4 e 6 otimizadas no planejamento fatorial 2³



Fonte: própria do autor

As variáveis relevantes, com base na interpretação do diagrama de Pareto, foram a concentração da solução de NaCl com o volume dos PQC, a concentração de NaCl, volume de tampão e volume dos PQC, seguido das demais interações (**Figura 4.49**).

Figura 4.49 – Diagrama de Pareto com a variáveis volume de tampão, volume de PQC e concentração de NaCl, e suas respectivas interações.

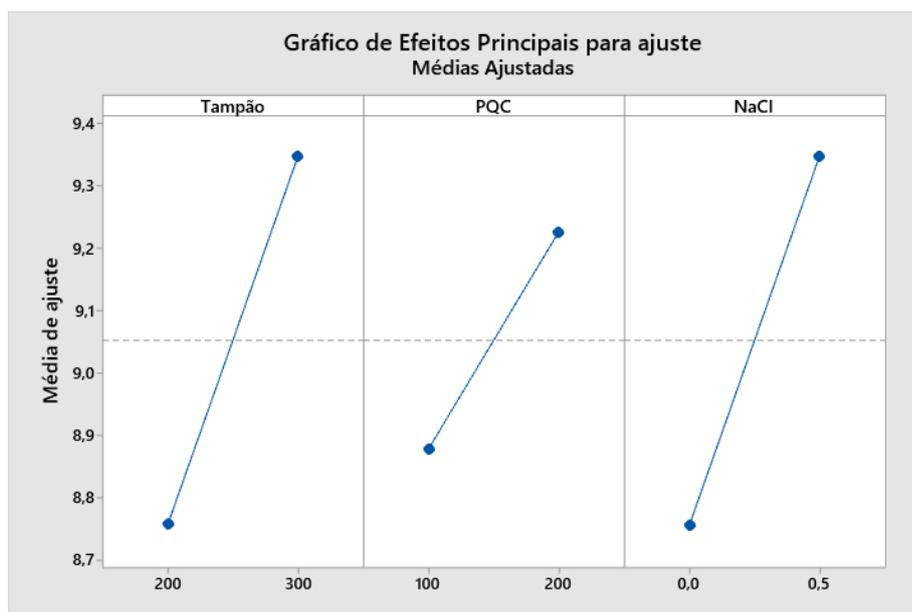


Fonte: própria do autor

Na **Figura 4.50** verifica-se que todas as variáveis obtiveram valores significativos para a intensidade de fluorescência ratiométrica dos PQC. Dessa forma, o volume de tampão que

obteve o melhor resultado foi o volume de 300 μL . As variáveis concentração de NaCl 0,5 mol L^{-1} e volume de PQC 200 μL resultaram nos melhores valores da intensidade de fluorescência ratiométrica. Contudo, na **Figura 4.48**, o volume de PQC 200 μL exibiu uma baixa sensibilidade e faixa linear menor que o volume de PQC de 100 μL , sendo não aplicado nos estudos subsequentes.

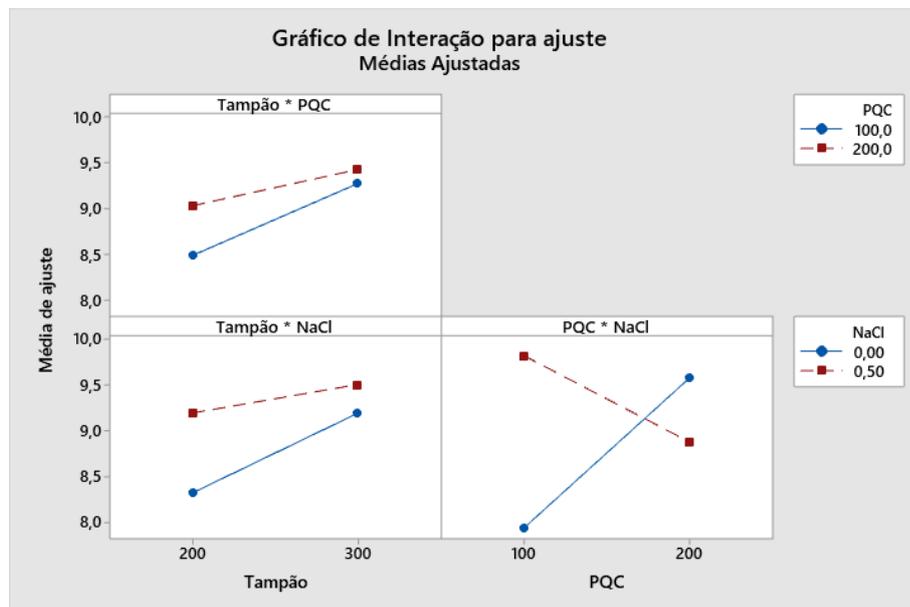
Figura 4.50 – Gráfico dos efeitos das variáveis volume de tampão, volume de PQC, concentração de NaCl e concentração de íon cromo(VI) analisadas individualmente.



Fonte: própria do autor

Na **Figura 4.51** observa-se que a interação do volume de tampão com as variáveis volume de PQC e concentração de NaCl resultaram no aumento da sensibilidade analítica no nível de 300 μL e presença de concentração de NaCl na mistura. A concentração de NaCl aumentou a resposta analítica no volume de PQC de 100 μL e diminuiu com o aumento do volume de PQC 200 μL .

Figura 4.51 – Gráfico das interações das variáveis volume de tampão, volume de PQC e concentração de NaCl



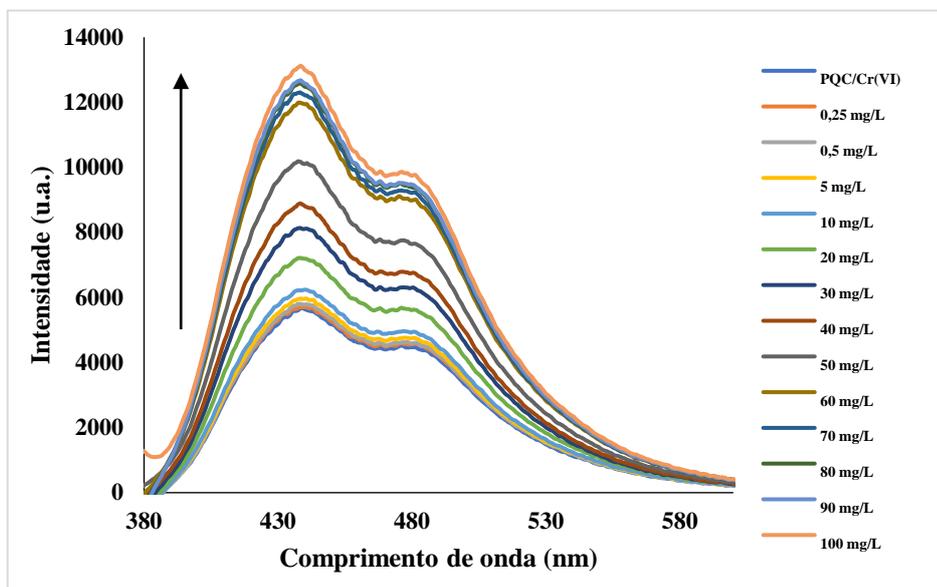
Fonte: própria do autor

Essa variação do sinal de fluorescência, mantendo o meio tamponado, ocorre pela presença de íons em solução. Paula e colaboradores (2019) relatam que os grupos orgânicos presentes na superfície das nanopartículas são influenciados pela força iônica da concentração do tampão, causando alteração do sinal de fluorescência. O aumento do volume de PQC, aumentam a aglomeram de nanopartículas em suspensão, causando a alteração da fluorescência dos PQC (Sahoo et al., 2019). Portanto, a otimização dos parâmetros analíticos utilizando o planejamento fatorial 2^4 e 2^3 resultaram na diminuição das medidas experimentais, onde serão aplicados nos estudos subsequentes incluindo a curva analítica de AA e RB, etapas de validação etc.

4.5.3 Curva analítica

Sob condições otimizadas, as concentrações de 0,25 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AA foram adicionadas na solução do sensor PQC/Cr(VI) e medido os espectros de emissão de fluorescência. Na **Figura 4.52** observa-se o aumento gradativo da intensidade de fluorescência baseada na supressão do efeito *quenching*. Dessa forma, o íon cromo(VI) do sensor PQC/Cr(VI) começa a reduzir a íon cromo (III) pela adição de concentrações crescentes da solução de AA, retornando a fluorescência dos PQC.

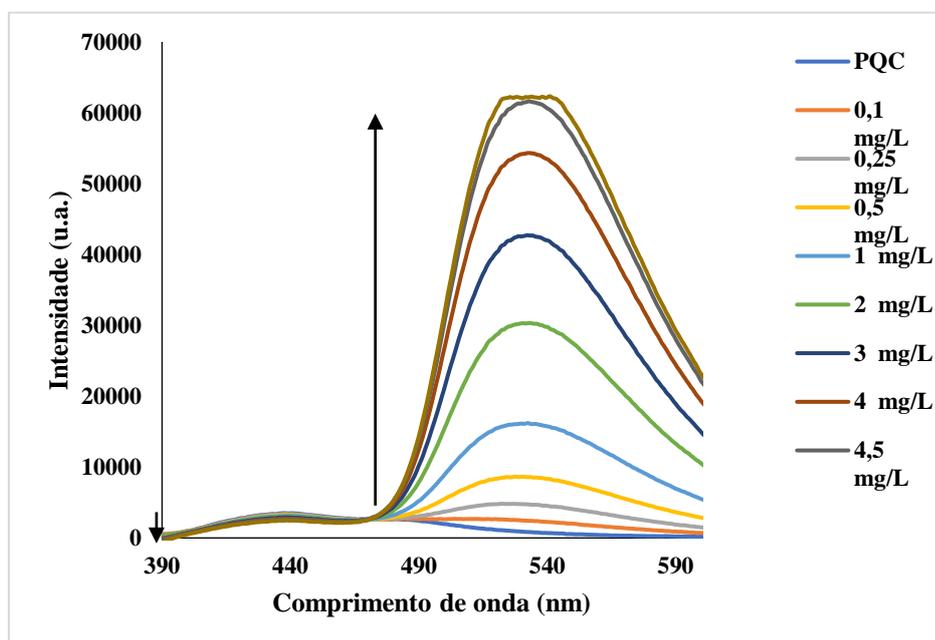
Figura 4.52 – Espectro de fluorescência do sensor PQC/Cr(VI) em diferentes concentrações de AA (0,5 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$).



Fonte: própria do autor

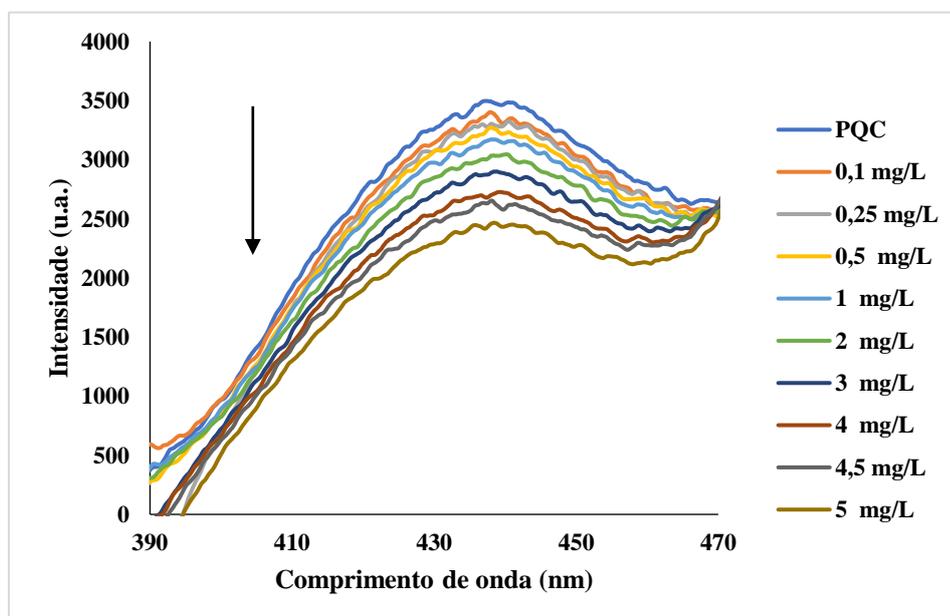
Sob condições otimizadas, os espectros de emissão de fluorescência foram construídos a partir das concentrações de 0,1 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de RB adicionadas na solução dos PQC. Na **Figura 4.53** consta-se o decréscimo gradativo da intensidade de fluorescência dos PQC em 440 nm e o aumento gradativo da banda em 540 nm, característica da RB, em função da concentração. Na **Figura 4.54** observa-se apenas o decréscimo da intensidade de fluorescência dos PQC em 440 nm. Vale destacar que a curva analítica foi plotada utilizando as bandas do comprimento de onda emissão em 440 nm.

Figura 4.53 – Espectro de fluorescência da solução de PQC em diferentes concentrações de RB (0,1 a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$) com banda decrescente em 440 nm e crescente em 540nm.



Fonte: própria do autor

Figura 4.54 – Espectro de fluorescência da solução de PQC em diferentes concentrações de RB (0,1 a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$) com banda decrescente em 440 nm.

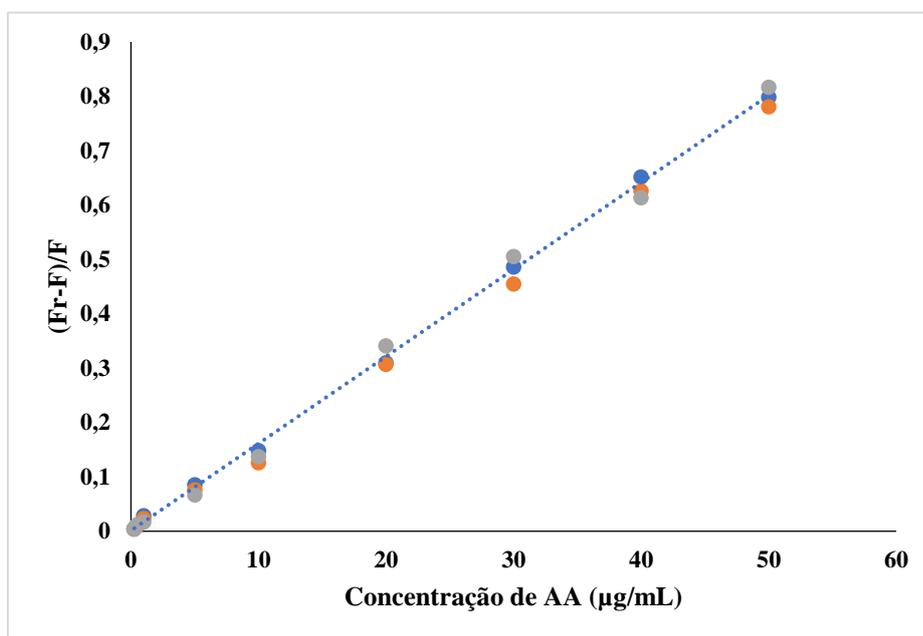


Fonte: própria do autor

4.5.4 Validação do modelo linear de AA e RB

A curva analítica foi construída baseada no retorno de fluorescência, que corresponde ao sinal analítico, utilizando o sensor PQC/Cr(VI) com adição de concentrações da solução de AA na faixa de 0,25 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Na **Figura 4.55**, a correlação entre a supressão do efeito *quenching* e a concentração de AA resultou na relação linear $(Fr-F)/F = 0,016x + 0,0012$, R^2 igual a 0,9992 e uma faixa linear de trabalho de 0,25 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O resultado do cálculo do limite de detecção e quantificação do AA foi de 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

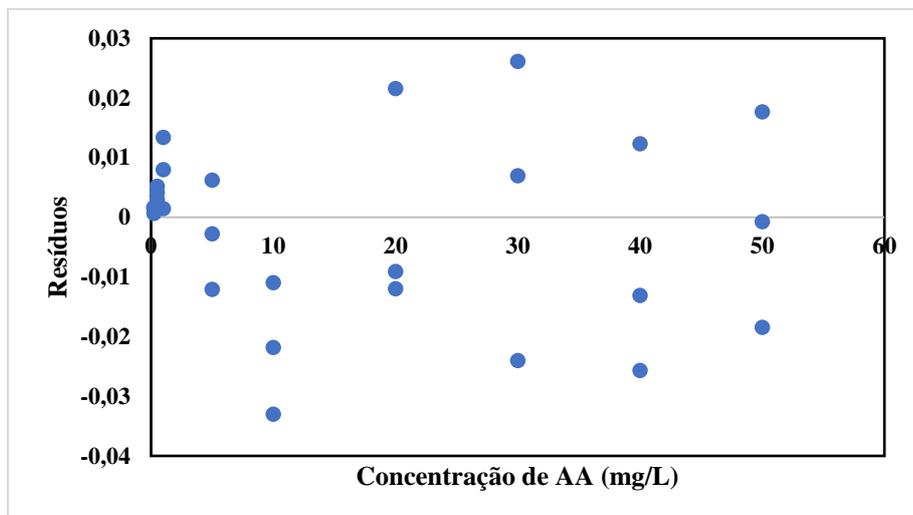
Figura 4.55 – Curva analítica entre a intensidade de fluorescência do sensor PQC/Cr(VI) e a concentrações de AA, baseada na equação $(Fr-F)/F$



Fonte: própria do autor

Na **Figura 4.56** verifica-se que a distribuição dos resíduos não existe perfil sistemático que indique falta de ajuste do modelo.

Figura 4.56 – Gráfico da distribuição de resíduos pelo modelo na faixa de concentração de 0,25 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AA.



Fonte: própria do autor

O ajuste do modelo linear da curva analítica e os testes de falta de ajuste e significância estatística de regressão do modelo foram aplicados na ANOVA (**Tabela 4.16 e 4.17**).

Tabela 4.16 - Resultado da ANOVA calculados para avaliação do modelo com relação ao analito AA

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma quadrática (SQ)	Média quadrática (MQ)
Regressão	1	8.212,84	8.212,84
Resíduo	26	21,88	0,88
Falta de ajuste	7	6,99	1,0
Erro puro	19	14,89	0,83
Total	27	8.234,71	

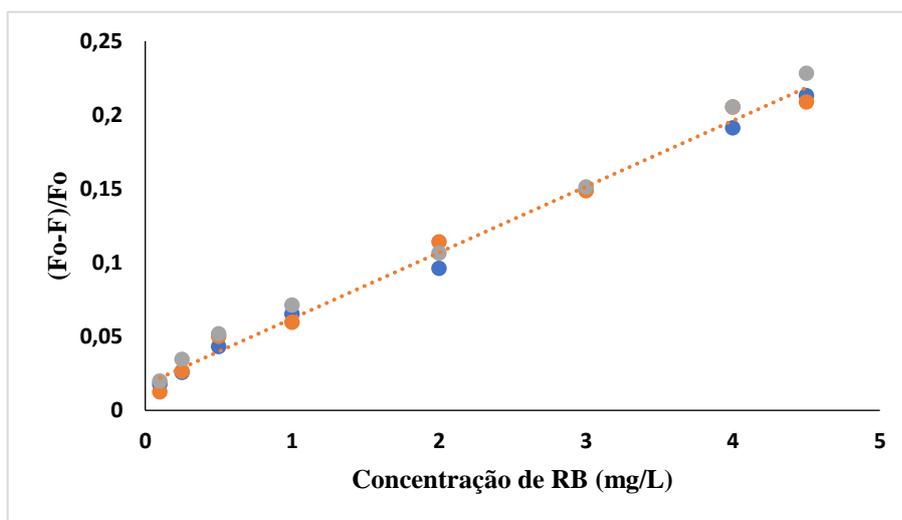
Tabela 4.17- Resultado dos testes de falta de ajuste e significância de regressão

Sistema proposto		
Grau de liberdade	Falta de ajuste	7
	Significância de regressão	1
Teste F tabelado, 95 % de confiança	Falta de ajuste	1,21
	Significância de regressão	2,54

Nas **Tabela 4.16** e **4.17**, consta-se que a significância de regressão foi avaliada por comparação do valor obtido na razão MQ_{reg}/MQ_{res} correspondendo a 9.332,77, com valor crítico de 4,30 de distribuição F a 95 % de confiança. Na falta de ajuste, a razão $MQ_{fal.aj.}/MQ_{er}$ corresponde a 1,21, valor inferior quando comparado com o valor tabelado de distribuição F de 2,54, para o nível de confiança estatística de 95 %. Portanto, o modelo linear evidencia uma regressão significativa e não há falta de ajuste de linearidade.

Na **Figura 4.57**, a correlação entre o efeito *quenching* do PQC/RB aplicada na banda em 440 nm e a concentração de RB resultou em uma relação linear expressa pela equação $(F_0 - F)/F_0 = 0,0445x + 0,0186$, com um coeficiente de correlação R^2 igual a 0,9968 e uma faixa linear de trabalho de 0,1 a 4,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O limite de detecção e quantificação da RB resultou no valor de 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

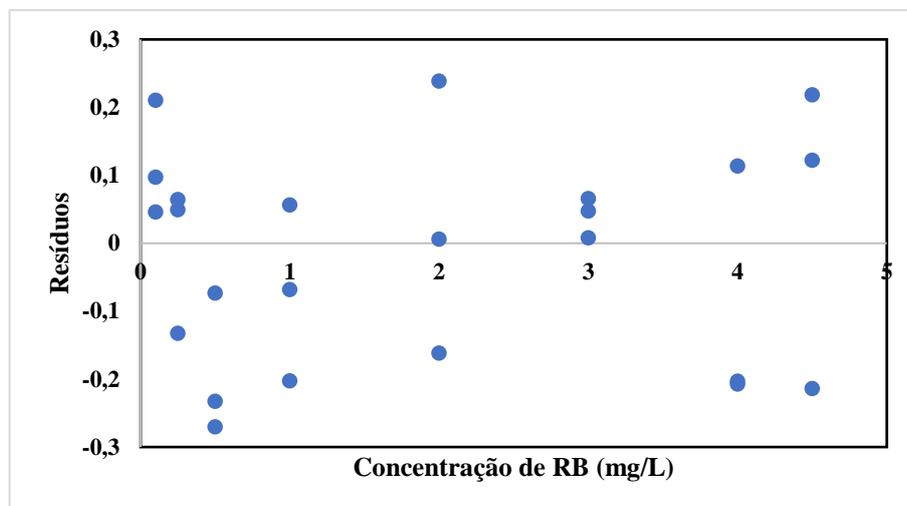
Figura 4.57 – Espectro de fluorescência da solução de PQC em diferentes concentrações de RB (0,1 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) no comprimento de onda emissão em 440 nm



Fonte: própria do autor

A distribuição dos resíduos, ilustrada na **Figura 4.58**, evidencia um perfil não sistemático que indique falta de ajuste significativa para modelo.

Figura 4.58 - Gráfico da distribuição de resíduos pelo modelo na faixa de concentração de 0,1 a 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de RB.



Fonte: própria do autor

Baseada nos cálculos da ANOVA foi verificado o ajuste do modelo linear da curva analítica e investigar os testes de falta de ajuste e significância estatística de regressão do modelo (**Tabela 4.18 e 4.19**).

Tabela 4.18 - Resultado da ANOVA calculados para avaliação do modelo com relação ao analito RB

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma quadrática (SQ)	Média quadrática (MQ)
Regressão	1	58,8955	58,8955
Resíduo	22	0,4538	0,0206
Falta de ajuste	6	0,1154	0,0192
Erro puro	16	0,3384	0,0211
Total	23	59,35	

Tabela 4.19- Resultado dos testes de falta de ajuste e significância de regressão

Sistema proposto		
Grau de liberdade	Falta de ajuste	6
	Significância de regressão	1
Teste F tabelado, 95% de confiança	Falta de ajuste	0,91
	Significância de regressão	2,74

Com relação aos resultados das **Tabela 4.18** e **4.19**, verifica-se que a significância de regressão da razão MQ_{reg}/MQ_{res} correspondendo a 2.859,00, obteve um valor superior ao valor crítico de 4,30 de distribuição F a 95 % de confiança. Na falta de ajuste, a razão $MQ_{fal.aj}/MQ_{er}$ corresponde a 0,91, valor inferior quando comparado com o valor tabelado da distribuição F de 2,74, para o nível de confiança estatística de 95 %. Portanto, o modelo linear evidencia uma regressão significativa e não há falta de ajuste de linearidade.

4.5.5 Precisão do método

Segundo a Anvisa (2017), a precisão do método analítico é realizada pela repetitividade, precisão intermediária ou reprodutividade, sendo expressas pelo coeficiente de variação (CV). Contudo, nesse trabalho não foi realizado a reprodutividade.

Considerando a primeira semana das medidas na **Tabela 4.20** como repetitividade do método proposto, observa-se que os valores de CV das concentrações de 0,5, 5 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AA correspondentes a 2,37 %, 0,80 % e 0,83 %, respectivamente. Esses valores são inferiores ao valor crítico de 5,3 % para concentrações até 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (AOAC, 2016).

Tabela 4.20 – Resultados da precisão intermediária, por três semanas, avaliada para soluções do padrão de AA nas concentrações de 0,5, 5 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$; n = 3.

Semana	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Valor médio da equação (u.a.)	Desvio padrão 3.2 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV (%)
1ª semana	0,5	0,010	0,0002	2,37
	5	0,079	0,0006	0,80
	20	0,310	0,0026	0,83
2ª semana	0,5	0,012	0,0004	3,43
	5	0,077	0,0007	0,90
	20	0,307	0,0037	1,21
3ª semana	0,5	0,010	0,0004	3,90
	5	0,083	0,0014	1,68
	20	0,340	0,0043	1,26
4ª semana	0,5	0,011	0,0004	3,83
	5	0,085	0,0006	0,72
	20	0,307	0,0026	0,83

Em comparação com os valores do CV entre semanas, resulta-se que o menor valor obtido foi 0,72 % e o maior valor, 3,90 %. Logo, os valores encontram-se abaixo do valor crítico exigido de 5,3 % para concentrações até 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (INMETRO, 2020).

Na **Tabela 4.21**, observa-se que a repetitividade do método proposto, utilizando a primeira semana de medidas, obteve valores de CV nas concentrações de 0,5, 5 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AA correspondentes a 2,17 %, 2,47 % e 1,04 %, respectivamente. Esses valores são inferiores ao valor crítico de 5,3 % para concentrações até 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (AOAC, 2016).

Tabela 4.21 – Resultados da precisão intermediária, por três semanas, avaliada para soluções do padrão de RB nas concentrações de 0,5, 2 e 4 mg L^{-1} ; n = 3.

Semana	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Valor médio da equação (u.a.)	Desvio padrão 3.1 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV (%)
1ª semana	0,5	0,050	0,0011	2,17
	2	0,119	0,0029	2,47
	4	0,226	0,0024	1,04
2ª semana	0,5	0,555	0,0008	1,47
	2	0,115	0,0295	2,57
	4	0,210	0,0007	0,32
3ª semana	0,5	0,049	0,0011	2,27
	2	0,118	0,0025	2,15
	4	0,222	0,0064	2,88
4ª semana	0,5	0,050	0,0002	0,40
	2	0,101	0,0028	2,72
	4	0,198	0,0027	1,35

Em comparação com os valores do CV entre semanas, resulta-se que o menor valor obtido foi 0,32 % e o maior valor, 2,88 %. Logo, os valores encontram-se abaixo do valor crítico exigido de 5,3 % para concentrações até 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (INMETRO, 2020).

4.5.6 Recuperação das amostras

A recuperação da concentração de AA foi avaliada utilizando o sensor PQC/Cr(VI) em três amostras líquidas e duas amostras sólidas efervescentes de vitamina C. Na **Tabela 4.22**, observa-se a fortificação das amostras empregando as concentrações de AA de 0, 5,0, 20 e 40

$\mu\text{g mL}^{-1}$ adicionadas individualmente no sensor PQC/Cr(VI). Para tanto, o resultado da recuperação das amostras de AA está na faixa entre 86,21 a 108,74 %, e um CV entre 0,29 e 3,34 %. Esses resultados estão abaixo dos valores recomendados pela Anvisa (2017), faixa de 80 a 120 % e um CV menor que 5 %.

Tabela 4.22– Recuperação de AA em suplementos vitamínicos líquidos e efervescentes de vitamina C (n=3).

Amostra	Concentração na amostra ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Valor encontrado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV (%)	Recuperação (%)
Amostra líquida 1	0	9,49	1,28	-
	5	13,46	2,90	86,21
	20	29,28	0,94	98,96
	40	46,62	0,04	99,08
Amostra líquida 2	0	9,78	0,75	-
	5	14,25	3,22	95,09
	20	31,02	1,20	106,21
	40	51,11	0,44	103,32
Amostra líquida 3	0	9,77	0,63	-
	5	13,81	2,89	97,95
	20	29,47	2,69	98,47
	40	52,12	0,33	105,87
Amostra sólida 1	0	10,44	0,58	-
	5	15,41	2,87	99,33
	20	29,13	1,56	93,44
	40	51,23	0,32	101,09
Amostra sólida 2	0	10,86	1,50	-
	5	15,22	1,78	87,37
	20	32,56	0,54	108,54
	40	54,35	0,29	108,74

A recuperação da concentração de RB foi avaliada utilizando o efeito *quenching* em amostras de cápsulas de suplementos vitamínicos de RB. Na **Tabela 4.23**, observa-se a recuperação da concentração do padrão de RB de 0, 0,5, 2 e 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aplicadas nos PQC e nas amostras. Os valores de recuperação das amostras apresentam uma variação entre 86,2 e 108,7 % e um CV entre 0,04 e 3,22 %, a faixa considerada aceitável pela Anvisa.

Tabela 4.23– Recuperação de RB em suplementos vitamínicos de farmácia de manipulação (n=3)

Amostra	Concentração na amostra ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Valor encontrado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV (%)	Recuperação (%)
Amostra 1	0	0,48	1,95	-
	0,5	0,93	3,88	90,79
	2	2,64	4,02	108,22
	3	3,70	3,20	107,40
Amostra 2	0	0,41	3,80	-
	0,5	0,93	3,89	106,45
	2	2,49	1,91	104,49
	3	3,67	0,86	108,72
Amostra 3	0	0,41	3,27	-
	0,5	0,87	2,72	88,97
	2	2,54	4,33	106,80
	3	3,80	1,15	112,96
Amostra 4	0	0,41	2,67	-
	0,5	0,88	3,88	95,51
	2	2,26	1,66	92,38
	3	3,73	1,73	110,61

4.5.6 Determinação de ácido ascórbico e Riboflavina em suplementos vitamínicos

O método proposto aplicado na determinação de AA foi comparado ao método de referência IF011-00, por volumetria iodométrica da Farmacopéia Brasileira, em três amostras líquidas e duas amostras sólidas efervescentes de vitamina C. A aplicação do teste t pareado utilizando o software Minitab para as amostras líquidas resultou em um valor calculado de 3,10 e, para amostras sólidas, 0,14. Considerando-se 95 % de confiança, o valor crítico para amostras líquidas e sólidas correspondem a 4,30 e 6,31. Portanto, os resultados confirmam que não houve diferença estatística significativa entre os valores médios de AA calculados pelo método fluorimétrico desenvolvido neste estudo e o método referência (**Tabela 4.24**).

Tabela 4.24 - Teste t pareado para as amostras de AA, NC = 95 %.

Amostra	Concentração de AA				
	Método proposto			Método de referência	
Nominal	Média \pm desvio padrão	CV (%)	Média \pm desvio padrão	CV (%)	E_{rel} (%)

A1, mg mL ⁻¹	200	189,8 ± 1,8	1,04	186,1 ± 2,6	1,5	2,0
A2, mg mL ⁻¹	200	195,5 ± 1,4	0,60	193,7 ± 4,2	2,4	0,93
A3, mg mL ⁻¹	200	195,4 ± 1,0	0,86	194,1 ± 2,7	1,6	0,67
A4, mg	1,000	1.044,1 ± 8,7	0,47	1.075,4 ± 1,3	1,2	-2,9
A5, mg	1,000	1.085,6 ± 11,8	1,22	1.061,8 ± 3,6	0,3	2,2

Os valores médios de RB calculados encontram-se entre 0,99 a 1,04 mg por cápsula. Assim, o erro relativo percentual variou de -2,1 a -5,6 %, em comparação ao valor nominal, indicando a precisão dos resultados, uma vez que os valores determinados pelo método de fluorescência são inferiores a 10 %, conforme recomendação da Anvisa (**Tabela 4.25**). Em termos de precisão do método proposto, os valores de CV (%) correspondem ao intervalo de 2,4 a 4,0 %, inferiores ao valor de 5 % exigido pela Anvisa (2017). Estes resultados demonstram que as nanopartículas sintetizadas podem ser empregadas na quantificação de RB em suplementos vitamínicos comerciais encontradas em farmácias de manipulação.

O método proposto para determinação de RB foi comparado ao método de referência para riboflavina empregado por Sim, Kim e Lee [23]. O teste t pareado para amostras de cápsulas resultou em um valor calculado de 3,05, com um valor t crítico de 4,30 para 95 % de confiança. Os resultados confirmam que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores médios de RB calculados pelo método fluorimétrico desenvolvido neste estudo e o método de referência.

Tabela 4.25 - Teste t pareado para as amostras de RB, NC = 95 %.

Amostra	Concentração de RB					
	Nominal	Método proposto		Método de referência		
		Média ± desvio padrão	CV (%)	Média ± desvio padrão	CV (%)	E _{rel} (%)
A1, mg	1,0	0,96 ± 0,34	2,4	0,99 ± 0,36	0,41	-3,0
A2, mg	1,0	1,01 ± 0,56	3,6	1,07 ± 0,36	1,00	-5,6

A3, mg	1,0	0,93 ± 0,85	4,0	0,95 ± 0,33	1.08	-2,1
--------	-----	-------------	-----	-------------	------	------

4.6 Comparação da síntese e dos parâmetros analíticos dos métodos propostos com a literatura

A comparação dos métodos e condições de síntese, RQF e parâmetros analíticos deste estudo em relação aos trabalhos relatados na literatura é apresentada na **Tabela 4.26**. A vantagem do método de síntese, que leva apenas 2 min, em equipamentos domésticos de micro-ondas, com reprodutibilidade, é destacado, aplicado para determinação de AA e RB em suplementos vitamínicos, com valores da faixa linear de trabalho e LD compatível com a literatura. O RQF de 8,9% é inferior a outros estudos, mas ainda apresenta uma vantagem para aplicações analíticas, pois não requer altas diluições das partículas de pontos de carbono, minimizando as incertezas nesta fase do procedimento. Outro aspecto interessante foi o baixo custo precursores químicos, que são comumente usados em laboratórios de química analítica, para sintetizar PQC nesse trabalho.

Tabela 4.26 – Comparação dos parâmetros analíticos do método proposto com a literatura

Precusores	Método de síntese	de	Condições de síntese	RQF (%)	Analito	Faixa linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Referência
Batata e etilenodiamino	Assistido por ultrassom		Ultrassom por 5 h	49.3	Ácido ascórbico	0-22.9	0.02	Preethi <i>et al.</i> , 2022
Wolfberry	Hidrotérmico		Aquecimento a 180 °C por 8h	22.0	Ácido ascórbico	1.8-17.6	0.3	Gu <i>et al.</i> , 2022
L-cisteína e ácido cítrico	Micro-ondas		Ultrassom e irradiação por micro-ondas por 1 min	62.5	Ácido ascórbico	2-100	0.6	Hamid <i>et al.</i> , 2023
Pó de <i>Boletus brunneissimus</i> Chiu	Hidrotérmico		Aquecimento a 200 °C por 12 h	-	Riboflavina	0-18	0.016	Meng <i>et al.</i> , 2023
Suco de limão, cebola e hidróxido de amônio	Micro-ondas		Irradiação por micro-ondas por 6 min	23.6	Riboflavina	0.1-3.0	0.001	Monte <i>et al.</i> , (2019)

EDTA, ureia e tiosulfato de sódio (Agilent)	Micro-ondas	Irradiação por micro-ondas por 2 min	8.9	Ácido ascórbico Riboflavina	0.5-50 0.1-7	0.15 0.09	Método proposto
EDTA, ureia e tiosulfato de sódio (<i>Ocean Optics</i>)	Micro-ondas	Irradiação por micro-ondas por 2 min	8.9	Ácido ascórbico Riboflavina	0.25-50 0.1- 4,5	0.10 0.03	Método proposto

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÃO

No presente trabalho foi desenvolvido uma síntese simples, rápida, de baixo custo e em etapa única de PQC empregando-se o método assistido por micro-ondas com a utilização de equipamento de uso doméstico, a partir dos precursores EDTA sódico, tiosulfato de sódio e ureia. O método de síntese por micro-ondas se destaca pelo curto tempo de síntese, simplicidade no manuseio do material e baixo custo.

Os PQC sintetizados exibiram excelente estabilidade, dependência do comprimento de onda de excitação e emissão, RQF de 8,9 % e propriedades fluorescentes adequadas para determinação de AA e RB em suplementos vitamínicos.

A caracterização dos PQC evidenciou a presença dos elementos químicos C, O, H, N e S na estrutura das nanopartículas com morfologia quase esférica e diâmetro médio de $4,0 \pm 0,11$ nm. O pico de difração em torno de $2\theta = 23,7^\circ$ confirma o plano cristalino de carbono grafítico e a faixa do pico entre 20° a 40° sua natureza amorfa. Além disso, a existência de grupos orgânicos incluindo grupos carboxila, carbonila, amino e sulfurados na superfície das nanopartículas. Os valores das medida de potencial Zeta de -16,8 mV (PQC), -1,93 mV (PQC/Cr(VI)), -18,7 mV (PQC/Cr(VI)/AA) e -28,3 mV(PQC/RB), confirmam as diferentes interações com e sem a presença do analito.

A fluorescência dos PQC é suprimida na presença de íon cromo(VI) baseado no mecanismo dinâmico. No entanto, a adição de AA suprime o efeito *quenching*, promovendo o retorno da fluorescência do sistema, pois o AA é um eficiente agente redutor que promove a redução do cromo(VI) a cromo(III). A estratégia *on-off-on* tem apresentado resultados satisfatórios na literatura para aplicação da determinação de metais e AA em águas e suplementos vitamínicos. Na interação PQC/RB, a fluorescência ratiométrica foi baseada nos mecanismos estático e IFE. A fluorescência ratiométrica tem possibilitado a determinação de RB em amostras de suplementos vitamínicos.

As condições experimentais resultantes do planejamento fatorial 2^4 para a determinação de AA foram: volume de tampão 200 μL , volume de PQC 200 μL , concentração de NaCl 0,5 mol L^{-1} e concentração de íon cromo(VI) 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para a RB, um planejamento fatorial 2^3 resultou nas condições de medidas analíticas de volume de tampão 200 μL , volume de PQC 100 μL e concentração de NaCl 0,5 mol L^{-1} . De forma complementar, mediante realização de estudos univariados, as condições de medida para volume dos PQC, concentração do íon cromo(VI), tempo reacional e estabilidade do LED foram 200 μL , 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 2 min para as a medidas de AA e 3 min para RB, e 60 min, respectivamente.

A estabilidade dos PQC foi realizada por oito meses, não sendo observadas alterações significativas de fluorescência durante o período de tempo estudado, concluindo-se pela ótima estabilidade de fluorescência.

Os PQC foram aplicados em dois instrumentos com detectores para medidas de fluorescência: *Agilent* e *Ocean Optics*. No instrumento *Agilent*, o sensor PQC/Cr(VI) empregado na determinação de AA resultou numa faixa linear de 0,5 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e LOD 0,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A fluorescência usada na determinação de RB correspondeu à faixa linear de 0,1 a 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e LOD 0,09 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No instrumento *Ocean Optics*, o sensor PQC/Cr(VI) empregado na determinação de AA resultou numa faixa linear de 0,25 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e LOD 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto a fluorescência ratiométrica usada na determinação de RB resultou numa faixa linear de 0,1 a 4,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e LOD 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Consta-se que o instrumento *Ocean Optics* possui uma melhor sensibilidade analítica em comparação ao instrumento *Agilent* quando aplicados na determinação AA e RB. Contudo, no *Agilent* obteve-se uma faixa linear de 0,1 a 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a determinação de RB. Logo, os resultados obtidos nos dois instrumentos permitem uma flexibilidade na determinação de AA e RB, além de evidenciar a qualidade e a precisão do método empregando os PQC.

O método proposto em comparação ao método de referência foi utilizado na determinação de AA e RB nos dois instrumentos com detectores para medidas de fluorescência: *Agilent* e *Ocean Optics*. No instrumento *Agilent*, o test t pareado resultou no valor calculado de 1,88 para amostras líquidas e 0,60 para amostras sólidas de AA. Em amostras de RB o test t resultou no valor calculado de 3,05. No instrumento *Ocean Optics*, o test t pareado resultou no valor calculado de 0,74 para amostras líquidas e 0,14 para amostras sólidas de AA. Em amostras de RB o test t resultou no valor calculado de 3,05. Os valores calculados ficaram a baixo do valor crítico de 6,31 e 4,30 para as amostras estudadas, confirmando a eficiência do método proposto.

Assim, com base nos resultados, o presente trabalho oferece um novo método de síntese de PQC para aplicações práticas no controle da qualidade de suplementos vitamínicos de AA e RB.

Referências

- AN, J.; SHI, Y.; FANG, J.; HU, Y.; LIU, Y. Multichannel ratiometric fluorescence sensor arrays for rapid visual monitoring of epinephrine, norepinephrine, and levodopa. *Chemical Engineering Journal*. v. 425, n. 130595, p. 1-7, 2021.
- Anvisa. Resolução da diretoria colegiada nº 141, de 25 de julho de 2017. Disponível em: ÍNDICE (Anvisa.gov.br). Acesso em: 18/11/2023.
- Anvisa. RDC nº 98, de 1º de agosto de 2016. Disponível em: https://antigo.Anvisa.gov.br/documents/10181/2921766/RDC_98_2016_COMP.pdf/dcb09ea1-e222-4192-98c5-54a13426dc4a Acesso em: 18/11/2023.
- Anvisa. RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/Anvisa/2005/rdc0269_22_09_2005.html Acesso em: 02/07/2024.
- Anvisa. RDC nº 242, 10 de dezembro de 2018. Disponível em: https://www.gov.br/Anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/medicamentos/fitoterapicos-dinamizados-e-especificos/informes/especificos/faq_rdc_242_2018_primeira_edicao.pdf Acesso em: 18/11/2023.
- Anvisa. Farmacopeia Brasileira - Volume 2- Monografias, 6ª edição, Brasília, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/Anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/insumos-farmaceuticos-e-especialidades-ate-2a-errata-p-pdf-com-capa.pdf> Acesso em 18/11/2023.
- ALAGHMANDFARD, A.; SEDIGHI, O.; REZAEI, N.T.; ABEDINI, A.A.; KHACHATOURIAN, A.M.; TOPRAK, M.S.; SEIFALIAN, A. Recent advances in the modification of carbon-based quantum dots for biomedical applications. *Journal Pre-proof - Materials Science and Engineering: C*, v.120, n.111756, p.1-25, 202, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111756>
- ALOWAKENNU, M.; ADAMS, L.A.; ABDULWAHAB, K.O. Synthesis of Ceria (CeO₂) Nanoparticles and Their Application in Colorimetric Probes for the Determination of Ascorbic Acid. *Materials Science inc. Nanomaterials & Polymers*, 7,1-5, 2022, <https://doi.org/10.1002/slct.202103463>
- AOAC, Appendix F: guidelines for standard method performance requirements, p.1-18, 2016. Disponível em: https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf Acesso em: 10/11/2023.
- ANSARI, S.; MASOUM, S. Recent advances and future trends on molecularly imprinted polymer-based fluorescence sensors with luminescent carbon dots. *Talanta*, v.223, n. 121411, p.1-16, 2021,
- ATCHUDAN, R.; EDISON, T.N.J.I.; SHANMUGAM, M.; PERUMAL, S.; SOMANATHAN, T.; LEE, Y.R. Sustainable synthesis of carbon quantum dots from banana peel waste using hydrothermal process for in vivo bioimaging. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, v.126, n.114417. 2021, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physe.2020.114417>
- AZMI, S.N.H.; AL HOQANI, U.; AL MAMARI, J.O.S.; AL MAMARI, B.M.S.; AL JASSASI, B.S.A.R.; AL RUBAIAI, A.S.S.; RAHMAN, N.; NASIR, M.; HAQUE, S.M.; KHAN, S.A.; AHMED, Q.U.; ZAKARIA, Z.A. Box–Behnken Design Based Development of UV-Reversed Phase High Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Ascorbic Acid in Tablet Formulations. *Separations*, 9,361, 2022, <https://doi.org/10.3390/separations9110361>
- 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.
- BANDI, R.; DADIGALA, R.; GANGAPURAM, B. R.; GUTTENA, V. Green synthesis of highly fluorescent nitrogen – Doped carbon dots from Lantana camara berries for effective detection of lead(II) and bioimaging. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 178, p. 330–338, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.11.010>

BAYDA, S.; ADEEL, M.; TUCCINARDI, T.; CORDANI, M.; RIZZOLIO, F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, v. 25, n.1, p. 112, 2020, <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>

CALAM, T.T. A novel, efficient and sensitive method for the simultaneous determination of riboflavin (vitamin B2) and pyridoxine hydrochloride (vitamin B6) in food and pharmacological samples using an electrochemical sensor based on 4,4' -diamino benzophenone. *Microchemical Journal*. v. 169. n.106557, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106557>

CHEN, J.; MAO, C.; YE, H.; GAO, X.; ZHAO, L. Natural biomass carbon Dots-Based fluorescence sensor for high precision detection of vitamin B12 in serum. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 305, n. 123459, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2023.123459>

CIOATES, C.N. Review—Electrochemical Sensors Used in the Determination of Riboflavin. *Journal of the Electrochemical society*, 167, 037558, 2020, 10.1149/1945-7111/ab6e5e

CORBETT, J.; MCKEOWN, P.A.; PEGGS, G.N.; WHATMORE, R. Nanotechnology: International Developments and Emerging Products. *CIRP Annals*, v. 49, n. 2, p. 523-545, 2000, [https://doi.org/10.1016/S0007-8506\(07\)63454-4](https://doi.org/10.1016/S0007-8506(07)63454-4)

DAS, P.; BHATTACHARYYA, S.K.; BANERJI, P.; DAS, N.C. Acoustic cavitation assisted synthesis and characterization of photoluminescent carbon quantum dots for biological applications and their future prospective. *Nano-Structores & Nano-Objets*, v. 25, n. 100641, p. 1-20, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2020.100641>.

DAS, P.; BHATTACHARYYA, S.K.; BANERJI, P.; DAS, N.C. Acoustic cavitation assisted synthesis and characterization of photoluminescent carbon quantum dots for biological applications and their future prospective. *Nano-Strutures & Nano-Objets*, v.25, n. 100641, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2020.100641>

DAS, P.; GANGULY, S.; BOSE, M.; MONDAL, S.; DAS, A.K.; BANERJEE, S.; DAS, N.C. A simplistic approach to green future with eco-friendly luminescent carbon dots and their application to fluorescent nano-sensor ‘turn-off’ probe for selective sensing of copper ions. *Materials Science and Engineering: C*, V.75, p. 1456-1464, 2017, 10.1016/j.msec.2017.03.045.

DOSEKOVA, E.; FILIP, J.; BERTOK, T.; BOTH, P.; KASAK, P.; TKAC, J. Nanotechnology in Glycomics: Applications in Diagnostics, Therapy, Imaging, and Separation Processes. *Wiley Online Library*, v. 36, p. 514-626, 2017, 10.1002/med.21420.

EKIMOV, A.I.; ONUSHCHENKO, A.A. Quantum size effect in the optical spectra of semiconductor microcrystals. *Soviet Physics. Semiconductors*, v.16 n. 7, p. 775-778, 1982.

GAN, L.; SU, Q.; CHEN, Z.; YANG, X. Exploration of pH-responsive carbon dots for detecting nitrite and ascorbic acid. *Applied Surface Science*, v. 530, n. 147269, p. 1-8, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.147269>

ESCOBAR_LEDESMA, F.R.; ARAGÓN-TOBAR, C.F.; ESPINOZA-MONTERO, P.J.; TORRE-CHAUVIN, E.T. Increased Recovery of Gold Thiosulfate Alkaline Solutions by Adding Thiol Groups in the Porous Structure of Activated Carbon. *Molecules*, v.25,n.25, p.2902, 2020, <https://doi.org/10.3390/molecules25122902>

FAN, R.; XIANG, J.; ZHOU, P.; MEI, H.; LI, Y.; WANG, H.; LIU, X.; WANG, X. Reuse of waste *Myrica rubra* for green synthesis of nitrogen-doped carbon dots as an “on-off-on” fluorescent probe

for Fe³⁺ and ascorbic acid detection. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 233, n.113350, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113350>

GU, L.; ZHANG, J.; YANG, G.; TANG, Y.; ZHANG, X.; HUANG, X.; ZHAI, W.; FODJO, E.K.; KONG, C. Green preparation of carbon quantum dots with wolfberry as on-off-on nanosensors for the detection of Fe³⁺ and L-ascorbic acid. *Food Chemistry*, v.376, n.131898, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131898>

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.

HALLAJI, Z.; BAGHERI, Z.; KALJI, S.; ERMIS, E.; RANJBAR, B. Recent advances in the rational synthesis of red-emissive carbon dots for nanomedicine applications: A review. *FlatChem*, v.29, n. 100271, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.flatc.2021.100271>

HAMID, M.A.A.; ELAGAMY, S.H.; GAMAL, A.; MANSOUR, F.R. Microwave prepared nitrogen and sulfur co-doped carbon quantum dots for rapid determination of ascorbic acid through a turn off–on strategy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomelecular Spectroscopy*, v. 293, n. 122440, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2023.122440>

HAN, M.; ZHU, S.; LU, S.; SONG, Y.; FENG, T.; TAO, S.; LIU, J.; YANG, B. Recent progress on the photocatalysis of carbon dots: Classification, mechanism and applications. *Nanotoday*, v.19, p. 201-218, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2018.02.008>

HAO, Y.; LI, R.; LIU, Y.; ZHANG, X.; GENG, L.; CHEN, S. The on–off-on Fluorescence Sensor of Hollow Carbon Dots for Detecting Hg²⁺ and Ascorbic Acid. *Journal of Fluorescence*, 33, 459-469, 2023, <https://doi.org/10.1007/s10895-022-03057-3>.

HEBBAR, A.; SELVARAJ, R.; VINAYAGAM, E.; VARADAVENKATESAN, T.; KUMAR, P.S.; DUC, P.A.; RANGASAMY, G. A critical review on the environmental application of carbon dots, v. 313, n. 137308, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137308>

HOAN, B.T.; TAM, P.D.; PHAM, V. Green Synthesis of Highly Luminescent Carbon Quantum Dots from Lemon Juice. *Journal of Nanotechnology*, v. 2019, p.1-9, 2019, <https://doi.org/10.1155/2019/2852816>

HU, C.; ZHU, Y.; ZHAO, X. On-off-on nanosensors of carbon quantum dots derived from coal tar pitch for the detection of Cu²⁺, Fe³⁺, and L-ascorbic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v.250, n. 119325, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119325>

HU, C.; WANG, K.; CHEN, Y.; MANIWA, M.; LIN, K.A.; KAWAI, T.; CHEN, W. Detection of Fe³⁺ and Hg²⁺ ions through photoluminescence quenching of carbon dots derived from urea and bitter tea oil residue. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v.272, n. 120963, 2022a, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.120963>

HU, J.; SUN, Y.; ARYEE, A.A.; QU, L.; ZHANG, K.; LI, Z. Mechanisms for carbon dots-based chemosensing, biosensing, and bioimaging: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 1209, n. 338885, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338885>

INMETRO, Orientação sobre validação de métodos analíticos, de 09 de junho de 2020. disponível em: Inmetro - Documentos Necessários para Acreditação de Laboratórios de Calibração e de Ensaios segundo requisitos da NBR ISO/IEC 17025. Acesso em: 11/10/2021.

IRANIFAM, N.S.; HUSAIN, U.S.; SELVAN, S.I.S.; MORDANI, N.A.; JUHARI, N.; HALIM, N.H.A. Synthesis of rod-like CeO₂ nanoparticles and their application to catalyze the luminal–O₂

chemiluminescence reaction used in the determination of oxcarbazepine and ascorbic acid. *Analytical Sciences*, v.38, n.5, p.787–793, 2022, <https://doi.org/10.1007/s44211-022-00096-5>

JAYAWEERA, S.; KE, Y.; HU, X.; NG, W.J. Facile preparation of fluorescent carbon dots for label-free detection of Fe³⁺. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: chemistry*, v. 18, , p. 156-163, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.10.052>

JEONG, G.; LEE, J.M.; LEE, J.A.; PRANEERAD, J.; CHOI, C.A.; SUPCHOCKSOONTHORN, P.; ROY, A.K.; CHAE, W.; PAOPRASERT, P.; YEO, M.K.; MURALI, G.; PARK, S.Y.; LEE, D.; IN, I. Microwave-assisted synthesis of multifunctional fluorescent carbon quantum dots from A4/B2 polyamidation monomer sets. *Applied Surface Science*, v. 542, n. 148471, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.148471>

JI, X.; WANG, S.; LUO, Y.; YUAN, X.; WEI, Y.; ZHANG, Q.; QIN, K.; TU, Y. Green Synthesis of Weissella-Derived Fluorescence Carbon Dots for Microbial Staining, Cell Imaging and Dual Sensing of Vitamin B12 and Hexavalent Chromium. *Dyes and Pigments*, v.184, n. 108818, p. 1-8, 2021, [10.1016/j.dyepig.2020.108818](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108818)

JIA, Y.; WU, S.; DUAN, Z.; SONG, S.; SHUANG, S.; GONG, X.; DONG, C. A facile fluorescence platform for chromium and ascorbic acid detection based on “on-off-on” strategy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v.278, n. 121343, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121343>

JIAO, X.; LI, L.; QIN, S.; ZHANG, Y.; HUANG, K.; XU, L. The synthesis of fluorescent carbon dots from mango peel and their multiple applications. *Colloids and Surfaces A*, v. 577, p. 306-314, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.05.073>.

JI, Y.; ZOU, X.; WANG, W.; WANG, T.; ZHANG, S.; GONG, Z. Co-Doped S, N-Carbon dots and its fluorescent film sensors for rapid detection of Cr (VI) and Ascorbic acid. *Microchemical Journal*, v. 167, n.106284, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106284>.

JI, X.; WANG, S.; LUO, Y.; YUAN, X.; WEI, Y.; ZHANG, Q.; QIN, K.; TU, Y. Green synthesis of weissella-derived fluorescence carbon dots for microbial staining, cell imaging and dual sensing of vitamin b12 and hexavalent chromium. *Dyes and Pigments*. v. 184, n. 108818, p. 1-8, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108818>.

JOHN, B.K.; ABRAHAM, T.; MATHEW, B. A Review on Characterization Techniques for Carbon Quantum Dots and Their Applications in Agrochemical Residue Detection. *Journal of Fluorescence*, v.32, p.449-471, 2022, <https://doi.org/10.1007/s10895-021-02852-8>.

JONAS, M.; PAPPAS, D. A Review of Fluorescent Carbon Dots, Their Synthesis, Physical and Chemical Characteristics, and Applications. *Nanomaterials*, v.11, n.6, 2021, <https://doi.org/10.3390/nano11061448>.

KOLEKAR, A.G.; NILLE, O.S.; KOPARDE, S.V.; PATIL, AS.; WAGHMARE, R.D.; SOHN, D.; ANBHULE, P.V.; KOLEKAR G.B.; GOKAVI, G.S.; MORE, V.R. Green, facial zinc doped hydrothermal synthesis of cinnamon derived fluorescent carbon dots (Zn-Cn-CDs) for highly selective and sensitive Cr⁶⁺ and Mn⁷⁺ metal ion sensing application. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 304, n. 123413, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2023.123413>

KLIMCZAK, I.; GLISZCYNKA-SWIGLO, A. Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C, *Food Chemistry*, v. 175, p. 100-105, 2015, [10.1016/j.foodchem.2014.11.104](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.104)

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.

KURIAN, M.; PAUL, A. Recent trends in the use of green sources for carbon dot synthesis—A short review. *Carbon Trends*, v.3, n. 100032, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.cartre.2021.100032>.

KUNDU, A.; MAITY, B.; BASU, S. Orange Pomace-Derived Fluorescent Carbon Quantum Dots: Detection of Dual Analytes in the Nanomolar Range. *ACS Omega*, 8, 22178-22189, 2023, <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c02474>

LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. 2^a ed. New York: Springer Science and Business Media, 1999.

LATHE, A.; PALVE, A.M. A review: Engineered nanomaterials for photoreduction of Cr(VI) to Cr(III). *Journal of Hazardous Materials Advances*, v.12, n 100333, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2023.100333>

LEGRAND, P.; GAHOUAL, R.; BENATTAR, R.; TOUSSAINT, B.; ROQUES, C.; MIGNET, N.; HOUZÉ, P.; Comprehensive and quantitative stability study of ascorbic acid using capillary zone electrophoresis with ultraviolet detection and high-resolution tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, v.43, n.14, p. 2925–2935, 2020, [10.1002/jssc.202000389](https://doi.org/10.1002/jssc.202000389).

LI, C.; LU, B.; WANG, X.; MA, Y.; REN, X.; LIU, C.; YANG, H. A feasible and universal one-step method for functionalizing carbon dots efficiently via in-situ free radical polymerization. *Journal of Luminescence*, v. 238, n. 118246, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2021.118246>

LI, H.; ZHOU, Y.; DU, J. Ascorbic acid as an alternative coreactant for luminol reaction and sensitive chemiluminescence determination of ascorbic acid in soft drinks. *Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry*, 429, 113945, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2022.113945>

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

LIM, S. Y.; SHEN, W.; GAO, Z. Carbon quantum dots and their applications. *Chemical Society Reviews*, 44, 362-381, 2015, [10.1039/C4CS00269E](https://doi.org/10.1039/C4CS00269E)

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*, v. 5, p. 2979-2988, 2017, [10.1039/C7TB00017K](https://doi.org/10.1039/C7TB00017K).

LI, X.; WANG, C.; LI, P.; SUN, X.; SHAO, Z.; XIA, J.; LIU, Q.; SHEN, F.; FANG, Y. Beer-derived nitrogen, phosphorus co-doped carbon quantum dots: Highly selective on-off-on fluorescent probes for the detection of ascorbic acid in fruits. *Food Chemistry*, v. 409, n. 135243, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135243>.

LONG, C.; QING, T.; FU, Q.; JIANG, Z.; XU, J.; ZHANG, P.; FENG, B. Low-temperature rapid synthesis of high-stable carbon dots and its application in biochemical sensing. *Dyes and Pigments*, v.175, n. 108184, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108184>.

MACHADO, C.E.; VIEIRA, K.O.; FERRARI, J.L.; SCHIAVON, M.A.; Pontos de quânticos de carbono: síntese química, propriedades e aplicações. *Revista virtual de química*, v. 7 n. 4. p. 1306-1346, 2015, [10.5935/1984-6835.20150073](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150073)

MADADIZADEH, A.; SADEGHEIN, A.; RIAHI, S. The use of nanotechnology to prevent and mitigate fine migration: a comprehensive review. *Journal Reviews in chemical Engineering*, v.38, p. 1-16, 2020, <https://doi.org/10.1515/revce-2019-0055>.

MA, H.; SUN, C.; XUE, G.; WU, G.; ZHANG, X.; HAN, X.; QI, X.; LV, X.; SUN, H.; ZHANG, J. Facile synthesis of fluorescent carbon dots from *Prunus cerasifera* fruits for fluorescent ink, Fe³⁺ ion detection and cell imaging. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v.213, p. 281-287, 2019, 10.1016/j.saa.2019.01.079

NG, M.H.K.; LIM, G.K.; LEO, C.P. Comparison between hydrothermal and microwave-assisted synthesis of carbon dots from biowaste and chemical for heavy metal detection: A review. *Microchemical Journal*, v.165, n. 106116, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106116>.

MENEZES, G.A.; MENEZES, P. S.; MENEZES, C. Nanoscience in diagnostics: A short review. *Internet Journal of Medical Update*, v. 6, n.1, p. 16-23, 2011, 10.4314/ijmu.v6i1.63971

MENG, F.; XU, H.; WANG, S.; WEI, J.; ZHOU, W.; WANG, Q.; LI, P.; KONG, F.; ZHANG, Y. One-step high-yield preparation of nitrogen- and sulfur-codoped carbon dots with applications in chromium(VI) and ascorbic acid detection. *RSC advances*, n. 19686, v. 12, 2022, 10.1039/d2ra01758j.

MEIERHOFER, F.; DISSINGER, F.; WEIGERT, F.; JUNGCLAUS, J.; MÜLER-CASPARY, K.; WALDVOGEL, S.R.; RESCH-GENGER, U.; VOSS, T. Citric acid based carbon dots with amine type stabilizers: phspecific luminescence and quantum yield characteristics. *The Journal of Physical Chemistry C*, v.124, p. 8894-8904, 2020, <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b11732>.

MASSEY, V.; The Chemical and Biological Versatility of Riboflavin. *Biochemical Society Transactions*, 4, 28, 283-296, 2000.

MINTZ, K.J.; BARTOLI, M.; ROVERE, M.; ZHOU, Y.; HETTIARACHCHI, S.D.; PAUDYAL, S.; CHEN, J.; DOMENA, J.B.; LIYANAGE, P.Y.; SAMPSON, R.; KHADKA, D.; PANDEY, R.R.; HUANG, S.; CHUSUEI, C.C.; TAGLIAFERRO, A.; LEBLANC, R.M. A deep investigation into the structure of carbon dots. *Carbon*, v. 173, p. 433-447, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2020.11.017>

MILLER, C.L.; KRISTOVA, P.; PATEL, B.A. Detection of vitamin C in various falsified oral formulations using voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 904, n. 115903, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115903>

MOLAEI, M.J. Principles, mechanisms, and application of carbon quantum dots in sensors: a review. *Analytical Methods*, v.12, n. 1266, 2020, <https://doi.org/10.1039/C9AY02696G>

MONTE-FILHO, S.S.; ANDRADE, S.I.E.; LIMA, M.B.; ARAUJO, M.C.U. Synthesis of highly fluorescent carbon dots from lemon and onion juices for determination of riboflavin in multivitamin/mineral supplements. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, v.9, n.3, p. 209-216, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.02.003>.

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.

MSTO, R.K.; OTHMAN, H.O.; AL-HASHIMI, B.R.; ALI, D.S.; HASSAN, D.H.; HASSAN, A.Q.; SMAOUI, S. Fluorescence Turns on-off-on Sensing of Ferric Ion and L-Ascorbic Acid by Carbon Quantum Dots. *Journal of Food Quality*, n.9, 2023, <https://doi.org/10.1155/2023/5555608>

NAIR, A.; HAPONIUK, J. T.; THOMAS, S.; GOPI, S. Natural carbon-based quantum dots and their applications in drug delivery: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 132, n. 110834, p. 1-15, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110834>

NUGRAHA, M.W.; SAMBUDI, N.S.; KASMIARNO, L.D.; KAMAL, N.A. The Effect of Amino-functionalization on Photoluminescence Properties of Sugarcane Bagasse-derived Carbon Quantum Dots. *Journal of Chemical Engineering*, v.21, n.1, p.62-72, 2021, 10.22146/ajche.61234

OZYURT, D.; KOBALSI, M.A.; HOCKING, R.K.; FOX, B. Properties, synthesis, and applications of carbon dots: A review. *Carbon Trends*, v.12, n. 100276, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.cartre.2023.100276>

PAULA, N.T.G.; MILANI, R.; LAVORANTE, A.F.; PAIN, A.P.S. Use of carbon dots synthesized from citrate as a fluorescent probe for quercetin determination in tea and beer samples. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.30, n. 11, p. 2355-2366, 2019, <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190145>

PINAR, P. T.; YARDIM, Y.; SENTÜRK, Z. Individual and simultaneous electroanalytical sensing of epinephrine and lidocaine using an anodically pretreated boron-doped diamond electrode by square-wave voltammetry. *Diamond & Related Materials*, v. 101, n. 107649, p. 1-10, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2019.107649>

POURMADADI, M.; RAHMANI,E.; RAJABZADEH-KHOSROSHAHI, M.; SAMADI, A.; BEHZADMEHR, R.; RAHDAR, A.; FERREIRA, L.F.R. Properties and application of carbon quantum dots (CQDs) in biosensors for disease detection: A comprehensive review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*,v. 80, n. 104156, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104156>.

PREETHI, M.; MURUGAN, R.; VISWANATHAN, C.; PONPANDIAN, N. Potato starch derived N-doped carbon quantum dots as a fluorescent sensing tool for ascorbic acid. *Journal of Photochemistry & Photobiology, A: chemistry*. v.431, n.114009, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2022.114009>.

PRIYADARSHINI, E.; MINZAR, M. PANDEY, S.; RAWAT, K.

Biocompatible gelatin/carbon dot nanocomposite based urea sensor and the effect of nitrogen ion implantation. *Biochemical and Biophysical Research communications*, v. 675, p. 99-106, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.06.081>

RAGAN, I.; HARTSON, L.; PIDCOKE, H.; BOWEN, R.; GOODRICH, R. Pathogen reduction of SARS-CoV-2 virus in plasma and whole blood using riboflavin and UV light. *Plos One*, v.15, n. 5, 2020, 10.1371/journal.pone.0233947.

ROSE, R.C.; BODE, A.M. Biology of free radical scavengers: na evaluation of ascorbate, *FASEB J*, n.12, v.7, p. 1135-1142, 1993, 10.1016/j.eclinm.2022.101434.

SADIO, A.J.; GBEASOR-KOMLANVI, F.A.; KONU, R.Y.; BAKOUBAYI, A.W.; TCHANKONI, M.K.; BITTY-ANDERSON,, A.M.; GOMEZ, I.M.; DENADOU, C. P.; ANANI, J.; KOUANFACK, H.R.; KPETO, I. K.; SALOU, M.; EKOUEVI, D.K. Assessment of self-medication practices in the context of the COVID-19 outbreak in Togo. *BMC Public Health*, v. 21, n. 58, 2021, 10.1186/s12889-020-10145-1.

SAENGRICHAN, A.; SAIKATE, C.; SILASANA, P.; KHEMTHONG, P.; WANMOLEE, W.; PHANTHASRI, J.; YUNGJAN, S.; POSOKNISTAKUL, P.; RATCHAHAT, S.; LAOSIRIPOJANA, N.; WU, K.A.W.; SAKDARONNARONG, A. The Role of N and S Doping on Photoluminescent Characteristics of Carbon Dots from Palm Bunches for Fluorimetric Sensing of Fe³⁺ Ion. *International Journal of Molecular Sciences*, v.23, n. 5001, 2022, <https://doi.org/10.3390/ijms23095001>

SAHA, A.; MARMA, K.K.S.; RASHID, A.; TARANNUM, N.; DAS, S.; CHOWDHURY, T.; AFRIN, N.; CHAKRABORTY, P.; EMRAN, M.; MEHEDI, H.M.H.; HUSSAIN, M.I.; BARUA, A.; MISTRY, S.K. Risk factors associated with self-medication among the indigenous communities of Chittagong Hill Tracts, Bangladesh. *Plos one*, v.17, n.6, 2022, 10.1371/journal.pone.0269622.

SAHOO, N.K.; JANA, G.C.; AKTARA, Mt. N.; DAS, S.; NAYIM, Sk.; PATRA, A.; BHATTACHARJEE, P.; BHADRA, K.; HOSSAIN, M. Carbon dots derived from lychee waste: Application for Fe³⁺ ions sensing in real water and multicolor cell imaging of skin melanoma cells. *Materials Science and Engineering:C*, v. 108, n. 110429, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110429>.

SANTOS, S.T.S.; ALBUQUERQUE, N.L.; GUEDES, J.P.M. The risks of self-medication with exempted prescription drugs (MIPs) in Brazil. *Research, Society and, Development*, v.11, n.7, 2022, <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i7.30493>.

SANTOS, T.M.; ZATTAR, T.A.; ALENCAR, B.T.; ALEIXO, M.L.M.; COSTA, B.M.S.; LEMOS, L.M.S. Self-medication among nursing and medical students in Brazil: integrative review. *Research, Society and,Development*, v.11, n.2, 2022, <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i2.13760>

SINGH, A.; MOHAPATRA, P. K.; KALAYANASUNDARAM, D.; KUMAR, S. Self-functionalized ultrastable water suspension of luminescent carbon quantum Dots. *Materials Chemistry and Physics*, v. 225, p. 23-27, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2018.12.031>

SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Estatística anual de casos de intoxicação e envenenamento: Brasil, 1999. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz/Centro de Informação Científica e Tecnológica; 2009. Disponível em: <https://sinitox.icict.fiocruz.br/dados-nacionais> Acesso em: 03 de abril de 2023

SIM, H.; KIM, B.; LEE, J. A Systematic Approach for the Determination of B-Group Vitamins in Multivitamin Dietary Supplements by High- Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection and Mass Spectrometry. *Journal of AOAC international*, v. 99, n.5, 2016, 10.5740/jaoacint.16-0093.

SIMÕES, E.F.C.; LEITÃO, J.M.M.; SILVA, J.C.G.E. Sulfur and nitrogen co-doped carbon dots sensors for nitric oxide fluorescence quantification. *Analytical Chimica Acta*, v.960, p. 117-122, 2017, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.007>

SOTOLONGO-GARCÍA, R.; RODRÍGUEZ-VELÁZQUEZ,E.; ALATORRE-MEDA, M.; OROPEZA-GUZMÁN, M.T.; TIRADO-GUÍZAR, A.; PINA-LUIS, G. Optimizing the Efficiency of a Cytocompatible Carbon-Dots-Based FRET Platform and Its Application as a Riboflavin Sensor in Beverages, *Nanomaterials*, v.11, p. 1-18, 2021, <https://doi.org/10.3390/nano11081981>.

SUN, Y.; ZHOU, B.; LIN, Y.; WANG, W.; FERNANDO, K.A.S.; PATHAK, P.; MEZIANI, M. J.; HARRUFF, B. A.; WANG, X.; WANG, H.; LUO, P. G.; YANG, H.; KOSE, M. E.; CHEN, B.; VECA, L. M.; XIE, S. Quantum-Sized Carbon Dots for Bright and Colorful Photoluminescence. *Journal American Chemical Society*, v. 128, n.24, p. 7756-7757, 2006, <https://doi.org/10.1021/ja062677d>

SUPHAROEK,S.; WEERASUK, B.; GRUDPAN, K.; PONHONG, K. Green Flow Injection Spectrophotometry with Betel Nut (*Areca catechu* L.) Natural Reagent for Indirect Determination of Ascorbic Acid. *Journal of Analytical Chemistry*, 77,10,1274-1281, 2022, <https://doi.org/10.1134/S1061934822100148>

SUWANNASOM, N.; KAO, I.; PRUB, A.; GEORGIEVA, R.; BÄUMLER, H. Riboflavin: The Health Benefits of a Forgotten Natural Vitamin. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 950, 2020, 10.3390/ijms21030950.

TAMMINA, S.K.; YANG, Y. Highly sensitive and selective detection of 4-nitrophenol, and on-off-on fluorescence sensor for Cr (VI) and ascorbic acid detection by glucosamine derived n-doped carbon dots. *Journal of Photochemistry & Photobiology A: Chemistry*, v. 387, n. 112134, p. 1-11, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2019.112134>.

TANG, Y.; DONG, X.; WANG, M.; GUO, B. Dual emission N-doped carbon dots as a ratiometric fluorescent and colorimetric dual-signal probe for indigo carmine detection. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 290, n. 122310, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.122310>

TANG, X.; YU, H.; BUI, B.; WANG, L.; XING, C.; WANG, S.; CHEN, M.; HU, Z.; CHEN, W. Nitrogen-doped fluorescence carbon dots as multi-mechanism detection for iodide and curcumin in biological and food samples. *Bioactive Materials*, v. 6, p. 1541-1554, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.11.006>

TIAN, H.; JU, G.; LI, M.; FU, W.; DAI, Y.; LIANG, Z.; QIU, Y.; QIN, Z.; YIN, X. Fluorescent “on-off-on” sensor based on N,S codoped carbon dots from seaweed (*Sargassum carpophyllum*) for specific detection of Cr(VI) and ascorbic acid. *RSC advances*, v.11, p. 35946-35953, 2021, <https://doi.org/10.1039/D1RA06544K>.

TIKESHWARI; SHRIVAS, K.; PATEL, S.; MONISHA; KANT, T.; THAKUR, S.S.; PERVEZ, S.; DEB, M.K.; GHOSH, K.K. Dual-Mode Plasmonic and Paper-Based Colorimetric Assays for the Determination of Riboflavin in Green Leafy Vegetables and Whole Grains. *ACS Food science & Technology*, 3, 1824-1834, 2023, <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.3c00235>

TU, J.; YANG, X.; LIU, H.; CHEN, P.; LIU, K.; GAO, J. A ‘on-off-on’ fluorescent probe for sensitive detection of Fe³⁺ and ascorbic acid by cross-linking agent protected carbon dots, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 7319, 1-10,2020, <https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1720010>.

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

VAZ, R.; VIERIA, K.O.; MACHADO, C.E.; FERRARI, J.L.; SCHIAVON, M.A. Preparação de pontos de carbono e sua caracterização óptica: Um experimento para introduzir nanociência na graduação. *Química Nova*, v. 38, n. 10, p. 1366-1373, 2015, <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150150>.

VIDAL, P. C. L.; FREITAS, G. ESTUDO DA ANTIOXIDAÇÃO CELULAR ATRAVÉS DO USO DA VITAMINA C. *Revista Uningá*, 2, 60-64, 2015.

VIOL, L.C.S.; SILVA, F.O.; FERREIRA, D.L.; ALVES, J.L.A.; SCHIAVON, M.A. Precipitação seletiva de tamanhos em nanopartículas semicondutoras coloidais de cdte e cdse: um estudo por espectroscopia UV-VIS. *Química Nova*, v.34,n 4, p. 595-600, 2011, <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000400008>

VISHNIKIN, A.; MIEKH, Y.; DENISENKO, T.; BAZEL, Y.; ANDRUCH, V. Use of sequential injection analysis with lab-atvalve and an optical probe for simultaneous spectrophotometric determination of ascorbic acid and cysteine by mean centering of ratio kinetic profiles. *Talanta*, 188, 99-106, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.056>.

XIAO, Q.; MU, P.; NIG, G.; ZHANG, W.; LI, B.; HUANG, S. A ratiometric fluorescent probe for simultaneous detection of L-ascorbic acid and alkaline phosphatase activity based on red carbon dots/polydopamine nanocomposite. *Talanta*, v. 264, n. 124724, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124724>

XU, J.; CUI, K.; GONG, T.; ZHANG, J.; ZHAI, Z.; HOU, L.; ZAM, F.; YUAN, C. Ultrasonic-Assisted Synthesis of N-Doped, Multicolor Carbon Dots toward Fluorescent Inks, Fluorescence Sensors, and Logic Gate Operations. *Nanomaterials*, v. 12, p. 312, 2022, [10.3390/nano12030312](https://doi.org/10.3390/nano12030312).

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*, v. 4, p. 7204-7219, 2016, <https://doi.org/10.1039/C6TB02131J>

XU, S.; YE, S.; XU, Y.; LIU, F.; ZHOU, Y.; YANG, Q.; PENG, H.; XIONG, H.; ZHANG, Z. Microwave-assisted Synthesis of N,S-co-carbon Dots as Switch-on Fluorescent Sensor for Rapid and Sensitive Detection of Ascorbic Acid in Processed Fruit Juice. *Analytical Sciences*, v.36, n.3, p. 353-360, 2020, 10.2116/analsci.19P350

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. *Journal American Chemical Society*, 126, 40, 12736–12737, 2004, <https://doi.org/10.1021/ja040082h>

YU, B.; LIU, Y.; CAO, M.; ZHU, M.; CHEN, R.; LI, H. Multi-color carbon dots from *cis*-butenedioic acid and urea and highly luminescent carbon dots@Ca(OH)₂ hybrid phosphors with excellent thermal stability for white light-emitting diodes. *Journal of Luminescence*, v. 237, n. 118202, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2021.118202>

YUAN, F.; LI, S.; FAN, Z.; MENG, X.; FAN, L.; YANG, S. Shining carbon dots: Synthesis and biomedical and optoelectronic applications. *Nano Today*, v.11, n.5, p. 565-586, 2016, <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2016.08.006>

WAGNER A.M.; KNIPE, J.M.; ORIVE, G.; PEPPAS, N.A. Quantum dots in biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, v. 94, p. 44-63, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.022>

WANG, C.; SHI, H.; YANG, M.; YAO, Z.; ZHANG, B.; LIU, E.; HU, X.; XUE, W.; FAN, J. Biocompatible sulfur nitrogen co-doped carbon quantum dots for highly sensitive and selective detection of dopamine. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 205, n. 111874, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111874>

WANG, H.; MU, W.; WANG, S.; SHI, L.; MA, T.; LU, Y. Facile synthesis of NS-doped carbon dots as sensitive “ON-OFF-ON” fluorescent sensor for Cu²⁺ and GSH detection. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v.305, n. 123460, 2024, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2023.123460>

WANG, J.; SU, S.; WEI, J.; BAHGI, R.; HOPE-WEEKS, L.; QIU, J.; WANG, S. Ratio-metric sensor to detect riboflavin via fluorescence resonance energy transfer with ultrahigh sensitivity. *Physica E*, v. 72, p. 17-24, 2015, 10.1016/j.physe.2015.04.006.

WANG, J.; ZHENG, J.; YANG, Y.; LIU, X.; QIU, J.; TIAN, Y. Tunable full-color solid-state fluorescent carbon dots for light emitting diodes. *Carbon*, v.190, p.22-31, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2022.01.001>.

WANG, M.; SHI, R.; GAO, M.; ZHANG, K.; DENG, L.; FU, Q.; WANG, L.; GAO, D. Sensitivity fluorescent switching sensor for Cr (VI) and ascorbic acid detection based on orange peels-derived carbon dots modified with EDTA. *Food Chemistry*, v.318 n.126506, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126506>.

WEGBOM, A.I.; EDET, C.K.; RAIMI, O.; FAGBAMIGBE, A.F.; KIRI, V.A. Self-Medication Practices and Associated Factors in the Prevention and/or Treatment of COVID-19 Virus: A Population-Based Survey in Nigeria. *Frontiers in public health*, v.9, n.606801, 2021, 10.3389/fpubh.2021.606801.

WHO, World Health Organization, 2020, disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/66154/WHO_EDM_QSM_00.1_eng.pdf Acesso em: 23/08/2023

WU, Y.; LIU, Y.; YIN, J.; LI, H.; HUANG, J. Facile ultrasonic synthesized NH₂-carbon quantum dots for ultrasensitive Co²⁺ ion detection and cell imaging. *Talanta*, v.205, n. 120121, p.1-8, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120121>

ZHAO, Y.; ZHU, X.; LIU, L.; DUAN, Z.; LIU, Y.; ZHANG, W.; CUI, J.; RONG, Y.; DONG, C. One-Step Synthesis of Nitrogen/Fluorine Co-Doped Carbon Dots for Use in Ferric Ions and Ascorbic Acid Detection. *Nanomaterials*, v. 12, n. 2377, 2022, <https://doi.org/10.3390/nano12142377>

ZHOU, T.; LI, H.; SHANG, M.; SUM, D.; LIU, C.; CHE, G. Recent analytical methodologies and analytical trends for riboflavina (vitamin B2) analysis in food, biological and pharmaceutical samples. *Trends in analytical Chemistry*, v. 143, n. 116412, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116412>.

ZHU, S.; SONG, Y.; ZHAO, X.; SHAO, J.; ZHANG, J.; YANG, B. The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): Current state and future perspective. *Nano Research*, v.8 p. 355-381, 2015, <https://doi.org/10.1007/s12274-014-0644-3>.

ZU, F.; YAN, F.; BAI, Z.; XU, J.; WANG, Y.; HUANG, Y.; ZHOU, X. The quenching of the fluorescence of carbon dots: A review on mechanisms and applications. *Microchim Acta*, v.184, p. 1899-1914, 2017, <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2318-9>.

ZULFAJRI, M.; DAYALAN, S.; LI, W.; CHANG, C.; CHANG, Y.; HUANG, G. G. Nitrogen-doped carbon dots from averrhoa carambola fruit extract as a fluorescent probe for methyl orange. *Sensors*, v.19, n. 22, p.1-17, 2019, [10.3390/s19225008](https://doi.org/10.3390/s19225008).