



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

NATTANY TAYANY GOMES DE PAULA

**APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS FLUORESCENTES NA
DETERMINAÇÃO DE QUERCETINA E CURCUMINA EM
AMOSTRAS DE ALIMENTOS E BEBIDAS**

Recife
2019

NATTANY TAYANY GOMES DE PAULA

**APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS FLUORESCENTES NA
DETERMINAÇÃO DE QUERCETINA E CURCUMINA EM
AMOSTRAS DE ALIMENTOS E BEBIDAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Química.

Área de concentração: Química analítica

Orientadora: Prof.^a Dr^a. Ana Paula Silveira Paim.

Orientador Externo: Prof. Dr. André Fernando Lavorante.

Recife

2019

Catálogo na fonte
Bibliotecária Arabelly Ascoli CRB4-2068

P324a Paula, Nattany Tayany Gomes de
Aplicação de nanopartículas fluorescentes na determinação de
quercetina e curcumina em amostras de alimentos e bebidas /
Nattany Tayany Gomes de Paula. – 2019.
143 f.: il. fig., tab.

Orientadores: Ana Paula Silveira Paim, André Fernando
Lavorante
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CCEN. Química. Recife, 2019.
Inclui referências e apêndice.

1. Carbon dots. 2. Quantum dots ternários. 3. Quenching. 4.
Fluorescência. I. Paim, Ana Paula Silveira. (orientadora). II.
Lavorante, André Fernando (orientador). III. Título.

543 CDD (22. ed.) UFPE-CCEN 2020-62

Nattany Tayany Gomes de Paula

**APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS FLUORESCENTES NA
DETERMINAÇÃO DE QUERCETINA E CURCUMINA EM
AMOSTRAS DE ALIMENTOS E BEBIDAS**

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Química
do Departamento de Química Fundamental
da Universidade Federal de Pernambuco,
como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Doutora em química.

Aprovada em: 29/08/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Silveira Paim (Orientadora)
Departamento de Química Fundamental - UFPE

Prof. Dr. Euzébio Skovroinski
Instituto de Tecnologia Edson Mororó Moura

Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos
Instituto de Química e Biotecnologia - UFAL

Prof. Dr. Marcelo Navarro
Departamento de Química Fundamental - UFPE

Prof^a. Dr^a. Maria José Filgueiras Gomes
Departamento de Química - UFRPE

Dedico este trabalho aos meus pais, Midiam, Hélio e Justino, por todo amor, apoio e incentivo para tornar possível a minha chegada até aqui. As minhas avós Maria e Marli (*in memorian*) que infelizmente não podem estar presentes fisicamente, mas estão presentes no meu coração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por ter me dado forças para prosseguir em todos os momentos difíceis;

Aos meus orientadores, professora Ana Paula Paim e professor André Lavorante, pela orientação, confiança, oportunidade e ensinamentos ao longo do doutorado;

Aos meus pais pelo amor, pelo apoio, por me ajudarem sempre mesmo com todas as dificuldades, em especial a minha mãe que sempre esteve comigo e sempre me incentivou a estudar;

Ao meu segundo pai, Justino, pelo amor, cuidado e que teve um papel fundamental na minha formação acadêmica;

A minha grande amiga Cláudia Barros, que me guiou nas minhas primeiras experiências na universidade me incentivando a não desistir;

Ao meu grande amigo/irmão Filipe que sempre me apoiou e esteve presente para me ajudar no que fosse preciso nesses 10 anos de amizade;

Ao meu companheiro Tiné, pelo amor e apoio nessa etapa final da minha formação acadêmica;

Ao meu grupo de pesquisa pela contribuição no trabalho e pela troca de experiências: Paulo, Bianca, Juliana, Arthur, Larissa e Felipe;

Ao grupo do Laboratório de Eletrossíntese (LES), em especial a Richardson Robério da Silva e Denilson de Vasconcelos Freitas que contribuíram grandemente com este trabalho realizando a síntese dos *quantum dots* ternários (CuInS₂-GSH);

Aos meus amigos (*best friends*), Amanda, Carine, Jamerson, Lidiane, Nayara e Renê, pela amizade, todos no mesmo barco, trocando experiências, dividindo as alegrias e aflições da vida acadêmica e pessoal;

Aos amigos Queila, Jucleiton, Dmis e Danilo, por todo carinho, apoio e amizade, vocês foram fundamental na reta final deste trabalho;

Aos amigos do LAQIS, onde passei os 10 anos da minha vida acadêmica desenvolvendo pesquisa, fazendo amigos, ajudando pessoas e sendo ajudada. Tenho um imenso carinho por todo o grupo: Nathália, José Ailton, Carlos, Maysa, Tayane, Gabriel e Alex;

Aos amigos da mesa de estudos do LAQIS, onde estudamos muito dando boas risadas e as vezes até choramos, brigamos porque estava frio ou porque estava calor, fomos almoçar no RU, mas também comemos hamburguer, salada, sushi, ou qualquer coisa que ajudasse a aliviar a nossa ansiedade. Agradeço a amizade de todos: Rômulo, Mirella, Thayná, Renê, Nayara, Lidianne, Amanda, Helena, Arthur, Larissa, Nathália, José Ailton e Maysa.

Aos amigos do LAMTESA que a cada ano entram e saem pessoas, mas a amizade fica: Renê, Nayara, Lidianne, Amanda, Helena, Thayná, Carine, Aline, Bianca, Juliana, Danielle, Arthur, Larissa, Jamerson, José Paulino e Heliana.

Aos meus amigos, Alanna, Juliana, Mariana, Hanelly, Neto e Cecília, pela amizade, pelo apoio em todos os momentos, pelas risadas, saídas, conselhos e incentivo.

A todos os professores que puderam contribuir imensamente com minha formação acadêmica ao longo desses anos;

A CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

Este trabalho envolve o desenvolvimento de dois métodos analíticos. O primeiro consiste na determinação de quercetina em chás e cervejas baseado no *quenching* da fluorescência de *carbon dots* (CDs). Os CDs foram preparados empregando um método hidrotermal, no qual o citrato de sódio foi tratado na presença de hidrogenocarbonato de amônio (NH_4HCO_3) à 180°C por 4 h. A caracterização do *carbon dot* foi realizada por meio das técnicas de microscopia eletrônica de varredura e infravermelho, podendo-se observar a formação de nanopartículas esféricas e a presença de grupos carboxilatos e vibração de estiramentos O – H e N – H. Os CDs apresentaram emissão de radiação em 450 nm com excitação em 380 nm e um *quenching* máximo na presença de quercetina foi observado em pH 11,0. Após a otimização do método proposto, obteve-se resposta linear para o intervalo de concentração de quercetina entre 1,0 e 10,0 mg L^{-1} ($F/F_0 = (0,1511 \pm 0,0075) \cdot [Q] + (0,8922 \pm 0,0384)$, $R = 0,9963$) à temperatura ambiente, usando 0,08 mL de dispersão de CDs e 0,1 mol L^{-1} de uma solução tampão de Ringer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaOH}$) pH 11,0. Foi estimado um limite de detecção de 0,85 mg L^{-1} e um desvio padrão relativo de 0,21% ($n = 3, 4$ mg L^{-1} quercetina). O teste de adição e recuperação com amostra de chás e cervejas foi realizado e foram obtidos valores de recuperação entre 80 e 107%, indicando não haver efeito de matriz. O segundo método analítico consiste na determinação de curcumina em amostras de açafrão-da-terra baseado no *quenching* da fluorescência de *quantum dots* (QDs) ternários CuInS_2 estabilizados com glutathione (GSH). Para caracterização foi obtido o espectro de transmitância no infravermelho dos QDs, podendo-se observar deformação de NH e estiramento de ligação C = O. As nanopartículas foram sintetizadas pela metodologia eletroquímica, em meio aquoso e apresentaram emissão em 545 nm com excitação em 290 nm, sendo observado um *quenching* máximo na presença de curcumina em pH 11,0. Após a otimização do sistema uma resposta linear foi obtida para uma faixa de concentração entre 1,0 e 10,0 mg L^{-1} de curcumina ($F_0/F = (0,0581 \pm 0,0023) \cdot [C] + (0,9533 \pm 0,0097)$, $R = 0,9969$) à temperatura ambiente, usando 0,10 mL de QDs e 0,15 mol L^{-1} de uma solução tampão de Sörensen (Glicocol – NaOH) pH 11,0. Foi estimado um limite de detecção de 0,17 mg L^{-1} e um desvio padrão relativo de 0,10% ($n = 3$) para solução de curcumina 4 mg L^{-1} . O teste de adição e recuperação com amostras de açafrão-da-terra foi realizado e foram obtidos valores de recuperação entre 94 e 107%. Este procedimento foi adequado para determinar a curcumina em amostras de açafrão-da-terra de forma simples e rápida. Logo, métodos simples e precisos empregando nanopartículas que apresentam baixa toxicidade ao meio ambiente foram propostos para determinação de quercetina e curcumina em matrizes alimentícias.

Palavras-chave: Carbon dots. Quantum dots ternários. Quenching. Fluorescência. Flavonoides.

ABSTRACT

This work involves the development of two analytical methods. The first method is the determination of quercetin in teas and beers samples based on carbon dot (CDs) fluorescence quenching. The CDs were prepared using a hydrothermal method in which sodium citrate was treated within ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3) at 180°C for 4 h. The carbon dot characterization was performed by transmission electron microscopy and infrared techniques. The formation of spherical nanoparticles and the presence of carboxylate groups and vibration of O - H and N - H stretches were observed. The CDs presented radiation emission at 450 nm with excitation at 380 nm and a maximum quenching in the presence of quercetin was observed at pH 11.0. After the experiment optimization, linear response was obtained for a quercetin concentration range between 1.0 and 10 mg L^{-1} ($F/F_0 = (0.1511 \pm 0.0075) * [Q] + (0.8922 \pm 0.0384)$, $R = 0.9963$) at room temperature using 0.08 mL of CDs and 0.1 mol L^{-1} of a $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$ buffer pH 11.0. A limit of detection 0.85 mg L^{-1} and a relative standard deviation of 0.21% ($n = 3$, 4 mg L^{-1} quercetin) and recovery values between 80 and 107% for teas and beers, demonstrating the possibility of application the proposed method for quercetin analysis. Finally, the tea and beer sample addition and recovery test was performed and recovery values between 80 and 118% were obtained. The second analytical method is the determination of curcumin in turmeric samples based on the CuInS_2 -GSH ternary quantum dots fluorescence quenching (QDs). For characterization, the infrared transmittance spectrum of the QDs was obtained, and NH deformation and C = O binding stretch could be observed. The nanoparticles were synthesized by the electrochemical methodology, in aqueous medium and stabilized with glutathione, presenting emission at 545 nm and excitation at 290 nm, being observed a maximum quenching in the presence of curcumin at pH 11. After the system optimization a linear response was obtained. for a concentration range between 1.0 and 10 mg L^{-1} curcumin ($F_0/F = (0.0581 \pm 0.0023) * [C] + (0.9533 \pm 0.0097)$, $R = 0.9969$) at room temperature using 0.10 mL of QDs and 0.15 mol L^{-1} of a Glycine/ NaCl/NaOH buffer pH 11.0. A limit of detection 0.17 mg L^{-1} and a relative standard deviation of 0.10% ($n = 3$) for 4 mg L^{-1} curcumin solution were estimated. The addition and recovery test with turmeric samples was performed and recovery values between 94 and 107% were obtained. This procedure successfully suitable to determine curcumin in turmeric samples simply and quickly. Therefore, simple and precise methods employing nanoparticles with low environmental toxicity were proposed to determine quercetin and curcumin in food matrices.

Keywords: Carbon dots. Ternary quantum dots. Quenching. Fluorescence. Flavonoid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ilustração de vários materiais numa escala de milímetros à nanômetro.	25
Figura 2 -	Esquema representativo da determinação de mercúrio através do nanosensor químico sintetizado com rodamina B e <i>quantum dots</i> de grafeno.....	32
Figura 3 -	Esquema representativo da determinação de <i>Salmonella</i> spp. através do bionanosensor eletroquímico baseado no aptâmero específico de <i>Salmonella</i>	33
Figura 4 -	Esquema representativo da determinação de morfina através do bionanosensor sintetizado QD-CdS funcionalizado com antimorfina.	34
Figura 5 -	Esquema ilustrativo da síntese dos CDs e sua aplicação na determinação de quercetina explorando o <i>quenching</i> da fluorescência (DE PAULA et al., 2019).....	36
Figura 6 -	Estruturas de nanomateriais de carbono por ordem de descoberta.....	37
Figura 7 -	Representação esquemática básica dos flavonoides.	41
Figura 8 -	Estruturas químicas dos diferentes flavonoides.	43
Figura 9 -	Sobreposição dos espectros de absorção (—) excitação (—) e emissão (...) dos CDs sintetizados e espectro de absorção da quercetina (...), a figura em miniatura (destaque) representa a imagem dos CDs sob irradiação de luz por uma lâmpada UV em 380 nm (esquerda) e sob luz natural (direita).	61
Figura 10 -	Imagens dos CDs sintetizados obtidas por MET.....	62
Figura 11 -	Espectro de transmitância no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) dos CDs.....	63
Figura 12 -	Constante de Stern-Volmer (K_{sv}) em função do pH da solução tampão a ser empregada na determinação de quercetina. pH das soluções tampão variou entre 2 e 12. .	65

Figura 13 -	Sinais transientes referentes aos CDs e a reação entre os CDs e a quercetina (10 mg L ⁻¹), pH 11. O sinal foi monitorado em 450 nm.	66
Figura 14 -	Espectros de fluorescência para a determinação de quercetina, soluções de referência contendo: 0 - 10 mg L ⁻¹ , em destaque a curva analítica para a quercetina.	70
Figura 15 -	Curvas analíticas obtidas da reação entre os CDs e a quercetina sob diferentes temperaturas: 25, 30 e 35°C, respectivamente.	71
Figura 16 -	Espectro de absorção dos CDs, da quercetina e do produto da interação entre os CDs e a quercetina.	74
Figura 17 -	Perfil de decaimento de emissão de fluorescência dos CDs e dos CDs na presença de 10 mg L ⁻¹ de quercetina em solução tampão pH 11,0 ($\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$).	75
Figura 18 -	Esquema ilustrativo da aplicação dos QDs ternários na determinação de curcumina através do quenching da fluorescência.	84
Figura 19 -	Esquema das bandas de semicondutores intrínseco, <i>tipo-n</i> e <i>tipo-p</i>	85
Figura 20 -	Níveis de energia ou orbitais moleculares de moléculas diatômicas ao material na sua forma macroscópica. LUMO: Orbital Molecular desocupado de menor energia; HOMO: Orbital Molecular Ocupado de maior energia; QDs: <i>quantum dots</i> ; Eg: Band Gap; BC: banda de condução; BV: banda de valência.	86
Figura 21 -	Representação esquemática da influência do efeito do confinamento quântico nos níveis de energia dos nanocristais semicondutores de mesma composição. O band gap (E_g) aumenta com a diminuição do tamanho das nanopartículas.	87
Figura 22 -	Representação esquemática da estrutura core-shell do <i>quantum dot</i>	88
Figura 23 -	Estrutura química da curcumina.	90

Figura 24 -	Estrutura da curcumina na sua forma enólica com os hidrogênios ácidos destacados em vermelho.....	91
Figura 25 -	Equilíbrio ceto-enólico apresentado pela curcumina.	91
Figura 26 -	Célula de cavidade utilizada nas sínteses dos QDs.....	99
Figura 27 -	Sobreposição dos espectros de absorção (–), excitação (–) e emissão com excitação fixada em 290 nm (...) dos QDs e espectro de absorção da curcumina (...), a figura em miniatura representa a imagem dos QDs sob irradiação de luz por uma lâmpada UV-290 nm (esquerda) e sob luz natural (direita).....	104
Figura 28 -	Espectro de infravermelho dos QDs ternários.....	105
Figura 29 -	Estudo do pH com valores de F_0/F obtidos para solução 4 mg L ⁻¹ de curcumina em função da variação do pH.	106
Figura 30 -	Estudo da concentração da solução tampão (força iônica) a ser empregada na determinação de curcumina.	108
Figura 31 -	Sinais transientes referentes aos QDs e a reação entre os QDs e a curcumina (8 mg L ⁻¹), pH 11. O sinal foi monitorado em 545 nm.	109
Figura 32 -	Espectros de absorção eletrônica dos QDs, da curcumina e do produto da interação entre os QDs e a curcumina	111
Figura 33 -	Espectros de fluorescência para determinação de curcumina, soluções de referência contendo, 0 - 10 mg L ⁻¹ , em destaque a curva analítica para a curcumina.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Reagentes, solventes e suas especificações.....	49
Tabela 2 -	Preparo de soluções tampão.....	51
Tabela 3 -	Volumes, em mL, de dispersão de CDs, solução tampão, quercetina e água, usados na construção das curvas analíticas para o estudo do pH na determinação de quercetina.....	55
Tabela 4 -	Volumes, em mL, de dispersão de CDs, solução tampão, quercetina e água, usados na construção das curvas analíticas para o estudo da composição química da solução tampão na determinação de quercetina.....	56
Tabela 5 -	Volumes, em mL, de dispersão de CDs, solução tampão, quercetina, e água, usados na construção das curvas analíticas para o estudo da temperatura na determinação de quercetina.....	57
Tabela 6 -	Volumes, em mL, de dispersão de CDs, solução tampão, quercetina, amostra e água, usados no experimento de adição e recuperação na determinação de quercetina em amostras de cervejas.....	58
Tabela 7 -	Volumes, em mL, de dispersão de CDs, solução tampão, quercetina, amostra e água, usados no experimento de adição e recuperação na determinação de quercetina em amostras de chás.....	58
Tabela 8 -	Equação da reta e coeficiente de correlação (R) de acordo com a variação do volume de dispersão de CDs para a determinação de quercetina.....	67
Tabela 9 -	Equação da reta e coeficiente de correlação (R) de acordo com a variação da composição química da solução tampão para a determinação de quercetina.....	68

Tabela 10 -	Equação da reta e coeficiente de correlação (R) de acordo com a variação da concentração da solução tampão para a determinação de quercetina.....	69
Tabela 11 -	Constantes de Stern-Volmer (K_{sv}), constantes de ligação (K_b), número de sítios ligantes (n) e os parâmetros termodinâmicos obtidos da interação entre os CDs e a quercetina em diferentes temperaturas.....	72
Tabela 12 -	Estudo de interferência para diferentes substâncias na determinação de quercetina.....	76
Tabela 13 -	Parâmetros estabelecidos após a otimização do procedimento proposto para a determinação de quercetina.....	77
Tabela 14 -	Comparação das características analíticas de metodologias empregadas na determinação de quercetina.....	80
Tabela 15 -	Resultados obtidos para o teste de adição e recuperação para a determinação de quercetina.....	82
Tabela 16 -	Reagentes, solventes e suas especificações.....	97
Tabela 17 -	Parâmetros utilizados na síntese dos QDs.....	100
Tabela 18 -	Volumes, em mL, usados na construção das curvas analíticas para o estudo da composição química da solução tampão na determinação de curcumina.....	101
Tabela 19 -	Volumes, em mL, de QDs, solução tampão, água, curcumina e amostra, usados no experimento de adição e recuperação na determinação de curcumina.....	103
Tabela 20 -	Equação da reta e coeficiente de correlação de acordo com a variação da composição química da solução tampão utilizada na determinação de curcumina.....	107
Tabela 21 -	Equação da reta e coeficiente de correlação de acordo com a variação do volume de QDs utilizados na determinação de curcumina.....	110

Tabela 22 -	Tolerância para os possíveis interferentes estudados na determinação de curcumina.....	112
Tabela 23 -	Parâmetros estabelecidos após a otimização do procedimento proposto para determinação de curcumina.	114
Tabela 24 -	Características analíticas de metodologias empregadas na determinação de curcumina.....	116
Tabela 25 -	Resultados obtidos para o teste de adição e recuperação nas amostras de açafrões analisadas.....	117

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CDs	<i>Carbon dots</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência – ultravioleta
DSC	Células solares sensibilizadas por corantes
FOSHU	<i>Foods for specified health use</i>
FTIR	Espectrometria no infravermelho por transformada de Fourier
GSH	Glutathione
HOMO	Orbital Molecular Ocupado de maior energia (do inglês, <i>highest occupied molecular orbital</i>)
HPLC	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, High performance liquid chromatography)</i>
LASiS	Síntese por ablação a laser em solução (do inglês, <i>Laser Ablation Synthesis in Solution</i>)
LED	<i>Diodo emissor de luz (do inglês, Light emitting diode)</i>
LUMO	Orbital Molecular desocupado de menor energia (do inglês, <i>lowest unoccupied molecular orbital</i>);
MET	Microscopia de transmissão eletrônica
MWCNTs	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês, <i>Multiwalled carbon nanotubes</i>)
QDs	<i>Quantum dots</i>
QY	Rendimento quântico (do inglês, <i>Quantum Yield</i>)
R	Coeficiente de correlação linear
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês, <i>Relative Standard Deviation</i>)
SWCNTs	Nanotubos de carbono de parede única (do inglês, <i>Single-walled carbon nanotubes</i>)
UV-VIS	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	24
2.1	NANOPARTÍCULAS	24
2.1.1	Classificação das nanopartículas	26
2.1.1.1	Nanopartículas orgânicas	26
2.1.1.2	Nanopartículas inorgânicas.....	26
2.1.1.3	Nanopartículas derivadas de carbono	28
2.1.2	Síntese das nanopartículas.....	28
2.1.3	Aplicação das nanopartículas	29
2.1.3.1	Nanopartículas em nanomedicina.....	29
2.1.3.2	Nanopartículas como sensores em química analítica	31
3	USO DE CARBON DOTS SINTETIZADOS A PARTIR DE CITRATO COMO SENSOR FLUORESCENTE PARA A DETERMINAÇÃO DE QUERCETINA EM AMOSTRAS DE CHÁS E CERVEJAS	36
3.1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	37
3.1.1	Carbon dot	37
3.1.2	Flavonoides	41
3.1.3	Métodos para a determinação de quercetina.....	45
3.2	OBJETIVOS	48
3.2.1	Geral	48
3.2.2	Específicos	48
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.3.1	Reagentes e solventes.....	49
3.3.2	Soluções.....	50
3.3.2.1	Soluções estoque.....	50
3.3.2.2	Soluções de trabalho.....	50
3.3.2.3	Soluções tampão.....	51
3.3.3	Equipamentos e acessórios.....	51
3.3.4	Método.....	53
3.3.4.1	Síntese dos Carbon dots (CDs)	53
3.3.4.2	Espectro de infravermelho	53

3.3.4.3	Procedimento para a determinação de quercetina.....	53
3.3.4.4	Determinação de quercetina nas amostras de chás e cervejas.....	54
3.3.4.5	Estudo do pH ideal para a determinação de quercetina.....	54
3.3.4.6	Estudo do tempo de reação entre os CDs e a quercetina.....	55
3.3.4.7	Estudo do volume da solução contendo CDs.....	55
3.3.4.8	Estudo da composição química da solução tampão a ser empregada na determinação de quercetina.....	56
3.3.4.9	Estudo da concentração da solução tampão a ser empregada na determinação de quercetina.....	56
3.3.4.10	Mecanismo da supressão da fluorescência dos CDs induzido pela quercetina através da variação da temperatura	57
3.3.4.11	Estudo de interferentes na determinação de quercetina.....	57
3.3.4.12	Método de adição e recuperação na determinação de quercetina	57
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
3.4.1	Síntese dos <i>carbon dots</i>	60
3.4.2	Estudo do pH ideal para a determinação de quercetina.....	64
3.4.3	Estudo do tempo de reação entre os CDs e a quercetina	65
3.4.4	Estudo do volume da dispersão de CDs a ser empregado na determinação de quercetina	66
3.4.5	Estudo da composição química da solução tampão a ser empregada na determinação de quercetina.....	67
3.4.6	Estudo da concentração da solução tampão a ser empregada na determinação de quercetina	68
3.4.7	Mecanismo de interação entre os CDs e a quercetina.....	69
3.4.8	Estudo de interferentes para a determinação de quercetina	76
3.4.9	Figuras de mérito do método proposto para a determinação de quercetina	77
3.4.10	Método de adição e recuperação para a determinação de quercetina em amostras de chás e cervejas.....	81
4	USO DE QUANTUM DOTS TERNÁRIOS SINTETIZADOS VIA ELETROQUÍMICA COMO SENSOR FLUORESCENTE PARA A DETERMINAÇÃO DE CURCUMINA EM AMOSTRAS DE AÇAFRÃO-DA-TERRA.....	84
4.1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	85

4.1.1	Quantum dots	85
4.1.2	Curcumina	89
4.1.3	Métodos para a determinação de curcumina	93
4.2	OBJETIVOS	96
4.2.1	Geral	96
4.2.2	Específicos	96
4.3	MATERIAIS E MÉTODOS	97
4.3.1	Reagentes e solventes	97
4.3.2	Soluções	97
4.3.2.1	Soluções estoque	97
4.3.2.2	Soluções tampão.....	98
4.3.3	Equipamentos e acessórios	98
4.3.4	Método	98
3.3.4.1	Síntese dos <i>Quantum dots</i> (QDs)	98
3.3.4.2	Estudo do pH ideal para determinação de curcumina.....	100
3.3.4.3	Estudo da composição química da solução tampão a ser empregada da determinação de curcumina.....	100
3.3.4.4	Estudo da concentração da solução tampão a ser empregada na determinação de curcumina.....	101
3.3.4.5	Estudo do tempo de reação entre os QDs e a Curcumina	101
3.3.4.6	Estudo do volume da solução contendo QDs a ser empregado da determinação de curcumina.....	102
3.3.4.7	Estudo de possíveis interferentes para a determinação de curcumina	102
3.3.4.8	Teste de adição e recuperação para a determinação de curcumina em amostras de açafrão-da-terra.....	102
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
4.4.1	Síntese dos <i>quantum dots</i>	104
4.4.2	Estudo do pH ideal para a determinação de curcumina	106
4.4.3	Estudo da composição química da solução tampão a ser empregada na determinação de curcumina	107
4.4.4	Estudo da concentração da solução tampão a ser empregada na determinação de curcumina	108
4.4.5	Estudo do tempo de reação entre os QDs e a curcumina	109

4.4.6	Estudo do volume da solução contendo QDs a ser empregado da determinação de curcumina	110
4.4.7	Mecanismo de interação entre os QDs e a curcumina	110
4.4.8	Estudo de interferentes para a determinação de curcumina	112
4.4.9	Figuras de mérito do método proposto para a determinação de curcumina	113
4.4.10	Teste de adição e recuperação para a determinação de curcumina em amostras de açafrão-da-terra	117
4	CONCLUSÃO	118
	REFERÊNCIAS.....	120
	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO EM PERIÓDICO.....	132

1 INTRODUÇÃO

As nanopartículas fluorescentes, como por exemplo os pontos quânticos de carbono (*carbon dots* – CDs) e os pontos quânticos (*quantum dots* – QDs), têm recebido bastante atenção devido as suas propriedades únicas. Com diâmetro inferior a 10 nm e apresentando forte luminescência, estas nanopartículas têm sido empregadas em diversas aplicações, como: bioimagem, biomarcadores, sensores, dispositivos eletrônicos, entre outras. No *quantum dots* o estado de forte confinamento quântico permite que as suas propriedades óticas sejam alteradas apenas com a alteração do tamanho dos mesmos. Os *carbon dots* apresentam boa condutividade, baixa toxicidade, forte emissão de fotoluminescência, propriedades ópticas e eletrônicas (SILVA et al., 2010; NAMDARI; NEGAHDARI; EATEMADI, 2017; TUERHONG; YANG; XUE-BO, 2017). As nanopartículas têm sido aplicadas nos setores alimentício, saúde, catálise, meio ambiente, entre outros.

No campo da alimentação e saúde, é crescente o número de pessoas que priorizam o aumento da expectativa de vida e que se preocupam cada vez mais em ter uma vida mais saudável (ABE-MATSUMOTO; SAMPAIO; BASTOS, 2015). Uma série de estudos demonstram que existe uma correlação entre alimentos e saúde. No Japão, na década de 1980, quando o governo procurava estabelecer um novo conceito de alimentos com potenciais benefícios como uma tentativa de reduzir o crescente custo com a saúde, surgiu o termo “*foods for specified health use*” (FOSHU), que era usado para designar alimentos que proporcionavam algum benefício específico à saúde, devido a sua composição nutricional. Junto com este termo surgiram novos termos, como por exemplo, o termo nutracêuticos (CÂNDIDO, 2002). Nutracêuticos são alimentos ou parte de alimentos, de origem vegetal ou animal, que além de seu valor nutritivo possuem compostos bioativos que oferecem benefícios a saúde humana (SANTINI; TENORE; NOVELLINO, 2017).

A busca por alimentos nutracêuticos, com o intuito de melhorar a saúde ao longo da vida tem sido bastante investigada nos últimos anos (LÓPEZ-GUTIÉRREZ et al., 2016). Entre os componentes presentes nesses alimentos, estão os polifenóis de fonte natural, que têm recebido cada vez mais atenção da população. O interesse se deve à comprovação da atuação dos polifenóis na

prevenção de várias doenças que envolvem radicais livres, uma vez que os polifenóis são os antioxidantes mais abundantes presentes na dieta humana e são componentes comuns em alimentos, como frutas, verduras, sementes, nozes, chocolate, vinho, cerveja, café e chá (SIQUEIRA; BOLINI; MACEDO, 2008; ELEAZU et al., 2017). Nos seres humanos, o processo de oxidação é tido como essencial para a produção de energia, mas se a produção de radicais livres ocorrer de forma descontrolada, isto pode ser prejudicial à saúde humana. Dentre os polifenóis antioxidantes, os flavonoides e a curcumina se destacam devido a sua capacidade de combater esses radicais livres (WANG et al., 2017; BABU; MOHAMMED; HARIKUMAR, 2019).

Os flavonoides são metabólitos secundários naturais que são amplamente distribuídos nos alimentos. São compostos orgânicos classificados segundo a estrutura química em flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavanóis e antocianidinas (ELEAZU et al., 2017). A quercetina (3,5,7,3'-4'-pentahidroxi flavona) é um dos flavonoides mais abundantes classificado como flavonol. A quercetina possui atividade antioxidante e antitumoral, devido a capacidade de combater os radicais livres (BHUIYA et al., 2017). Além de apresentar propriedades antioxidantes e antitumoral, a quercetina também possui propriedades antialérgicas, antivirais, antimutagênicas, de proteção cardiovascular, de prevenção da catarata e de inibição da peroxidação lipídica (ZOU et al., 2015). A quercetina é encontrada em altas concentrações em cebola, couve, vagem, brócolis e tomate. Também é encontrada em frutas, com maior concentração em maçã e em bebidas, como a cerveja, café, achocolatado, vinho e chá. Estes alimentos são consumidos diariamente na dieta humana, porém, não é possível fazer uma quantificação exata do teor de quercetina ingerida devido à falta de dados sobre sua quantidade nos alimentos (BEHLING et al., 2004). Sendo assim, torna-se importante analisar alimentos que são fontes de quercetina a fim de conhecer os seus teores reais presentes nestes.

A curcumina (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona) é um pigmento natural de cor amarela derivado do rizoma da planta *Curcuma longa* L., planta pertencente à família das Zingiberaceae. O pó amarelo proveniente do rizoma da planta é chamado de turmérico, também conhecido popularmente como açafrão-da-índia, açafrão-da-terra, cúrcuma, gengibre

dourado, entre outros (SUETH-SANTIAGO et al., 2015; MARCHI et al., 2016). A curcumina se destaca pela sua atividade antioxidante, mas também apresenta propriedades como anticâncer, anti-inflamatória, antibacteriana e antidiabética, o que tem atraído bastante atenção de pesquisadores e aumentado seu consumo pela população (HU et al., 2017; HU et al., 2019). Sendo assim, é importante saber a concentração de curcumina que está sendo consumida, pois, seu uso em excesso pode levar a atividade pró-oxidante no DNA, estudos realizados empregando células PC12 demonstraram que em concentrações acima de 8 mg L^{-1} de curcumina havia uma redução da viabilidade celular e essa redução aumentava significativamente em concentrações de curcumina acima de 16 mg L^{-1} (MENDONÇA et al., 2009; HU et al., 2019).

Existem vários métodos utilizados para a determinação de quercetina e curcumina em alimentos e bebidas como exemplo, eletroforese capilar (MEMON et al., 2017), voltamétrico (ZIYATDINOVA; KOZLOVA; BUDNIKOV, 2018), espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) (THANGAVEL; DHIVYA, 2019), cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa (CLUE-EM) (YU et al., 2019a), Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE) (ANSARI et al., 2005), entre outros. Embora estes métodos possam ter apresentado boa precisão e alta sensibilidade, eles apresentam algumas desvantagens, como por exemplo, análise laboriosa, alto consumo de reagentes, alto custo de equipamentos e baixa frequência analítica. Quando comparados com outros métodos analíticos, os métodos que envolvem fluorescência como detecção, são rápidos, econômicos simples e possuem alta sensibilidade (LIU et al., 2015).

Os métodos desenvolvidos neste trabalho demonstraram simplicidade e precisão, além de serem considerados rápidos, pois a supressão da fluorescência das nanopartículas acontecia logo após a adição do analito ao meio reacional. O primeiro método se baseia na aplicação de CDs na determinação de quercetina em chás e cervejas, sendo um método versátil pela possibilidade de análise de diferentes amostras e o segundo método é baseado na aplicação de QDs ternários na determinação de curcumina em açafrão-da-terra. Neste sentido, foram sintetizados *carbon dots* por método hidrotermal e *quantum dots* através de um método eletroquímico. A determinação de

quercetina e curcumina baseou-se, respectivamente, no *quenching* da intensidade de fluorescência dos CDs e QDs sintetizados.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 NANOPARTÍCULAS

De modo geral as nanopartículas são partículas extremamente pequenas com tamanho de ordem nanométrica. O prefixo “nano” é adotado para valores que denotam a nona potência negativa de dez, sendo o nanômetro uma unidade de medida de comprimento correspondente a 10^{-9} metro que corresponde a um bilionésimo de 1 m (YOKOYAMA et al., 2008).

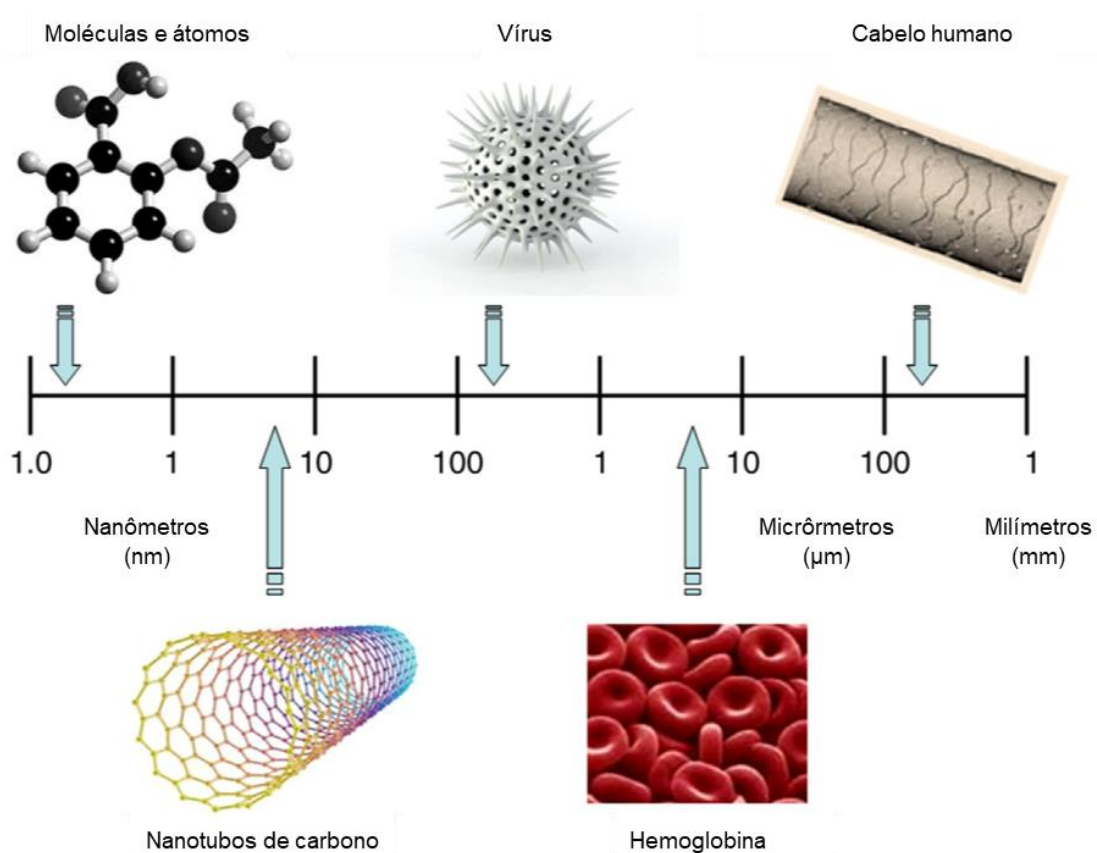
As nanopartículas não são apenas uma miniaturização da escala micron, os nanomateriais nesta escala mantêm as principais características de quando estão na sua forma macro, porém, em escala nanométrica estes mesmos materiais podem exibir propriedades físicas distintas das apresentadas na sua forma macro, exibindo propriedades únicas. Por exemplo, na escala nanométrica os materiais podem sofrer alteração de ponto de fusão, e no caso dos cristais, podem ter sua energia de rede reduzida, pois o número de átomos na superfície destes materiais passa a ter uma quantidade significativa quando relacionada ao número total de átomos que compõe a nanopartícula e a energia superficial desempenha um papel significativo na estabilidade térmica (CAO, 2004; CHAU; WU; YEN, 2007).

As nanopartículas possuem uma reatividade muito maior em relação aos seus análogos com tamanho maior, pois sua pequena dimensão faz com que essas partículas tenham uma maior razão de superfície por volume de meio reacional, ou seja, superfícies mais reativas (PALMQVIST, 2017).

Um nanomaterial é um material que pode assumir diferentes formas geométricas que possui pelo menos uma dimensão dentro da faixa de tamanho de 1 a 100 nm, ou seja, um determinado nanomaterial pode ser um filme de espessura nanométrica menor que 100 nm e ter um comprimento do tamanho de uma sala, ainda assim esse material será considerado um nanomaterial pois uma de suas dimensões é menor que 100 nm (PALMQVIST, 2017).

É possível citar diversos materiais que se apresentam em escala nanométrica no cotidiano. Um cabelo humano por exemplo tem, em média, 100.000 nm, enquanto na escala atômica os espaços entre os átomos de uma molécula possuem em média 0,15 nm (Figura 1).

Figura 1 - Ilustração de vários materiais numa escala de milímetros à nanômetro.



Fonte: Adaptado de Simões (SIMÕES; TAKEDA, 2017).

Apesar de não existir uma única definição aceita internacionalmente para as nanopartículas, em muitos casos são assim denominadas as partículas que possuem tamanho de 1 a 100 nm (YOKOYAMA et al., 2008). Segundo a Organização Internacional de Padronização (ISO) nanopartícula é um nano-objeto com todas as três dimensões externas em nanoescala e a faixa de tamanho compreendida na nanoescala é de, aproximadamente 1 e 100 nm (ISO, 2008 *apud* BOVERHOF et al., 2015).

A definição de nanopartículas difere dependendo das características dos materiais precursores, das áreas relacionadas e aplicações em questão. Em geral as nanopartículas são classificadas em orgânicas, inorgânicas e nanopartículas de carbono (EALIAS; SARAVANAKUMAR, 2017).

2.1.1 Classificação das nanopartículas

2.1.1.1 Nanopartículas orgânicas

Nanopartículas orgânicas são comumente definidas como partículas sólidas com diâmetro variando de 10 a 1000 nm e contendo compostos orgânicos, sendo os mais comuns, lipídios e polímeros (ALLOUCHE, 2013).

As nanopartículas orgânicas são modeladas a partir de moléculas orgânicas naturais ou sintéticas. Na natureza são encontradas inúmeras nanopartículas orgânicas, como agregados de proteínas, corpos lipídicos, emulsões de leite, podem ser encontradas também estruturas organizadas mais complexas, como por exemplo, o vírus. Estas nanopartículas também estão na composição de diversos produtos industrializados presentes na indústria alimentícia, de cosméticos como também podem estar presentes em formulações farmacêuticas. Uma característica importante das nanopartículas orgânicas é o fato de que estas partículas podem ser biodegradáveis e não tóxicas o que torna interessante seu uso no transporte de medicamentos e sua aplicação biomédica. Dendrímeros, micelas e lipossomas são as nanopartículas orgânicas mais comumente conhecidas (ROMERO; MOYA, 2012; EALIAS; SARAVANAKUMAR, 2017).

2.1.1.2 Nanopartículas inorgânicas

São consideradas nanopartículas inorgânicas as que em geral não são constituídas de carbono. Estas nanopartículas são produzidas à base de óxidos metálicos, metais, semicondutores e cerâmicas (JEEVANANDAM et al., 2018). As nanopartículas inorgânicas têm tamanhos que podem variar de 10 a 100 nm, esse tamanho reduzido faz com que estes materiais possuam características superficiais únicas, como elevada área superficial por volume, tamanho dos poros, densidade de carga superficial, maior reatividade e sensibilidade. As nanopartículas de metais são sintetizadas puramente com precursores de metais, seja por método construtivo ou destrutivo. Inúmeros metais podem ser sintetizados na forma de nanopartículas, os metais mais comumente utilizados são alumínio (Al), cádmio (Cd), cobalto (Co), cobre (Cu), ouro (Au), ferro (Fe),

chumbo (Pb), prata (Ag) e zinco (Zn) (EALIAS; SARAVANAKUMAR, 2017; PATTADAR et al., 2019).

A popularidade destas nanopartículas tem crescido devido a suas propriedades óticas, eletrônicas e físicas, que podem ser ajustáveis por tamanho, forma e composição do metal. Assim, estas nanopartículas possuem importantes aplicações em catálise (FAVIER; PLA; GÓMEZ, 2018), detecção (DISSANAYAKE et al., 2019; CHEN et al., 2019), transporte de fármaco (RAI et al., 2015; YU et al., 2019), como agente de imagem celular (KARMAKAR; MALLICK, 2019), como agente fungicida (SARDELLA; GATT; VALDRAMIDIS, 2019), entre outras aplicações (PATTADAR et al., 2019).

Outro tipo de nanopartícula inorgânica, são as nanopartículas sintetizadas a base de óxidos metálicos. Muitas vezes as nanopartículas de óxidos metálicos possuem propriedades mais eficientes que suas respectivas nanopartículas metálicas, um exemplo, são as nanopartículas de ferro que são oxidadas espontaneamente a óxido de ferro III (Fe_2O_3) quando na presença de oxigênio, e esse fenômeno faz com que sua reatividade seja aumentada. Outras nanopartículas de óxidos comumente sintetizados que apresentam maior eficiência que suas respectivas nanopartículas metálicas, são óxido de alumínio (Al_2O_3), óxido de cério (CeO_2), óxido de ferro (Fe_2O_3), magnetita (Fe_3O_4), dióxido de silício (SiO_2), óxido de titânio (TiO_2), óxido de zinco (ZnO) (EALIAS; SARAVANAKUMAR, 2017).

Um tipo de nanopartícula inorgânica bastante estudado devido às suas propriedades elétricas e óticas são os nanocristais de semicondutores, estas nanopartículas possuem tamanhos que podem variar entre 1 e 100 nm. Quando esses nanocristais semicondutores, também chamados de pontos quânticos ou *quantum dots*, tem seu tamanho diminuído sendo mantidos abaixo de 10 nm, suas propriedades são alteradas devido ao efeito do confinamento quântico, pois a medida que o tamanho dos nanocristais são reduzidos, as excitações eletrônicas mudam para energia mais alta. O estado de forte confinamento quântico no qual estas nanopartículas são encontradas permite que as suas propriedades óticas sejam alteradas apenas com a alteração do tamanho das mesmas. Uma característica ótica que permite o uso destas nanopartículas em

diversas áreas é a forte intensidade de luminescência que elas apresentam (ALIVISATOS, 1996; SILVA et al., 2010).

2.1.1.3 Nanopartículas derivadas de carbono

As nanopartículas derivadas de carbono são nanopartículas que possuem sua estrutura principal constituída de átomos de carbono. Suas características únicas estimularam pesquisas em diversas áreas, dentre as nanopartículas derivadas de carbono mais estudadas estão os fullerenos, grafeno, nanotubos, nanofibras e nanofolhas de carbono. Um tipo de nanopartícula derivada de carbono mais recente foi descoberta em 2004 e possui tamanho abaixo de 10 nm (SHI et al., 2019a). Estas nanopartículas são chamadas de nanopartículas de carbono (*carbon nanoparticles* – CNPs), também conhecidos como pontos quânticos de carbono (*carbon dots* – CDs) e têm atraído bastante atenção devido as suas propriedades óticas e eletrônicas (EALIAS; SARAVANAKUMAR, 2017; ASADIAN; GHALKHANI; SHAHROKHIAN, 2019).

Entre as propriedades dos pontos quânticos de carbono pode-se destacar a fluorescência forte e ajustável concomitantemente com a não toxicidade e biocompatibilidade destas nanopartículas, fazendo com que estas sejam bastante aplicadas em bioimagem, biosensores, na administração de medicamentos e terapia fototermal (TUERHONG; YANG; XUE-BO, 2017).

2.1.2 Síntese das nanopartículas

O processo de síntese das nanopartículas possui um papel importante nas suas propriedades, pois, como visto anteriormente, as características únicas das nanopartículas estão fortemente atreladas ao seu tamanho e formato. Desta forma, o processo de síntese empregado na fabricação das nanopartículas é determinante para obtenção das nanopartículas com propriedades bem definidas (MIYAZAKI; RIUL JR, 2017).

Os processos de obtenção de nanopartículas são divididos em duas classes, *top-down* e *bottom-up*. No processo *top-down*, as nanopartículas são obtidas por métodos destrutivos, no qual moléculas maiores são decompostas em unidades menores através de desgaste físico e posteriormente convertidas

em nanopartículas, tendo como destaques neste tipo de processo técnicas como ablação a laser e litografia. Em contra partida, no processo *bottom-up* as nanopartículas são obtidas a partir de unidades menores (precursores atômicos) que se agregam para a formação das nanoestruturas, neste tipo de processo são bastante empregadas técnicas de síntese via sol-gel, pirólise e hidrotermal (KHAN; SAEED; KHAN, 2017; MIYAZAKI; RIUL JR, 2017).

2.1.3 Aplicação das nanopartículas

2.1.3.1 Nanopartículas em nanomedicina

A nanomedicina engloba diversas áreas como, biologia, medicina, química, física e outras disciplinas e se baseia no desenvolvimento de nanomateriais com aplicações biomédicas. Na área de química são desenvolvidos dispositivos analíticos que permitem uma detecção rápida, específica e sensível de diversos compostos, esses dispositivos são de grande importância na área de medicina, podendo ser aplicados no diagnóstico e tratamento de inúmeras doenças, havendo um crescimento na pesquisa em busca de novas matérias bioativas para serem empregados como biossensores (MAZUR et al., 2017).

As nanopartículas possuem um diferencial relacionado ao seu tamanho, o que permite que elas tenham uma interação biológica mais efetiva do que partículas maiores. As propriedades relacionadas ao tamanho destas partículas que conferem esse diferencial é a maior proporção de superfície em relação ao seu volume total. Sendo assim, as propriedades inerentes as nanopartículas, como propriedades térmicas, elétricas, magnéticas e óticas, são exploradas na criação de nanoestruturas aplicadas no diagnóstico e tratamento de diversas patologias (PARIS; VALLET-REGÍ, 2018).

Dentre os biossensores de nanomateriais aplicados em nanomedicina podem ser citadas as estruturas lipídicas na forma de lipossomas. E esses nanomateriais possuem estruturas similares às das membranas celulares, sendo assim frequentemente empregados no estudos da interação entre membranas e proteínas e em pesquisa envolvendo a descoberta de novas drogas (MAZUR et al., 2017).

Outra aplicação bastante investigada das nanopartículas lipídicas, além da sua aplicação como biossensores, é a de carregadores de fármaco, com o intuito de aumentar benefícios terapêuticos. Seu emprego no transporte de fármacos é amplamente explorado pois estas partículas são biocompatíveis e biodegradáveis. Os carregadores de fármaco são, em geral, construídos para serem biomiméticos de membranas celulares capazes de aprisionar a droga dentro de seu núcleo aquoso. Assim, protegida pela membrana lipídica a droga seria carregada para o interior de células e tecidos doentes, protegendo células e tecidos saudáveis de possíveis efeitos colaterais tóxicos que a droga pode ocasionar (KRAFT et al., 2014).

Ainda na gama de nanopartículas orgânicas aplicadas em nanomedicina, pode-se citar a atuação de micelas poliméricas como agentes teranósticos, que servem, ao mesmo tempo, para a terapia e diagnóstico. Agentes de contrastes têm sido incorporados a micelas poliméricas para melhorar a qualidade de imagem e emitir sinal de sistemas biológicos, tornando esses sistemas visíveis para detecção. As micelas se mostraram agentes de entrega específica em tumores para imagens moleculares com boa seletividade e sensibilidade. Além de incorporar os agentes de contrastes dentro do núcleo ou conjugá-los em sua superfície para geração de imagens, as micelas também são capazes de carregar drogas anticâncer e anticorpos dentro do seu núcleo para a terapia (ZHANG; MI, 2019).

Outro tipo de nanopartícula com alto potencial como transportador de fármaco são os dendrímeros. Eles possuem uma estrutura ramificada regular com forma esférica e a natureza dos grupos presentes em sua superfície, hidrofóbicos ou hidrofílicos, confere a eles o poder de encapsular ligantes no seu interior ou agregá-los em sua superfície evitando a sua degradação. Os dendrímeros podem proporcionar uma maior biodisponibilidade das drogas complexadas a eles através do aumento da solubilidade em água e alteração da carga superficial (PEDZIWIATR-WERBICKA et al., 2019).

Uma variedade de nanopartículas inorgânicas também pode ser utilizada para aplicações em nanomedicina. Assim como as nanopartículas em geral, as nanopartículas inorgânicas possuem propriedades únicas, como propriedades ópticas, magnéticas, mecânicas e elétricas, dependentes de tamanho e forma,

sendo nanopartículas com ação antibacterianas e antivirais. Apesar das inúmeras vantagens ainda é um desafio obter nanopartículas inorgânicas uniformes e biocompatíveis com as propriedades funcionais requeridas. Porém, nos últimos anos a síntese de diferentes nanopartículas inorgânicas metálicas e cerâmicas tais como ouro, prata, selênio, cobre, ferro, óxido de zinco e hidroxiapatita tem sido investigadas (STEVANOVI et al., 2019).

Nos últimos anos têm crescido o número de nanomateriais a base de carbono, nas últimas três décadas foram descobertos o fulereno, os nanotubos de carbono, nanocrifres de carbono, nanocebolas de carbono, derivados de grafeno, nanodiamantes e *carbon dots* ou pontos de carbono. Devido a sua composição de carbono junto com suas propriedades térmicas, químicas e mecânicas, os nanomateriais de carbono têm sido bastante empregados em aplicações biomédicas. Devido a sua dimensão e a possibilidade de funcionalização destas nanopartículas, os nanomateriais são fortes candidatos para o transporte intracelular de fármacos *in vivo* (D'AMORA; GIORDANI, 2018).

2.1.3.2 Nanopartículas como sensores em química analítica

Sensores são dispositivos que traduzem informações na forma de variações de energia, como por exemplo, térmica, mecânica, ótica, elétrica, magnética ou bioquímica, em outra forma de energia com o intuito de monitorar e receber informações sobre o ambiente a nossa volta (DAHMAN et al., 2017). Por exemplo, a concentração de um determinado composto pode ser avaliada a partir da variação ótica de um determinado sensor fluorescente (LIMA et al., 2009).

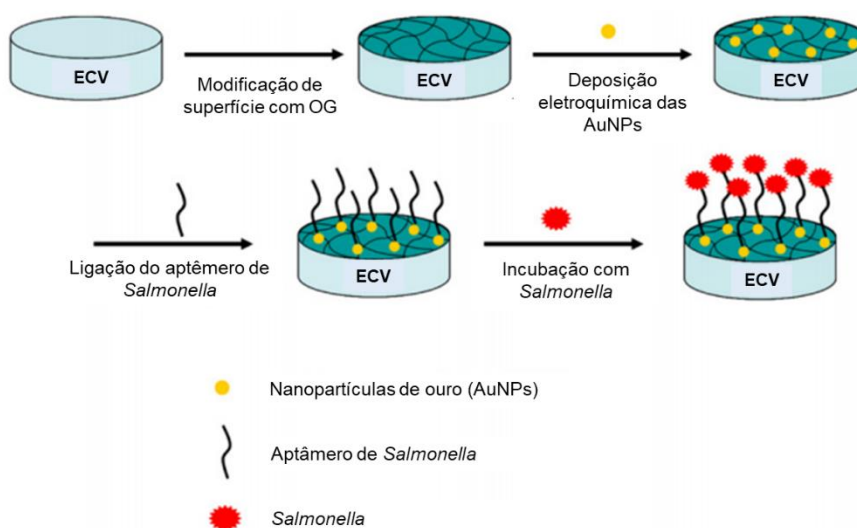
Os estudos na área de nanotecnologia vêm crescendo nos últimos anos e assim têm crescido também o campo dessa tecnologia relacionada a nanosensores. Nanosensor é definido como um sensor físico, químico ou biológico construído em escala nanométrica, utilizados para a transmissão de sinais que traduzem o comportamento da nanopartícula para o mundo macroscópico. Um nanosensor deve atender pelo menos umas das três características: possuir sensibilidade em nanoescala (exemplo, medida de potência em nanowatts); o confinamento espacial da interação do sensor com o

de emissão alterado do laranja para o verde na presença de Fe^{3+} (CHEN et al., 2019b).

Outro tipo de nanosensor bastante utilizado são os nanobiossensores. Estes sensores são dispositivos que combinam a seletividade de um elemento de reconhecimento biológico (bioreceptor), que podem ser enzimas, anticorpos, DNA, entre outros, com algum tipo de transdutor físico, que podem ser eletroquímicos, óticos, térmicos, entre outros. Estes transdutores são utilizados para converter o sinal obtido da interação do bioreceptor com o material a ser analisado (analito) de forma que esse sinal seja proporcional a concentração deste material (DRIDI et al., 2017).

Um nanobiossensor foi empregado na detecção de *Salmonella* spp em amostras de suínos (Figura 3). Um eletrodo de carbono vítreo (ECV) foi modificado com óxido de grafeno (OG) e nanopartículas de ouro (AuNPs) devido a sua biocompatibilidade e sua propriedade de transferência de elétron. Na superfície do eletrodo modificado foi ligado o aptâmero (bioreceptor) específico para a *Salmonella*. As medidas foram realizadas através da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica.

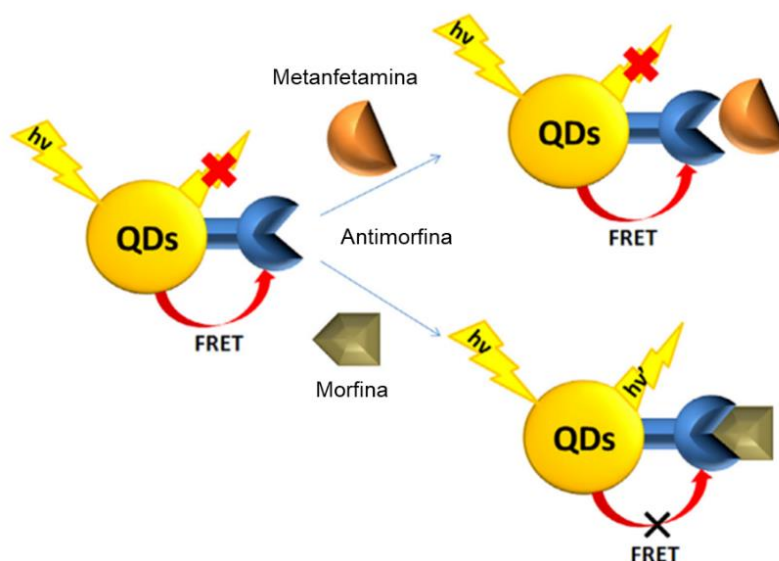
Figura 3 - Esquema representativo da determinação de *Salmonella* spp. através do bionanosensor eletroquímico baseado no aptâmero específico de *Salmonella*.



Fonte: Adaptado de Ma (MA et al., 2014).

Um nanosensor baseado em *quantum dots* CdS (QD-CdS) funcionalizados com o anticorpo antimorfina foi utilizado na determinação de morfina através do aumento da fluorescência quando os QD-CdS são colocados na presença do analito. Como pode ser observado na Figura 4, o aumento da fluorescência ocorre devido a interação da morfina com a antimorfina presente na superfície dos QD-CdS, pois inicialmente a fluorescência dos QD-CdS está sendo suprimida por um processo de transferência de energia de ressonância de Forster (FRET) que acontece entre os QD-CdS e a antimorfina, sendo esse processo bloqueado quando ocorre a interação da antimorfina com a morfina o que permite que os QD-CdS tenham sua fluorescência aumentada. Apesar dos resultados promissores o grupo não aplicou o bionanosensor em amostras reais (MASTERI-FARAHANI; KHADEMABBASI; MOLLATAYEFEH, 2018).

Figura 4 - Esquema representativo da determinação de morfina através do bionanosensor sintetizado QD-CdS funcionalizado com antimorfina.



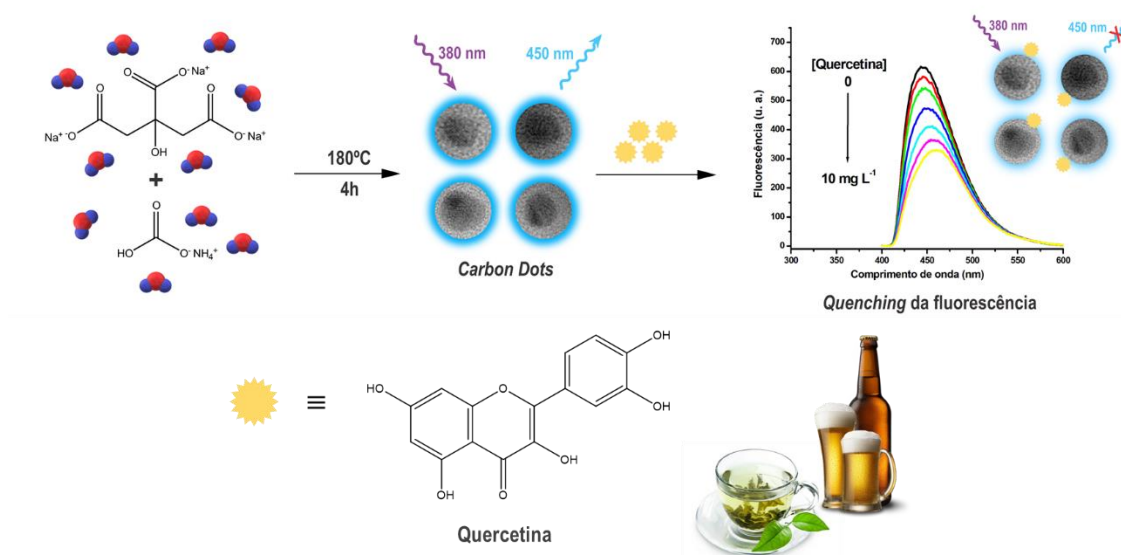
Fonte: Adaptado de Masteri-Farahani (MASTERI-FARAHANI; KHADEMABBASI; MOLLATAYEFEH, 2018)

Como pôde ser observado a aplicação de nanopartículas é ampla podendo ser aplicada nos mais diversos setores, como por exemplo alimentício, saúde, catálise, meio ambiente, entre outros. Sua vasta possibilidade de aplicação se deve as suas características únicas, sendo destacada sua elevada

área superficial em relação ao volume total, o que torna as nanopartículas mais reativas, conseqüentemente, mais sensível. Sendo assim, os benefícios das nanopartículas têm atraído interesse de pesquisadores, levando a um grande avanço na aplicação destes materiais como sensores.

3 USO DE CARBON DOTS SINTETIZADOS A PARTIR DE CITRATO COMO SENSOR FLUORESCENTE PARA A DETERMINAÇÃO DE QUERCETINA EM AMOSTRAS DE CHÁS E CERVEJAS

Figura 5 - Esquema ilustrativo da síntese dos CDs e sua aplicação na determinação de quercetina explorando o *quenching* da fluorescência.



Fonte: Adaptado de De Paula (DE PAULA et al., 2019).

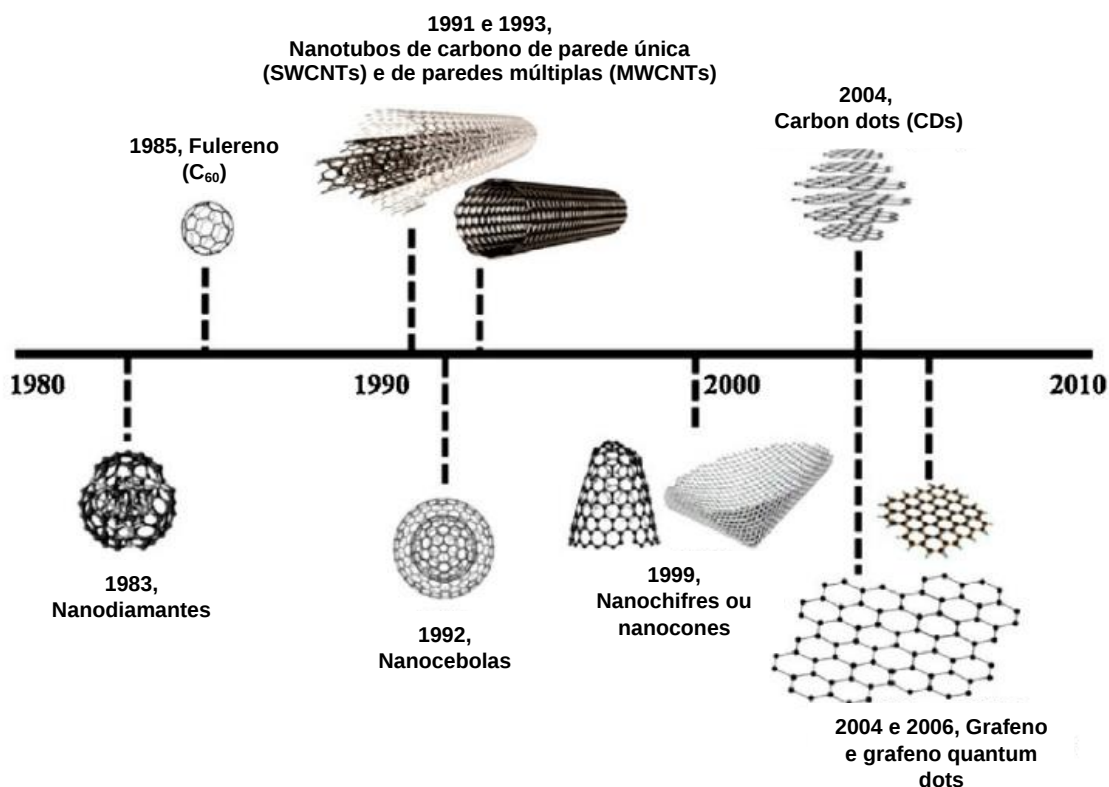
DE PAULA, N. T. G. et al. Use of carbon dots synthesized from citrate as a fluorescent probe for quercetin determination in tea and beer samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 11, p. 2355–2366, 2019.

3.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1.1 Carbon dot

O carbono está entre os elementos mais abundantes na natureza e está presente em uma variedade de materiais com propriedades únicas, como por exemplo, os nanomateriais (SHAH; LIN, 2017). As propriedades únicas dos nanomateriais de carbono como nanodiamantes, fulerenos, nanocebolas, nanotubos de carbono de parede única (do inglês, *single-walled carbon nanotubes*, SWCNT) e de paredes múltiplas (do inglês, *multiwalled carbon nanotubes*, MWCNT), folhas de grafeno e nanopartículas fluorescentes de carbono ou *carbon dots* (CDs) (Figura 6) têm recebido bastante atenção, sendo bastante estudados devido às inúmeras aplicações. Dentre as características apresentadas pelos CDs, suas propriedades ópticas e sua fluorescência tem atraído atenção crescente nos últimos anos (LIM; SHEN; GAO, 2015).

Figura 6 - Estruturas de nanomateriais de carbono por ordem de descoberta.



Fonte: Adaptado de Namdari (NAMDARI; NEGAHDARI; EATEMADI, 2017).

Os CDs são um novo material fluorescente de carbono com diâmetro abaixo de 10 nm. Os CDs estão se tornando uma alternativa aos *quantum dots* (QDs), pois estes últimos são sintetizados a partir de metais e os CDs a partir de uma fonte de carbono, sendo biocompatível e contribuindo para uma química mais verde (TUERHONG; YANG; XUE-BO, 2017).

Os *carbon dots* são nanopartículas esféricas com estrutura que varia de amorfa a nanocristalina com carbonos sp^2 e sp^3 , grupos contendo oxigênio e/ou nitrogênio e grupos químicos pós-modificados (LIM; SHEN; GAO, 2014; ZHU et al., 2015). As propriedades fluorescentes, o tamanho dos CDs e os grupos químicos presentes na superfície dos CDs, são estabelecidos a partir do controle dos parâmetros na sua síntese tais como, fonte de carbono e modificador de superfície (BAKER; BAKER, 2010). A emissão dos CDs pode também ser ajustada através do controle da reação de condensação, da síntese, como também através da dopagem com outros elementos (SUN; LEI, 2017).

Os CDs foram descobertos acidentalmente em 2004, após a separação e purificação de nanotubos de carbono (XU et al., 2004). Os CDs foram separados em três bandas eletroforéticas, após excitação em 366 nm, as três frações emitiam colorações verde-azul, amarelo e laranja por ordem crescente de tamanho (BAKER; BAKER, 2010). Desde então, devido a facilidade de síntese e as propriedades apresentadas, os CDs têm sido bastante investigados tendo um crescimento no número de publicações com sínteses de CDs partindo de diferentes tipos de precursores e métodos de síntese classificados como abordagens *top-down* e *bottom-up* (SUN; LEI, 2017).

A abordagem *top-down* envolve a quebra de estruturas maiores de carbono, como nanodiamantes, grafite, nanotubos de carbono, fuligem de carbono, carvão ativado e óxido de grafite através de métodos como descarga de arco, ablação a laser e oxidação eletroquímica (LIM; SHEN; GAO, 2015). Após a descoberta dos CDs por Xu e colaboradores (2004), Sun e colaboradores (2006) foram pioneiros no uso da ablação a laser para a síntese de CDs de carbono utilizando grafite como fonte de carbono na presença de vapor de água e utilizando argônio como gás transportador. Foram produzidas nanopartículas de carbono com vários tamanhos, as quais não apresentaram luminescência, então a amostra foi tratada com ácido nítrico e teve sua superfície passivada

com moléculas orgânicas simples apresentando assim emissão de luminescência. O método eletroquímico de preparo de nanocristais luminescentes de carbono foi explorado, primeiramente, por Zhou e colaboradores (2007). A síntese foi baseada no crescimento de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) em um papel de carbono que foi, posteriormente, cortado e inserido em uma célula eletroquímica contendo acetonitrila desgaseificada e perclorato de tetrabutylamônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito de suporte.

Em contrapartida, a abordagem *bottom-up* é baseada na síntese dos CDs a partir de precursores moleculares, como por exemplo, citrato (GUO et al., 2013), carboidratos (PENG; TRAVAS-SEJDIC, 2009) e nanocompósitos de polímero e sílica (LIU et al., 2009). A síntese dos CDs a partir de precursores moleculares pode ocorrer através de radiação micro-ondas, combustão, pirólise em ácido concentrado, carbonização, método hidrotermal, entre outros (ZHU et al., 2015b).

Guo e colaboradores (2013) descreveram um método hidrotermal de etapa única para a síntese de CDs a partir de citrato de sódio. Também é possível empregar carboidratos como precursores para a síntese de CDs. Peng e Travas-Sejdic (2009), inicialmente, desidrataram os carboidratos usando ácido sulfúrico, em seguida, trataram com ácido nítrico. Por fim, as nanopartículas de carbono contendo oxigênio foram passivadas utilizando compostos contendo amina. Liu e colaboradores (2009) relataram um método de síntese de CDs baseado no uso de esferas de sílica funcionalizadas como transportadores e resóis (resinas de fenol e formaldeído) como precursores de carbono.

Devido as suas propriedades, existem diversas aplicações para CDs, como por exemplo o fato de serem biocompatíveis e possuírem baixa toxicidade faz com que eles tenham grande potencial para aplicação em bioimagem fluorescente (YANG et al., 2017) e bioimagem multimodal de células e tecidos (SHI et al., 2015). Sun e colaboradores (2006) foram os pioneiros em reportar o uso de CDs em bioimagem *in vitro* e os primeiros a relatarem o uso em bioimagem *in vivo* foram Yang e colaboradores (2009).

Nos experimentos de Yang e colaboradores (2009), foi injetado CDs em solução aquosa, por via intraperitoneal em camundongos. Imagens de

fluorescência em diferentes comprimentos de onda de emissão foram obtidas, demonstrando que os CDs são fluorescentes em outros meios, além do meio aquoso. CDs derivados de microalgas apresentaram baixa citotoxicidade para testes realizados *in vitro* e mostrou um grande potencial para uso em bioimagem de alto contraste (GUO; ZHANG; LI, 2017).

Os CDs também são utilizados como transportadores de biossensores devido a sua solubilidade em água, possibilidade de modificação de superfície, não toxicidade, emissão em diversos comprimentos de onda (de acordo com o comprimento de onda de excitação), biocompatibilidade, permeabilidade celular e alta fotoestabilidade. Os biossensores de CDs foram utilizados na determinação de diferentes espécies e parâmetros, tais como: glicose (SHI et al., 2011), microRNAs (LIU et al., 2017), ferro, pH (WANG; WANG; SUN, 2017), dopamina (ZHU et al., 2016) ácido ascórbico (FONG; CHIN; NG, 2016), pH e vitamina B12 (YU et al., 2019c) e colesterol (BARUA; GOGOI; KHAN, 2018).

A utilização de CDs como um sistema de transporte de drogas também vem sendo estudada, com uma perspectiva de combinar terapia e diagnóstico com bioimagem para a distribuição visual drogas, ao passo que seu efeito é avaliado (CHENG et al., 2012). Um agente multifuncional terapia-diagnóstico foi preparado com nanogéis de ácido hialurônico funcionalizados com ácido fólico e polietilenoglicol e reticulados com CDs. O material foi projetado para o diagnóstico tumoral e quimioterapia, mostrando boa biocompatibilidade, fluorescência e liberação controlada no microambiente tumoral (JIA et al., 2016).

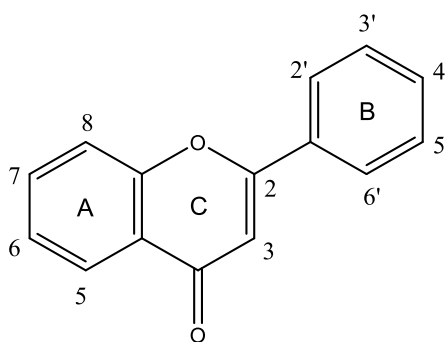
Células solares sensibilizadas por corantes (DSC) despertam interesse devido à sua diversidade, baixo custo e fácil processamento. Apesar dos benefícios as DSC possuem algumas desvantagens como por exemplo, o fotobranqueamento do corante, a toxicidade de corantes contendo rutênio e o tipo de eletrólito volátil utilizado que pode dificultar a sua aplicação (WANG; HU, 2014). Mirtchev e colaboradores (2012) propuseram uma síntese de CDs que resultou em coloides estáveis, os quais foram utilizados como sensibilizadores em células solares à base de TiO_2 nanocristalino. Também foram desenvolvidos novos materiais constituídos por *nanorods* de ZnO sensibilizados com CDs derivado de três diferentes tipos de biomassa sendo utilizado para a construção de células solares nanoestruturadas de estado sólido (BRISCOE et al., 2015).

Devido a estabilidade de emissão, baixo custo e por não prejudicar o meio ambiente, os CDs são um material emergente para a fabricação de diodos emissores de luz (LED, do inglês *light emitting diode*). Os CDs contendo nitrogênio apresentam ampla e forte emissão de luz visível quando excitados na região do ultravioleta, sendo promissores em aplicações como fluoróforos (WANG; HU, 2014). Sarswat e Free (2015) sintetizaram CDs a partir de resíduos de alimentos e bebidas para posterior fabricação de diodos emissores de luz. Eles também utilizaram, para a síntese dos CDs, fumos de carbono coletados da queima de amostras de carvão, madeira, papel e combustível. Análise de infravermelho sugeriu a presença de nitrogênios o que aumentou a possibilidade da formação de CDs dopados com nitrogênio.

3.1.2 Flavonoides

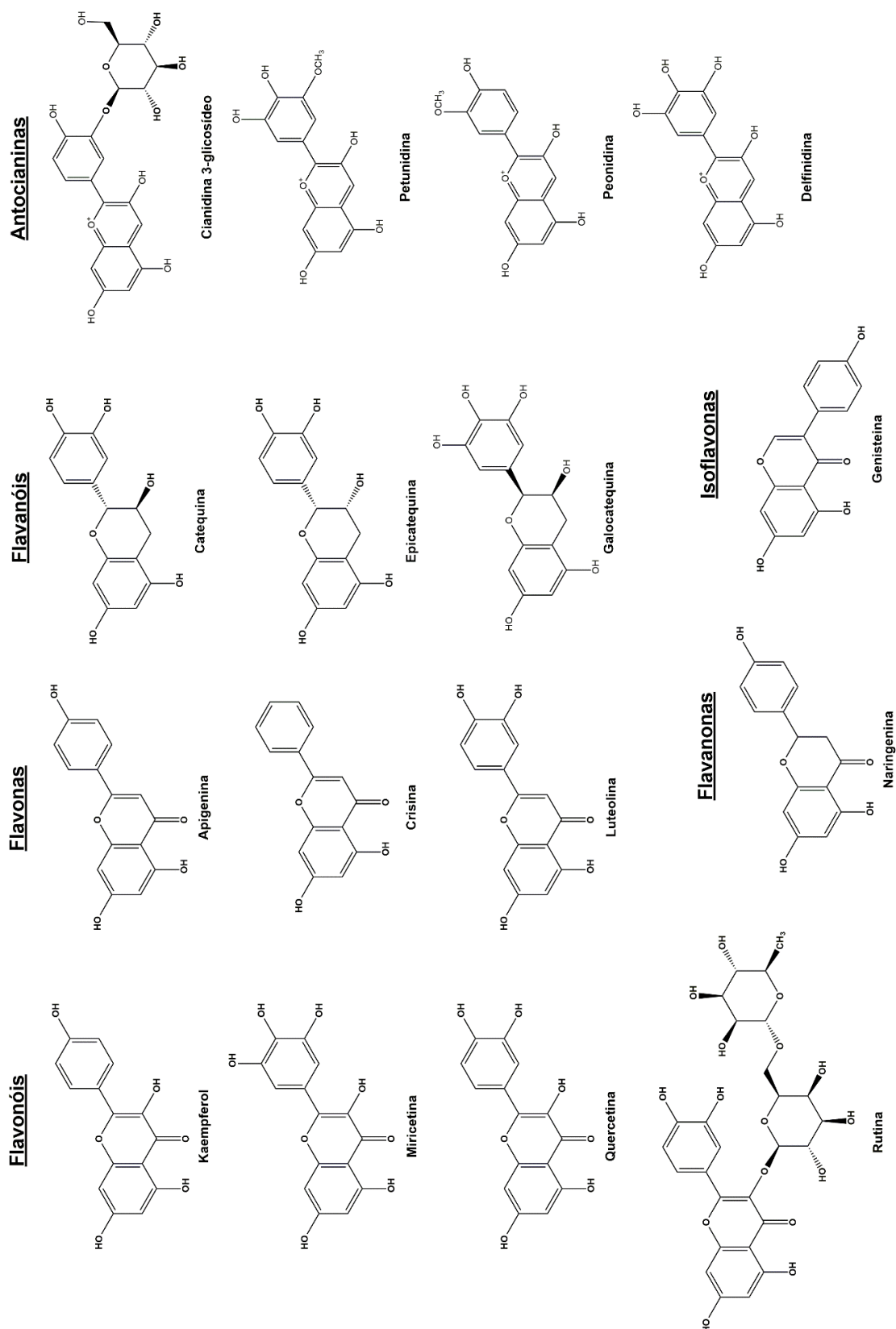
Flavonoides são compostos naturais do grupo dos polifenóis e são abundantes na dieta humana. São metabólitos secundários, pois não participam diretamente do crescimento e desenvolvimento do vegetal (SELEEM; PARDI; MURATA, 2017). Os flavonoides são compostos por dois anéis benzênicos (A e B) ligados por um anel pirano (C), como ilustrado na Figura 7. Sua atuação antioxidante se deve ao fato do grupo catecol no anel-B (di-idroxilado) doar hidrogênio radicalar para estabilizar espécies radicais. Outra forma de atuação antioxidante importante é a instauração no anel C e a presença de grupos funcionais capazes de se ligar a metais de transição (ARAÚJO, 2011).

Figura 7 - Representação esquemática básica dos flavonoides.



Fonte: A autora (2019).

Considerando as estruturas químicas, os flavonoides são subdivididos em: flavonóis (kaempferol, rutina, miricetina e quercetina), flavonas (apigenina, crisina e luteolina), flavanóis (catequina, epicatequina e galocatequina), isoflavonas (genisteína), flavanonas (naringenina) e antocianinas (malvidina, petunidina, peonidina, cianidina e delphinidina), conforme ilustrado na Figura 8 (ELEAZU et al., 2017).

Figura 8 - Estruturas químicas dos diferentes flavonoides.

Fonte: Adaptado de Eleazu (ELEAZU et al., 2017).

Os flavonóis, são flavonoides de estrutura planar, presentes em cebola, maçã, brócolis, chá, vinho e cervejas (JANDERA et al., 2005; ARAÚJO, 2011). Um dos flavonóis mais abundantes na dieta humana é a quercetina (3,5,7,3'-4'-pentahidroxi-flavona) e seu consumo diário pode variar entre 50 e 500 mg (DESCHNER et al., 1991). A quercetina representa cerca de 95% dos flavonoides ingeridos na dieta humana (BEHLING et al., 2004).

A quercetina é encontrada em alimentos e bebidas numa concentração média de 200-210 mg kg⁻¹ em maçãs; 31,2 mg kg⁻¹ em brócolis; 0,1 mg kg⁻¹ em repolho; 19,5 mg kg⁻¹ em alface; 133 mg kg⁻¹ em cebola; 284-486 mg kg⁻¹ em tomate; 4-16 mg L⁻¹ em vinho tinto; 1,0 mg L⁻¹ em vinho branco; 10-25 mg L⁻¹ em chá preto; e 10 mg L⁻¹ em cerveja (BEHLING et al., 2004; SIQUEIRA; BOLINI; MACEDO, 2008; ARAÚJO, 2011).

Dentre as propriedades dos flavonoides se destaca sua propriedade antioxidante. Sua ação antioxidante é devido à suas propriedades de reagir com radicais livres e sua propriedade quelante, impede que os radicais livres reajam com os tecidos e impede também a peroxidação lipídica (BEHLING et al., 2004).

Existem três estágios que ocorrem durante a peroxidação lipídica; no estágio chamado de iniciação, os radicais livres removem um hidrogênio de um ácido graxo poli-insaturado da membrana celular para formar um radical lipídico; no estágio de propagação, o radical lipídico formado e o oxigênio molecular formam radicais peróxido lipídicos que se quebram em mais radicais; e no estágio de término, estes radicais reagem entre si ou com antioxidantes para eliminação destes radicais (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A atuação dos flavonoides como antioxidantes ocorre no bloqueio da iniciação, reagindo com os radicais lipídicos, podendo atuar também no estágio de propagação reagindo com os radicais peróxidos e os produtos destas reações podem reagir com os outros radicais formados durante a propagação acelerando o término do processo (NIJVELDT et al., 2001).

Outra forma importante de lesão oxidativa dos tecidos acontece através da produção de radicais superóxido via xantina oxidase. Os radicais superóxidos são essenciais para a defesa de organismos vivos, porém sua superprodução pode causar estresse oxidativo. Tanto a xantina desidrogenase como a xantina oxidase estão envolvidas no metabolismo da xantina em ácido úrico, tendo como

consequência a produção de radicais livres de oxigênio. A quercetina atua na inibição da atividade da xantina oxidase, resultando assim em diminuição da lesão oxidativa (NIJVELDT et al., 2001; ALVES et al., 2010).

3.1.3 Métodos para a determinação de quercetina

Na literatura, existem diversos métodos para a determinação de quercetina em alimentos e bebidas, dentre eles são citados, como exemplo, eletroforese capilar (PRASONGSIDH; SKURRAY, 1998; MEMON et al., 2017), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção UV (RODRÍGUES-DELGADO et al., 2002), extração em fase sólida (MOLINELLI; WEISS; MIZAIKOFF, 2002) método espectrofotométrico (PEJIC et al., 2004), voltamétrico (ZIYATDINOVA; KOZLOVA; BUDNIKOV, 2018), entre outros.

Um método para a determinação de quercetina empregando eletroforese capilar (CE) foi proposto por Prasongsidh e Skurray (1998). Neste procedimento, as amostras de vinho eram inicialmente filtradas e diluídas para então serem injetadas no sistema CE sob uma pressão de 50 mbar. Foi obtido um coeficiente de correlação linear de 0,9999 em uma faixa de trabalho de 8 a 1000 mg L⁻¹. Entre corridas de amostras era necessário realizar a lavagem e o condicionamento do capilar, o que tornava o método dispendioso.

Dentre os métodos citados acima, Rodríguez-Delgado e colaboradores (2002) determinou o teor de 15 polifenóis em amostras de vinhos tintos de diferentes marcas provenientes das Ilhas Canárias (Espanha) empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção espectrofotométrica e fluorimétrica. Neste trabalho as amostras de vinhos eram tratadas com HCl para ajustar o pH para 2, em seguida, a amostra era submetida a duas etapas de extração por 20 min, a fase orgânica era coletada e seca em fluxo de gás nitrogênio. A amostra seca era dissolvida em uma mistura metanol/água 1:1 (v/v) e filtradas, em seguida alíquotas foram injetadas no cromatógrafo. Foram encontrados valores de quercetina nas amostras entre 1,9 e 49,8 mg L⁻¹.

Um método utilizando extração em fase sólida baseada em polímeros com impressão molecular foi proposto por Molinelli e colaboradores (2002). Estes

polímeros foram utilizados para a extração seletiva e pré-concentração de quercetina em amostras de vinho tinto. As frações recolhidas da amostra eram posteriormente analisadas por CLAE. Os polímeros com impressão molecular atingiram uma capacidade de absorção de 0,4 g de quercetina por grama de polímero e uma taxa de recuperação de 98,2%.

A determinação de quercetina usando um método espectrofluorimétrico foi proposta por Pejic e colaboradores (2004). Este trabalho baseou-se em um procedimento espectrofotométrico direto que envolvia preparo de amostra para a determinação de quercetina na presença de ácido ascórbico em formulações farmacêuticas. As variações nas absorbâncias foram linearmente proporcionais as concentrações de quercetina na faixa de trabalho entre 1,0 e 12,0 mg L⁻¹ e apresentou um coeficiente de correlação linear de 0,9991 e limite de detecção de 0,76 mg L⁻¹.

Um método empregando espectroscopia de infravermelho em conjunto com quimiometria foi utilizado na determinação de compostos fenólicos em sessenta genótipos de feijão. Foram utilizados os dados espectrais NIR e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinar compostos fenólicos dos feijões (catequina, ácido clorogênico, ácido cáldico, ácido p-cumárico, ácido t-ferúlico, vitexina, isovitexina, miricetina, quercetina e kaempferol). Foi possível medir com precisão os compostos fenólicos ($R^2 > 0,987$) e com um erro inferior a 1,82% (MEENU et al., 2016).

Um outro método empregando eletroforese capilar foi utilizado na determinação simultânea de quatro flavonoides (quercetina, rutina, naringina e naringenina) em diferentes frutas (maçã, laranja, uva e ameixa indiana), utilizando um detector de fotodiodos. Neste método, os flavonoides foram determinados em solução tampão borato 10 mmol L⁻¹ de pH 8,5 em 10 min e uma voltagem aplicada de 25 kV. A faixa linear para a análise de quercetina foi de 3,12 a 200 mg L⁻¹. Com um limite de detecção de 0,582 mg L⁻¹ e um limite de quantificação de 1,941 mg L⁻¹ de quercetina (MEMON et al., 2017).

Ziyatdinova e colaboradores (2018) propuseram um método voltamétrico baseado na criação de novos eletrodos que fossem sensíveis e seletivos para determinação de quercetina em ervas medicinais, através da utilização de um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes

múltiplas e ácido gálico eletropolimerizado. A extração dos compostos das amostras de ervas medicinais foi realizada através dos processos de imersão e decocção. Para a imersão a extração durou 15 min e para a decocção 30 min. O trabalho apresentou faixa de trabalho de 0,0002 a 7,55 mg L⁻¹ de quercetina, com um RSD de 3,5% e um limite de detecção de 0,0001 mg L⁻¹.

Os métodos mencionados apresentaram boa precisão e sensibilidade, entretanto apresentam algumas desvantagens, tais como, operação complexa dos equipamentos, análise laboriosa e dispendiosa, alto consumo de reagente, alto custo de equipamentos, resultados complexos, necessidade de desenvolver modelos de calibração, etapas de extração e pré-concentração (que diminuía o número de análises por hora). Quando comparados com outros métodos analíticos, os métodos que envolvem fluorescência são rápidos, simples e possuem alta sensibilidade (LIU et al., 2015). O uso de CDs nos métodos envolvendo fluorescência são particularmente vantajosos devido a fácil obtenção, a alta estabilidade e baixa toxicidade (ZHU et al., 2015).

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Geral

Desenvolver um procedimento analítico para a determinação de quercetina baseado na supressão da fluorescência de *carbon dots* com detecção espectrofluorimétrica.

3.2.2 Específicos

- Sintetizar e caracterizar os *carbon dots*;
- Estabelecer o comprimento de onda de excitação dos *carbon dots* sintetizados;
- Realizar estudo do pH para a interação entre o *carbon dots* e a quercetina;
- Avaliar o tempo de interação entre o *carbon dots* e a quercetina;
- Realizar estudo do volume de *carbon dots* a ser empregado na determinação de quercetina;
- Realizar estudo da composição química e concentração da solução tampão;
- Realizar estudo de mecanismo da supressão envolvido na interação entre o *carbon dots* e a quercetina;
- Avaliar o efeito de interferentes;
- Validar o método: intervalo linear de concentração, coeficiente de determinação, desvio padrão relativo, Limite de detecção e quantificação;
- Analisar amostras reais de chás e cervejas;
- Realizar teste de adição e recuperação.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Reagentes e solventes

Para o preparo das soluções foram utilizados os reagentes e solventes apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Reagentes, solventes e suas especificações.

Reagentes e solventes	Marca	Massa molar (g mol ⁻¹)	Teor %
Quercetina (C ₁₅ H ₁₀ O ₇)	Sigma-Aldrich	302,24	95
Catequina (C ₁₅ H ₁₄ O ₆)	Sigma-Aldrich	290,27	99
Epicatequina (C ₁₅ H ₁₄ O ₆)	Sigma-Aldrich	290,27	95
Kaempferol (C ₁₅ H ₁₀ O ₆)	Sigma-Aldrich	286,24	90
Miricetina (C ₁₅ H ₁₀ O ₈)	Sigma-Aldrich	318,24	96
Resveratrol (C ₁₄ H ₁₂ O ₃)	Sigma-Aldrich	228,24	99
Metanol (CH ₃ OH)	J. T. Baker	32,04	99,9
Hidróxido de sódio (NaOH)	Dinâmica	40	97
Cloreto de sódio (NaCl)	Vetec	58,44	99
Ácido clorídrico (HCl)	Dinâmica	36,50	37
Cloreto de potássio (KCl)	Dinâmica	74,56	99,5
Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇)	Nuclear	192,12	99,5
Ácido ascórbico (C ₆ H ₈ O ₆)	Vetec	176,12	99
Ácido gálico (C ₇ H ₆ O ₅)	Sigma-Aldrich	170,12	98
Ácido málico (C ₄ H ₆ O ₅)	Sigma-Aldrich	134,09	99
Glicina (C ₂ H ₅ NO ₂)	Sigma-Aldrich	75,07	98,5
Tetraborato de sódio (Na ₂ B ₄ O ₇)	Química Moderna	381,37	99
Carbonato de sódio (Na ₂ CO ₃)	Vetec	105,99	99,5
Hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO ₃)	Vetec	84	99,5
Dihidrogenofosfato de sódio (NaH ₂ PO ₄)	Vetec	119,98	99
Hidrogenofosfato de sódio (Na ₂ HPO ₄)	Quimex	141,96	99
Hidrogenofosfato de potássio (K ₂ HPO ₄)	Dinâmica	174,2	98

Fonte: A autora (2019).

3.3.2 Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada, com reagentes de alto grau analítico e vidrarias devidamente calibradas.

3.3.2.1 Soluções estoque

Foram preparadas em metanol grau HPLC, soluções estoque individuais com concentração de 100 mg L^{-1} de quercetina, kaempferol, miricetina, catequina, epicatequina e resveratrol. As soluções foram armazenadas em recipiente de vidro âmbar e mantidas sob refrigeração.

As soluções estoque de 100 mg L^{-1} de ácidos ascórbico, gálico, cítrico e málico foram preparadas a partir de seus reagentes sólidos em água deionizada e armazenadas em recipiente de vidro âmbar.

A solução estoque de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de bórax foi preparada a partir do sal tetraborato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$).

A solução estoque de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ glicocol foi preparada a partir da glicina ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) sólida em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ cloreto de sódio (NaCl).

Foram preparadas soluções estoque de KCl , HCl , K_2HPO_4 , ácido cítrico, NaHCO_3 e Na_2CO_3 , na concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a partir de seus respectivos reagentes P. A..

Foram preparadas soluções estoque de NaOH e Na_2HPO_4 , nas concentrações $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, $0,3 \text{ mol L}^{-1}$, $0,4 \text{ mol L}^{-1}$, $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,6 \text{ mol L}^{-1}$, a partir de seus respectivos reagentes P. A..

3.3.2.2 Soluções de trabalho

Soluções de referência de quercetina foram preparadas, diariamente, com concentrações entre 1 e 10 mg L^{-1} a partir de diluições da solução estoque para um volume de 5 mL .

3.3.2.3 Soluções tampão

As soluções tampão foram preparadas a partir das soluções estoque como descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Preparo de soluções tampão.

pH	Volumes das soluções (mL)*	
2	KCl 25,00	HCl 5,30
3	K₂HPO₄ 20,55	Ácido cítrico 79,45
4	K₂HPO₄ 38,55	Ácido cítrico 61,45
5	K₂HPO₄ 51,50	Ácido cítrico 48,50
6	K₂HPO₄ 63,15	Ácido cítrico 36,85
7	K₂HPO₄ 82,35	Ácido cítrico 17,65
8	K₂HPO₄ 97,25	Ácido cítrico 2,75
9	Na₂CO₃ 2,0	NaHCO₃ 23,0
10	HCl 20,0	Na₂CO₃ 50,0
	Na₂HPO₄ 50,0	NaOH 15,0
	Na₂B₄O₇ 50,1	NaOH 49,9
11	HCl 3,0	Na₂CO₃ 50,0
	Glicocol 51,0	NaOH 49,0
	NaHCO₃ 50,0	NaOH 22,7
12	Na₂HPO₄ 25,0	NaOH 37,5

*para um volume total de 100 mL de solução tampão.

Fonte: A autora (2019).

3.3.3 Equipamentos e acessórios

Para a síntese dos CDs foi utilizado um forno com controle de temperatura (modelo MMM Ecocell Confort Line); um espectrofotômetro UV-VIS (Agilent

modelo 8453) para obter os espectros de absorção eletrônica. As imagens dos *carbon dots* foram obtidas através de microscopia de transmissão eletrônica (MET) em um microscópio JEOL (modelo JEM 2100, Japão) operado com voltagem de aceleração de 200 kV. Para medição de pH foi utilizado um pHmetro de bancada Quimis (modelo Q400AS, São Paulo, Brasil). Espectrofotômetro Infravermelho com Transformada de Fourier (Shimadzu, modelo IRTracer-100). As curvas de decaimento de emissão de fluorescência foram obtidas no espectrofluorímetro Horiba - Jobin Yvon Fluorolog-3, operando no modo de contagem de fótons únicos correlacionados ao tempo (TCSPC) e usando um NanoLED-340 pulsado (pulsos a 339 nm) como fonte de excitação. A resposta da função instrumental para o NanoLED-340 foi obtida utilizando de uma solução de água de espalhamento Ludox (sílica coloidal). O software de análise de decaimento por fluorescência, DAS6, foi usado para ajustar as funções do modelo aos dados experimentais. O espectro de FTIR foi obtido usando pastilha de KBr na região de número de onda de 4000 - 400 cm^{-1} . Foi utilizado um espectrofluorímetro Shimadzu (modelo RF-5301PC) para as medidas de fluorescência. A medida do rendimento quântico dos CDs foi realizada em um espectrômetro Quantaurus (modelo QY—C11347-11) equipado com uma esfera de integração (Hamamatsu, Japão). Todos estes equipamentos estão instalados no Laboratório de Medicamentos, Tecnologias, Energias e Soluções Ambientais (LAMTESA) no Departamento de Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE, Recife, Brasil), no Laboratório Associado para a Química Verde (LAQV) da Rede de Química e Tecnologia (REQUIMTE) no Departamento de Química Aplicada da Universidade do Porto (UP, Porto, Portugal), no Laboratório de Terras Raras (BSTR) no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE, Recife, Brasil), no Laboratório de Polímeros Não-Convencionais no Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE, Recife, Brasil) e na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP, São Paulo, Brasil).

3.3.4 Método

3.3.4.1 Síntese dos *Carbon dots* (CDs)

Os CDs foram sintetizados empregando o método hidrotermal em um único passo, adaptado do trabalho de Guo e colaboradores (2013). Foram pesados separadamente 0,2 g de citrato de sódio e 1,5 g de bicarbonato de amônio, em seguida, foram dissolvidos em 10 mL de água deionizada e transferidos para um reator de Teflon®. Posteriormente, o reator foi colocado em uma cápsula de inox e levado a um forno com controle de temperatura por 4 h a 180 °C com uma rampa de aquecimento de 10 °C/min sob alta pressão. Ao término da reação os CDs foram resfriados a temperatura ambiente e a dispersão contendo 25 mg L⁻¹ dos CDs foi armazenada em tubo Falcon® e mantidos sob refrigeração.

3.3.4.2 Espectro de infravermelho

Para obtenção do espectro do infravermelho dos CDs foi realizada uma extração simples. Para isso, foram adicionados em um tubo Falcon® 3 mL da dispersão de CDs obtida na síntese e 3 mL de diclorometano, o conteúdo do tubo foi agitado e posteriormente centrifugado durante 10 min. Após a centrifugação, a fase orgânica, contendo os CDs, é coletada e gotejada diretamente na pastilha de KBr, ocorrendo a evaporação imediata do diclorometano e, assim, obteve-se os espectros de infravermelho dos CDs.

3.3.4.3 Procedimento para a determinação de quercetina

Foram utilizados tubos Falcon® com um volume total de 10 mL. Em cada tubo foram adicionados 0,1 mL da dispersão dos CDs, 1 mL da solução tampão de Ringer (Na₂HPO₄ – NaOH) (pH 11), 3,9 mL de água deionizada (representando a solução do branco) ou diferentes quantidades da solução estoque de quercetina (100 mg L⁻¹) e o volume restante foi completado com água deionizada de forma a se obter um volume final de 5 mL. Em seguida foram realizadas leituras no espectrofluorímetro para verificar o *quenching* da

fluorescência. O comprimento de onda de excitação foi de 380 nm e o espectro de emissão foi obtido numa faixa de 400 a 650 nm com um máximo de emissão em torno de 450 nm e as larguras das fendas de excitação e emissão foram de 1,5 nm. Após as leituras foi construída a curva analítica de F_0/F em função da concentração de quercetina.

3.3.4.4 Determinação de quercetina nas amostras de chás e cervejas

O método proposto foi utilizado para determinar a quantidade de quercetina em 6 chás: verde em sachê (infusão) e pronto para consumo e preto em sachê (infusão) e 6 cervejas: *Weissbier*, *Pilsen* e *Lager*). As amostras foram compradas em supermercados locais. Para os chás de infusão, o conteúdo de 3 sachês do mesmo chá foi pesado para a obtenção do peso médio do conteúdo dos sachês para fixar a quantidade de chá a ser pesado para o preparo das amostras. Então 1,8 g de cada tipo de chá foi adicionado em 100 mL de água quente (90°C), separadamente. Após 5 minutos, o chá foi filtrado e estocado em frasco de vidro âmbar. As amostras de cervejas não passaram por nenhum tratamento prévio e eram utilizadas assim que eram abertas. As amostras de chás e cervejas foram filtradas, diluídas e a concentração de quercetina foi determinada.

3.3.4.5 Estudo do pH ideal para a determinação de quercetina

O estudo da melhor condição de pH para a determinação de quercetina utilizando os CDs sintetizados foi realizado com o auxílio de soluções tampão com pH variando entre 1 e 12. Em 6 tubos Falcon®, foram adicionados volumes fixos da dispersão dos CDs, da solução tampão e volumes variados da água deionizada e da solução padrão de quercetina (100 mg L⁻¹) de forma a obter diferentes concentrações da mesma e manter o volume final nos tubos igual a 5 mL, conforme descrito na Tabela 3. Para cada pH foi obtida uma curva analítica na faixa de 1 a 10 mg L⁻¹ de quercetina.

Tabela 3 - Volumes, em mL, de dispersão de CDs, solução tampão, quercetina e água, usados na construção das curvas analíticas para o estudo do pH na determinação de quercetina.

Tubo	1	2	3	4	5	6
CDs	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Solução tampão	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
H₂O	3,90	3,85	3,80	3,75	3,70	3,40
Quercetina	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,50
Volume total	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00

Fonte: A autora (2019).

As soluções tampão empregadas neste estudo foram preparadas a partir das soluções estoque como descrito na Tabela 2.

3.3.4.6 Estudo do tempo de reação entre os CDs e a quercetina

Após a seleção do pH, foi verificado o melhor tempo para a reação entre os CDs e a quercetina. Para avaliar o tempo de reação foi adicionado em um tubo Falcon® 0,1 mL da dispersão dos CDs, 1 mL de solução tampão (pH 11), 3,4 mL de água deionizada e 0,5 mL da solução 100 mg L⁻¹ de quercetina (equivalente a 10 mg L⁻¹ de quercetina). Imediatamente após a adição de quercetina o conteúdo do tubo Falcon® foi levado para realização da medida no espectrofluorímetro onde foram obtidos sinais transientes de variação da intensidade da fluorescência em função do tempo. Assim, foi verificada a variação da intensidade de fluorescência da interação da quercetina com os CDs no intervalo de tempo de 800 s.

3.3.4.7 Estudo do volume da solução contendo CDs

Para utilizar o menor volume possível de dispersão de CDs na determinação de quercetina, foi realizado um estudo variando o volume de dispersão de CDs de 0,05 a 0,10 mL e as curvas analíticas obtidas para cada volume foram comparadas. Em 6 tubos Falcon® foram adicionados volumes fixos da solução tampão, volumes variados da quercetina de forma a obter diferentes concentrações da quercetina conforme ilustrado na Tabela 3 e

volumes variados de água deionizada e de dispersão de CDs (0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09 e 0,10 mL) mantendo o volume final nos tubos igual a 5 mL.

3.3.4.8 Estudo da composição química da solução tampão a ser empregada na determinação de quercetina

Após o ajuste do pH, foi realizado um estudo para verificar qual a composição química da solução tampão a ser empregada. Foi obtida uma curva para 5 soluções tampão diferentes: 1 – $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0,05 mol L^{-1} /NaOH 0,1 mol L^{-1} ; 2 – Na_2HPO_4 /NaOH 0,1 mol L^{-1} ; 3 – NaHCO_3 0,05 mol L^{-1} /NaOH 0,1 mol L^{-1} ; 4 – Glicocol/NaOH 0,1 mol L^{-1} e 5 – Na_2CO_3 /HCl 0,1 mol L^{-1} . As curvas foram obtidas, com os volumes de soluções mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Volumes, em mL, de dispersão de CDs, solução tampão, quercetina e água, usados na construção das curvas analíticas para o estudo da composição química da solução tampão na determinação de quercetina.

Tubo	1	2	3	4	5	6
CDs	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
Solução tampão	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
H₂O	3,92	3,87	3,82	3,77	3,72	3,42
Quercetina	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,50
Volume total	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00

Fonte: A autora (2019).

3.3.4.9 Estudo da concentração da solução tampão a ser empregada na determinação de quercetina

Após a escolha da solução tampão, foi realizado um estudo para verificar a influência da concentração da solução tampão na determinação de quercetina. O estudo foi realizado variando a concentração da solução tampão de Ringer (Na_2HPO_4 – NaOH) entre 0,1 e 0,6 mol L^{-1} (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 mol L^{-1}) e obteve-se uma curva para cada concentração de solução tampão. Foram separados 6 tubos Falcon e preenchidos com volumes de dispersão de CDs, solução tampão, água deionizada e quercetina, de acordo com os valores já mostrados na Tabela 4.

3.3.4.10 Mecanismo da supressão da fluorescência dos CDs induzido pela quercetina através da variação da temperatura

Para este estudo foi obtida uma curva para cada temperatura (298, 303 e 308 K), com os parâmetros otimizados anteriormente (pH do meio, tempo de reação, volume de dispersão de CDs, composição e concentração da solução tampão). Sabendo que a faixa linear para a determinação de quercetina foi de 1 a 10 mg L⁻¹, as curvas foram obtidas de acordo com os dados da Tabela 5.

Tabela 5 - Volumes, em mL, de dispersão de CDs, solução tampão, quercetina, e água, usados na construção das curvas analíticas para o estudo da temperatura na determinação de quercetina.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7
CDs	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
Solução tampão	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
H₂O	3,92	3,87	3,82	3,72	3,62	3,52	3,42
Quercetina	0,00	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50
Volume total	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00

Fonte: A autora (2019).

3.3.4.11 Estudo de interferentes na determinação de quercetina

Após estudar as principais variáveis que podem afetar o método proposto, foi realizado o estudo dos possíveis interferentes. O estudo foi realizado utilizando soluções com concentração de quercetina fixa em 5 mg L⁻¹ contendo de 0,02 a 20 mg L⁻¹ dos possíveis interferentes, de acordo com o que é encontrado na composição dos chás e cervejas, foram eles: ácido ascórbico, ácido gálico, ácido cítrico, ácido málico, catequina, epicatequina, kaempferol, resveratrol e miricetina, adicionados separadamente.

3.3.4.12 Método de adição e recuperação na determinação de quercetina

Para validação do método proposto foi empregado o método de adição e recuperação, onde se utiliza a amostra a ser analisada com adição proposital de uma concentração conhecida do analito, podendo assim verificar a recuperação

do método (SKOOG et al., 2006). Foram analisadas 6 amostras de cervejas e 6 amostras de chás. As amostras foram filtradas e o teste foi realizado mediante diluição de 1:10 (v/v) para as amostras de cervejas e de 1:30 (v/v) para as amostras de chás. Neste sentido, foram realizadas medidas da amostra diluída (tubo 1) e da amostra diluída com a adição de quercetina em dois níveis de concentração de 2 e 5 mg L⁻¹ (tubos 2 e 3). Para a análise foi construída uma curva analítica para calcular as concentrações das amostras analisadas com e sem adição de quercetina. Os volumes utilizados dos reagentes e amostra para este experimento são mostrados nas Tabelas 6 e 7:

Tabela 6 - Volumes, em mL, de dispersão de CDs, solução tampão, quercetina, amostra e água, usados no experimento de adição e recuperação na determinação de quercetina em amostras de cervejas.

Tubo	1	2	3
CDs	0,08	0,08	0,08
Solução tampão	1,00	1,00	1,00
H₂O	2,25	2,20	1,85
Quercetina	0,00	0,10	0,25
Amostra (Cerveja)	0,50	0,50	0,50
Volume total	5,00	5,00	5,00

Fonte: A autora (2019).

Tabela 7 - Volumes, em mL, de dispersão de CDs, solução tampão, quercetina, amostra e água, usados no experimento de adição e recuperação na determinação de quercetina em amostras de chás.

Tubo	1	2	3
CDs	0,08	0,08	0,08
Solução tampão	1,00	1,00	1,00
H₂O	2,25	2,20	1,85
Quercetina	0,00	0,10	0,25
Amostra (Chá)	0,17	0,17	0,17
Volume total	5,00	5,00	5,00

Fonte: A autora (2019).

Para o cálculo dos valores de recuperação de quercetina empregou-se a seguinte expressão matemática:

$$R\% = \frac{C_{AQ}}{C_A + C_Q} * 100$$

R% = recuperação em porcentagem;

C_{AQ} = medida da concentração da solução de amostra com adição de quercetina, em mg L⁻¹;

C_A = medida da concentração da solução de amostra, em mg L⁻¹;

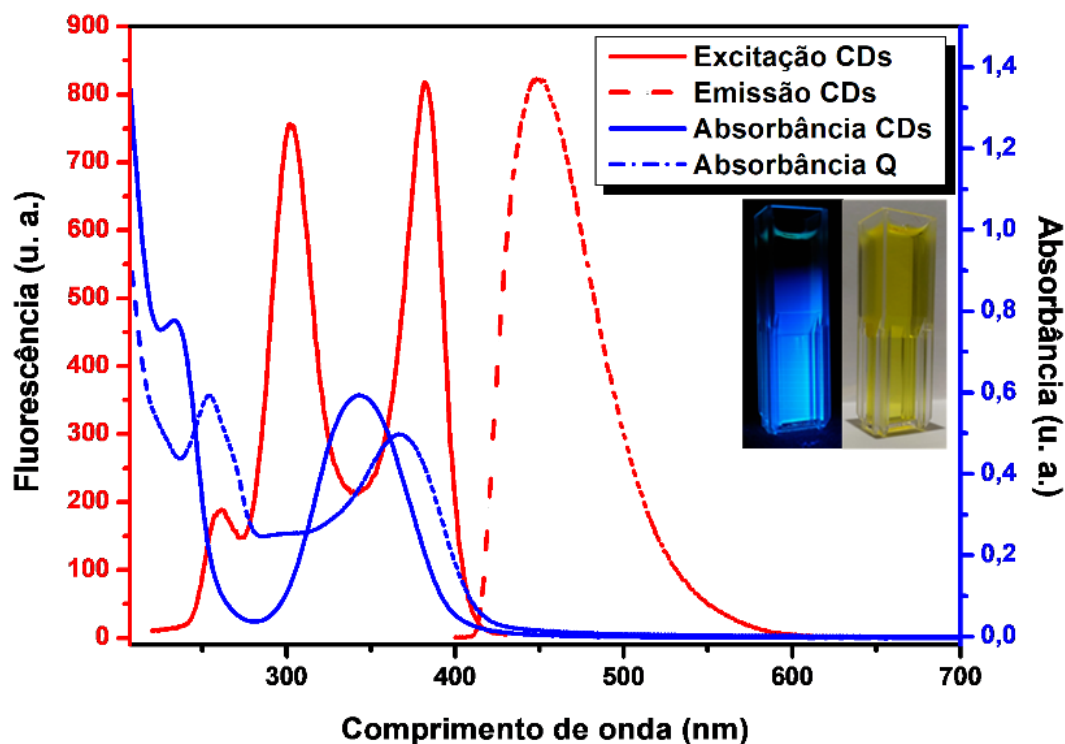
C_Q = concentração de quercetina adicionada, em mg L⁻¹.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Síntese dos *carbon dots*

O material obtido da síntese dos CDs adaptada do método de Guo e colaboradores (2013) apresentou uma coloração amarela. O espectro de absorção eletrônica e os espectros de emissão e excitação de fluorescência foram obtidos para o estudo das propriedades óticas dos CDs como ilustrado na Figura 9. O espectro de excitação apresentou três bandas em torno de 260, 300 e 380 nm. Independente do comprimento de onda de excitação escolhido, o espectro de emissão de fluorescência tem um máximo em 450 nm. Portanto, utilizando como parâmetro a maior intensidade de emissão, foi selecionado o comprimento de onda de excitação em 380 nm. O espectro de absorção na região do UV-Vis, apresentou duas bandas em torno de 230 e 340 nm, como previamente reportado na literatura (GUO et al., 2013). A banda em torno de 230 nm é relativa a transição $\pi - \pi^*$ e corresponde a ligação entre carbonos do tipo sp^2 de nanocarbono (JAISWAL; GHOSH; CHATTOPADHYAY, 2012; VAZ et al., 2017) e a banda em torno de 340 nm é correspondente a transição $n - \pi^*$ de ligação C = O e de grupos carboxílicos (ZHAO et al., 2015; VAZ et al., 2017). Tanto no espectro de absorção quanto no de emissão, nota-se que as curvas características dos CDs são semelhantes às da literatura (GUO et al., 2013) isso indica que provavelmente, mesmo após adaptações no procedimento, com a finalidade de simplificar a metodologia, foi possível obter o CDs com a mesma eficiência e qualidade obtida por Guo e colaboradores (2013).

Figura 9 - Sobreposição dos espectros de absorção (—) excitação (—) e emissão (---) dos CDs sintetizados e espectro de absorção da quercetina (---), a figura em miniatura (destaque) representa a imagem dos CDs sob irradiação de luz por uma lâmpada UV em 380 nm (esquerda) e sob luz natural (direita).



Fonte: A autora (2019).

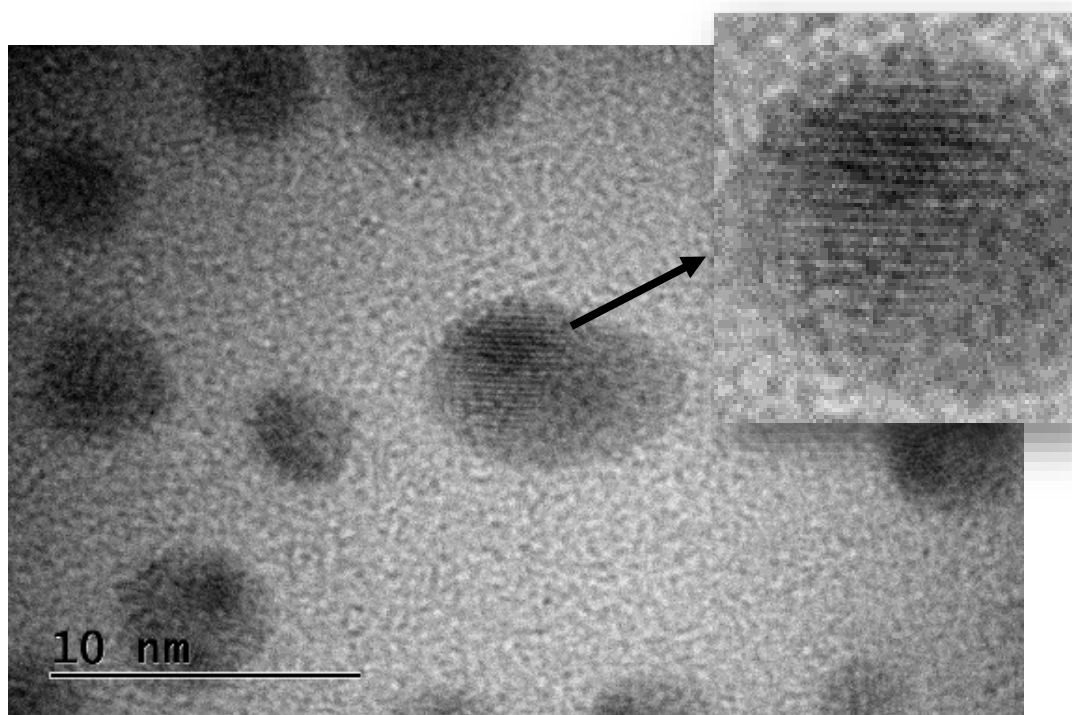
Os CDs sintetizados exibiram estabilidade coloidal em meio aquoso, sendo uma solução amarela translúcida quando está sob luz natural. Quando exposta a irradiação de lâmpada UV em 380 nm, ocorre a emissão de cor azul, como ilustrado na foto inserida na Figura 9, demonstrando que houve a formação das nanopartículas.

O rendimento quântico absoluto (QY) dos CDs dispersos em água foi de 9,3% (comprimento de onda de excitação de 380 nm). Este QY foi maior que o obtido para muitos QDs reportados na literatura (BOURLINOS et al., 2008; YANG et al., 2012; ZHENG et al., 2013) e menor que o obtido por Guo e colaboradores (2013) que foi de 68%. A diminuição do QY pode ser devida à não realização da etapa de diálise, que do ponto de vista analítico não foi necessária

neste trabalho, pois mesmo sem a etapa de diálise foi possível realizar as análises de forma mais simples e rápida.

Através da análise das imagens obtidas por microscopia de transmissão eletrônica (MET) (Figura 10), é possível observar que as nanopartículas tem uma morfologia esférica e as franjas dentro das partículas, destacada no zoom no canto superior à direita da imagem, indicam que os CDs possuíam estrutura cristalina, confirmando que os CDs foram obtidos como produto da síntese (DAGER et al., 2019).

Figura 10 - Imagens dos CDs sintetizados obtidas por MET.

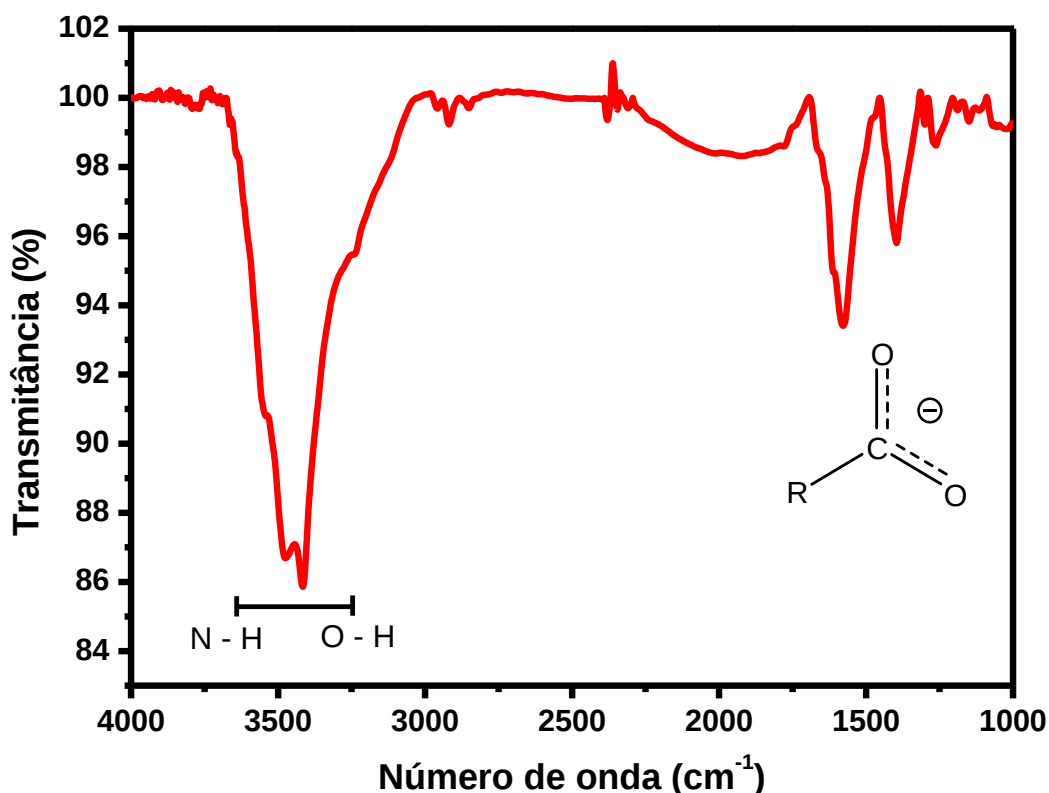


Fonte: A autora (2019).

Para uma melhor caracterização dos CDs, foi realizada uma análise por FTIR para verificar os grupos funcionais presentes na superfície dos CDs. Na Figura 11, observa-se bandas de 3200 a 3630 cm^{-1} atribuídas a vibração de estiramentos O – H e N – H (YANG et al., 2018). Os picos em 1577 cm^{-1} e 1396 cm^{-1} são correspondentes as vibrações de estiramentos assimétricos e simétricos de ânions carboxilatos (GUO et al., 2013). Desta forma, foi possível verificar a presença de grupos amino na superfície dos CDs que possivelmente

interagem com as hidroxilas fenólicas da quercetina. Sendo assim, pode-se sugerir que as ligações de hidrogênio que acontecem entre a quercetina e os grupos funcionais presentes na superfície dos CDs são as responsáveis pelo *quenching* da fluorescência (YANG et al., 2018).

Figura 11 - Espectro de transmitância no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) dos CDs.



Fonte: A autora (2019).

Os CDs sintetizados foram aplicados na análise da quercetina. Assim, foram realizados estudos para estabelecer as melhores condições de reação entre os CDs e a quercetina.

Foram avaliadas as condições experimentais utilizadas para o procedimento proposto, incluindo pH do meio, tempo de reação, volume de dispersão de CDs, natureza e concentração (força iônica) da solução tampão, mecanismo de interação através da variação da temperatura e seletividade dos CDs. Os estudos para avaliar o desempenho do ensaio analítico foram

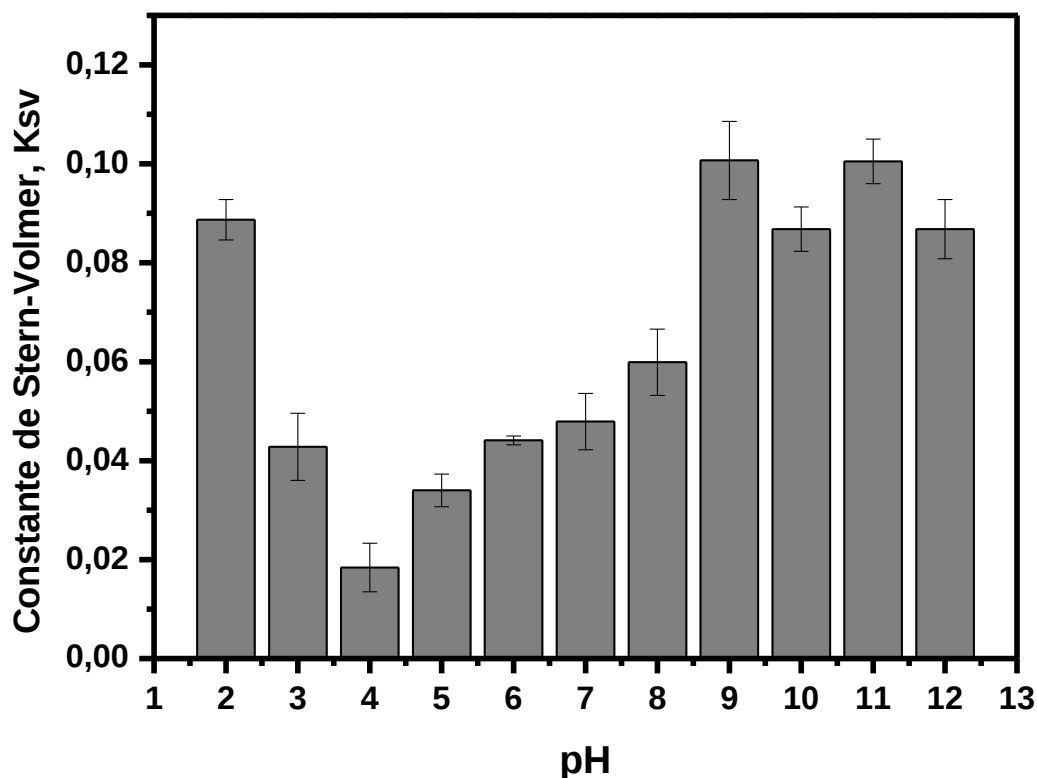
realizados utilizando análise univariada com a finalidade de alcançar a sensibilidade mais elevada, ou seja, o *quenching* máximo da fluorescência.

3.4.2 Estudo do pH ideal para a determinação de quercetina

Foi investigado a melhor condição do pH para o estabelecimento da reação proposta. A reatividade e a estabilidade dos CDs em um dado solvente estão relacionadas à carga da superfície das nanopartículas, a qual é dependente da natureza do ligante e do pH do meio. Devido a presença de grupos carboxílicos na superfície dos CDs, em meio ácido estes grupos são protonados o que pode levar a uma instabilidade coloidal das nanopartículas, ocasionando a agregação das mesmas e consequentemente a inibição da fluorescência (GUO et al., 2013).

Neste estudo, variou-se o pH entre 1 e 12 empregando soluções tampão, para avaliar a influência do pH no *quenching* da fluorescência dos CDs induzidos com quercetina. Na Figura 12 é possível observar que houve um aumento na sensibilidade (constante de Stern-Volmer, K_{sv}) em função do aumento do pH. Não foi verificada sensibilidade para o pH 1, pois neste pH não foi possível obter a curva analítica, uma vez que para todos os pontos da curva a intensidade de fluorescência foi igual a zero, possivelmente devido a uma agregação ou degradação dos CDs. A maior sensibilidade e o melhor coeficiente de correlação linear (R) foi obtido quando o pH foi igual a 11 ($F_0/F = (0,1005 \pm 0,0045) \times C + (0,9980 \pm 0,0234)$, $R = 0,9969$), onde C é correspondente a concentração de quercetina e F_0/F é a intensidade de fluorescência na ausência (F_0) e presença (F) de quercetina. Apesar das constantes de Stern-Volmer para os valores de pH 9 e 11 serem praticamente iguais, o pH 11 foi escolhido pois neste pH havia um maior *quenching* para a primeira concentração da curva (1 mg L^{-1}), o que tem influência direta no limite de detecção do método. Era esperado que a melhor condição fosse em pH 11, uma vez que os CDs sintetizados possuem pH 10,8. Portanto, selecionou-se o pH 11 para estudos posteriores.

Figura 12 - Constante de Stern-Volmer (K_{sv}) em função do pH da solução tampão a ser empregada na determinação de quercetina. pH das soluções tampão variou entre 2 e 12.



Fonte: A autora (2019).

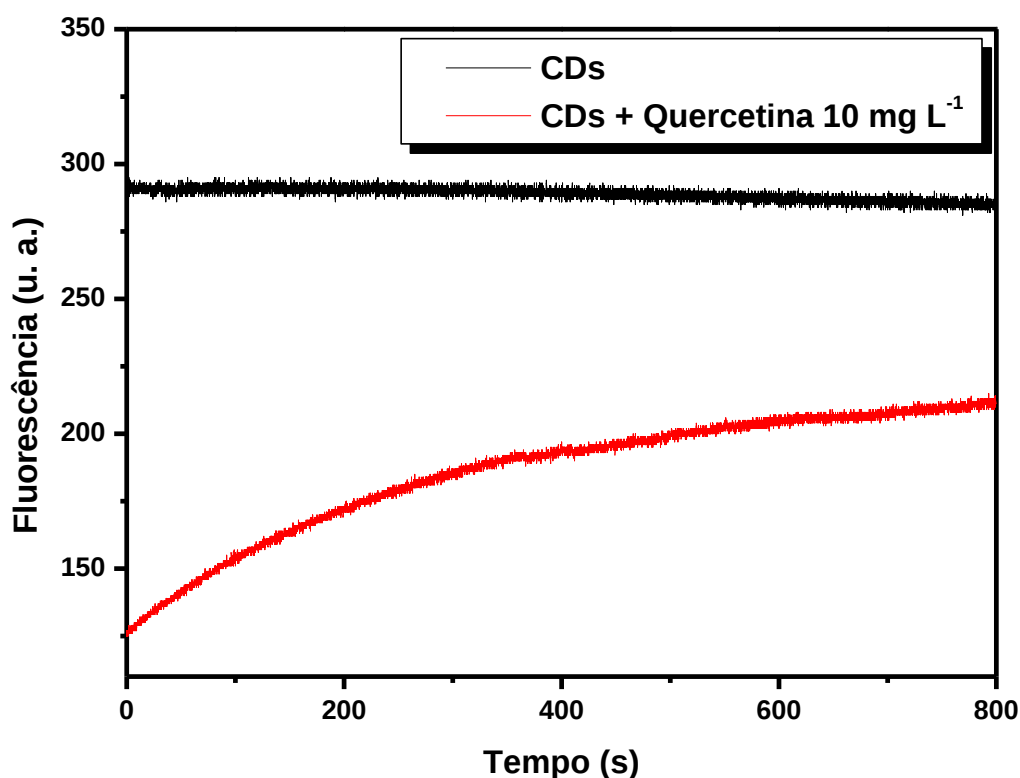
3.4.3 Estudo do tempo de reação entre os CDs e a quercetina

A estabilidade das dispersões de CDs pode afetar a reprodutibilidade e exatidão das sucessivas medidas de fluorescência durante as análises das amostras. Uma solução instável afetará a relação entre a fluorescência e a concentração do analito, pois a perda de fluorescência pode ser decorrente da instabilidade da solução e não da presença do analito em diferentes concentrações. Este aspecto torna-se mais importante se a reação demanda longo intervalo de tempo.

Na Figura 13 é apresentado o sinal transiente referente ao estudo do tempo de reação dos CDs com a quercetina empregando as condições previamente descritas no item 4.4.3. Pôde-se observar que a reação entre os CDs e a quercetina ocorria de forma rápida e, posteriormente, o equilíbrio era

deslocado de forma a regenerar parte dos CDs, uma vez que foi observada a recuperação parcial da fluorescência dos CDs. Sendo assim, foi selecionado um tempo de 30 s para leitura da reação, pois este era o menor tempo possível para a leitura, após a adição de quercetina ao tubo Falcon, onde ocorria a reação.

Figura 13 - Sinais transientes referentes aos CDs e a reação entre os CDs e a quercetina (10 mg L^{-1}), pH 11. O sinal foi monitorado em 450 nm.



Fonte: A autora (2019).

3.4.4 Estudo do volume da dispersão de CDs a ser empregado na determinação de quercetina

Em cada síntese que é realizada, são produzidos cerca de 10 mL de dispersão de CDs. Desta forma, procurou-se avaliar o volume de dispersão de CDs a ser empregado na análise de quercetina, para verificar qual a menor quantidade de dispersão de CDs possível de ser utilizado na análise sem que houvesse perda da sensibilidade do método. O volume foi variado entre 0,05 e 0,10 mL e foi obtida uma curva analítica para cada volume de dispersão de CDs

empregados. Em todos os volumes estudados foi possível obter uma resposta linear entre a razão da fluorescência (F_0/F) e a concentração de quercetina. A melhor sensibilidade (K_{sv}) foi obtida com o volume de 0,09 mL, porém neste volume o máximo de fluorescência para a solução do branco ultrapassava a faixa de trabalho do equipamento. Assim, foi selecionando o volume de 0,08 mL, pois apresentou uma curva com boa sensibilidade (K_{sv}) e melhor coeficiente de correlação linear (R), como demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8 - Equação da reta e coeficiente de correlação (R) de acordo com a variação do volume de dispersão de CDs para a determinação de quercetina.

Volume CDs (mL)	Equação da reta	R
0,05	$F_0/F = (0,1513 \pm 0,0049) \times C + (0,8936 \pm 0,0252)$	0,9984
0,06	$F_0/F = (0,1590 \pm 0,0062) \times C + (0,8639 \pm 0,0319)$	0,9977
0,07	$F_0/F = (0,1654 \pm 0,0067) \times C + (0,8889 \pm 0,0341)$	0,9976
0,08	$F_0/F = (0,1579 \pm 0,0039) \times C + (0,9316 \pm 0,0202)$	0,9991
0,09	$F_0/F = (0,1749 \pm 0,0085) \times C + (0,8748 \pm 0,0432)$	0,9965
0,10	$F_0/F = (0,1488 \pm 0,0064) \times C + (0,9814 \pm 0,0329)$	0,9972

C: concentração de quercetina; F_0/F : Intensidade de fluorescência na ausência (F_0) e presença (F) de quercetina.

Fonte: A autora (2019).

3.4.5 Estudo da composição química da solução tampão a ser empregada na determinação de quercetina

Foi realizado um estudo variando a composição química da solução tampão pH 11: $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{NaOH}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$, $\text{NaHCO}_3/\text{NaOH}$, Glicocol/ NaOH e $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{HCl}$, de acordo com a Tabela 9. Conforme pode ser observado, houve uma pequena queda na sensibilidade (K_{sv}) para as soluções tampão 1 e 4. Nas curvas obtidas com as soluções tampão 3 e 5, embora a sensibilidade (K_{sv}) tenha sido maior, o *quenching* para a primeira concentração da curva (1 mg L^{-1}) foi menor do que na curva obtida para a solução tampão 2. Os resultados revelaram que a solução tampão $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$ permitiu obter maior estabilidade dos CDs e maior efeito *quenching* para quercetina. Sendo assim, a solução tampão $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$ foi escolhida.

Tabela 9 - Equação da reta e coeficiente de correlação (R) de acordo com a variação da composição química da solução tampão para a determinação de quercetina.

Tampão	Solução tampão	Equação da reta	R
1	Na ₂ B ₄ O ₇ 0,05 mol L ⁻¹ /NaOH 0,1mol L ⁻¹	$F_0/F = (0,1338 \pm 0,0082) \times C + (0,8006 \pm 0,0416)$	0,9946
2	Na ₂ HPO ₄ / NaOH 0,1 mol L ⁻¹	$F_0/F = (0,1511 \pm 0,0075) \times C + (0,8922 \pm 0,0384)$	0,9963
3	NaHCO ₃ 0,05 mol L ⁻¹ /NaOH 0,1 mol L ⁻¹	$F_0/F = (0,1761 \pm 0,0119) \times C + (0,8500 \pm 0,0608)$	0,9932
4	Glicocol/ NaOH 0,1 mol L ⁻¹	$F_0/F = (0,1323 \pm 0,0043) \times C + (0,9250 \pm 0,0219)$	0,9984
5	Na ₂ CO ₃ / HCl 0,1 mol L ⁻¹	$F_0/F = (0,1672 \pm 0,0091) \times C + (0,8606 \pm 0,0461)$	0,9956

C: concentração de quercetina; F₀/F: Intensidade de fluorescência na ausência (F₀) e presença (F) de quercetina.

Fonte: A autora (2019).

3.4.6 Estudo da concentração da solução tampão a ser empregada na determinação de quercetina

Após estabelecer o pH (11) e a composição da solução tampão (Na₂HPO₄/NaOH), a concentração da solução tampão foi avaliada. A magnitude da interação do analito com a superfície dos CDs pode ser influenciada pela força iônica do meio reacional (concentração da solução tampão). A avaliação deste parâmetro foi realizada variando a concentração das espécies presentes na solução tampão, Na₂HPO₄ e NaOH entre 0,1 e 0,6 mol L⁻¹. Como mostrado na Tabela 10, não houve grande variação na sensibilidade (K_{sv}) e nos valores de coeficiente de correlação linear (R) na análise de quercetina em função da variação da concentração da solução tampão. Assim, foi mantida a menor concentração empregada, 0,1 mol L⁻¹, para os estudos posteriores.

Tabela 10 - Equação da reta e coeficiente de correlação (R) de acordo com a variação da concentração da solução tampão para a determinação de quercetina.

Concentração (mol L ⁻¹)	Equação da reta	R
0,1	$F_0/F = (0,1502 \pm 0,0041) \times C + (0,9096 \pm 0,0211)$	0,9989
0,2	$F_0/F = (0,1303 \pm 0,0059) \times C + (0,8919 \pm 0,0304)$	0,9969
0,3	$F_0/F = (0,1321 \pm 0,0051) \times C + (0,9069 \pm 0,0259)$	0,9979
0,4	$F_0/F = (0,1555 \pm 0,0077) \times C + (0,8985 \pm 0,0392)$	0,9964
0,5	$F_0/F = (0,1657 \pm 0,0104) \times C + (0,8782 \pm 0,0529)$	0,9942
0,6	$F_0/F = (0,1463 \pm 0,0049) \times C + (0,9808 \pm 0,0249)$	0,9983

C: concentração de quercetina; F_0/F : Intensidade de fluorescência na ausência (F_0) e presença (F) de quercetina.

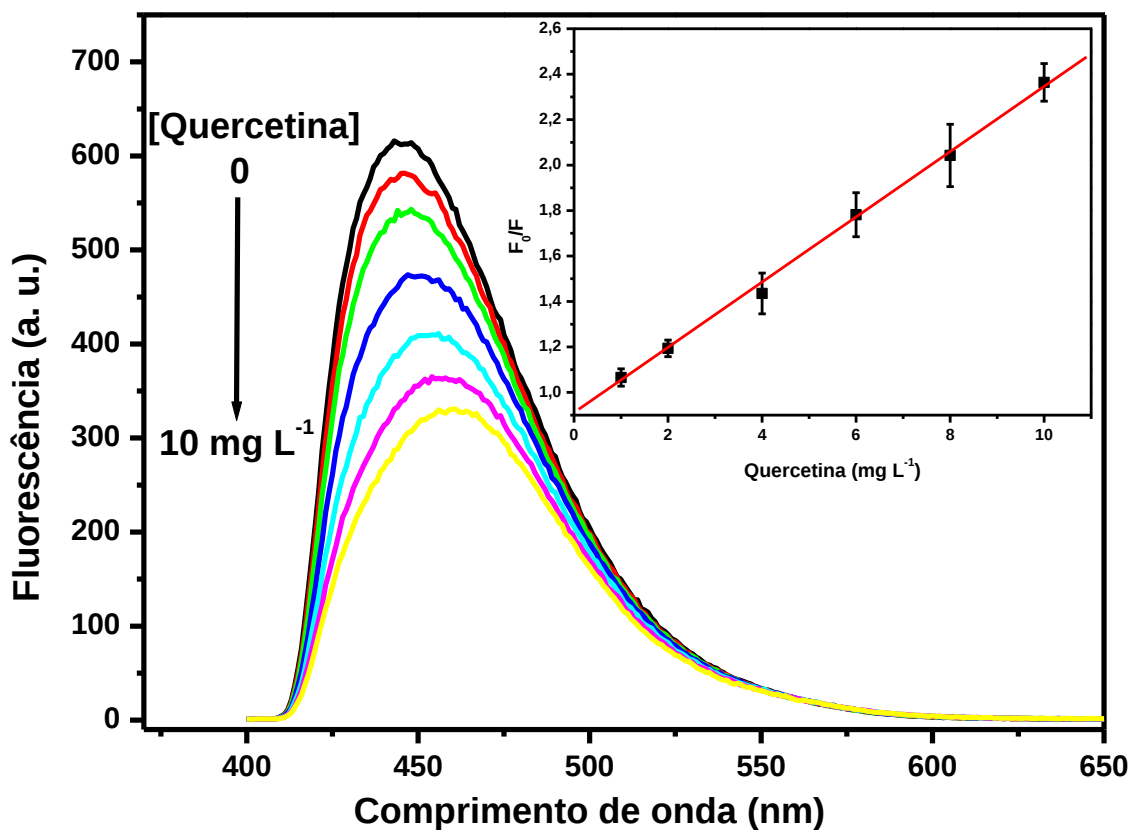
Fonte: A autora (2019).

3.4.7 Mecanismo de interação entre os CDs e a quercetina

Na Figura 9, é possível observar que o espectro de absorção da quercetina possui duas bandas em torno de 255 e 370 nm. Os CDs sintetizados exibem uma banda de absorção em torno de 340 nm e uma banda de emissão em torno de 450 nm quando excitado em 380 nm. É observada uma sobreposição parcial entre os espectros de absorção da quercetina e os espectros de absorção e excitação dos CDs. O *quenching* da fluorescência dos CDs ocorre devido ao comprimento de onda de absorbância da quercetina ser próxima do comprimento de onda de excitação dos CDs. Assim, a quercetina presente no meio absorve parte da radiação que seria usada na excitação dos CDs, levando ao efeito de filtro interno entre a quercetina e os CDs, causando a mudança na intensidade da fluorescência (ZHENG et al., 2013; VAZ et al., 2017).

Os espectros da Figura 14, mostram um deslocamento do pico máximo de fluorescência dos CDs para comprimentos de onda maiores (*red-shift*) após a reação com a quercetina. É possível observar que o *red-shift* aumenta com o aumento da concentração de quercetina, sugerindo que o mecanismo envolvido no *quenching* da fluorescência não se deve somente ao efeito de filtro interno, mas também ao estado fundamental dos compostos formados (HUANG et al., 2015).

Figura 14 - Espectros de fluorescência para a determinação de quercetina, soluções de referência contendo: 0 - 10 mg L⁻¹, em destaque a curva analítica para a quercetina.

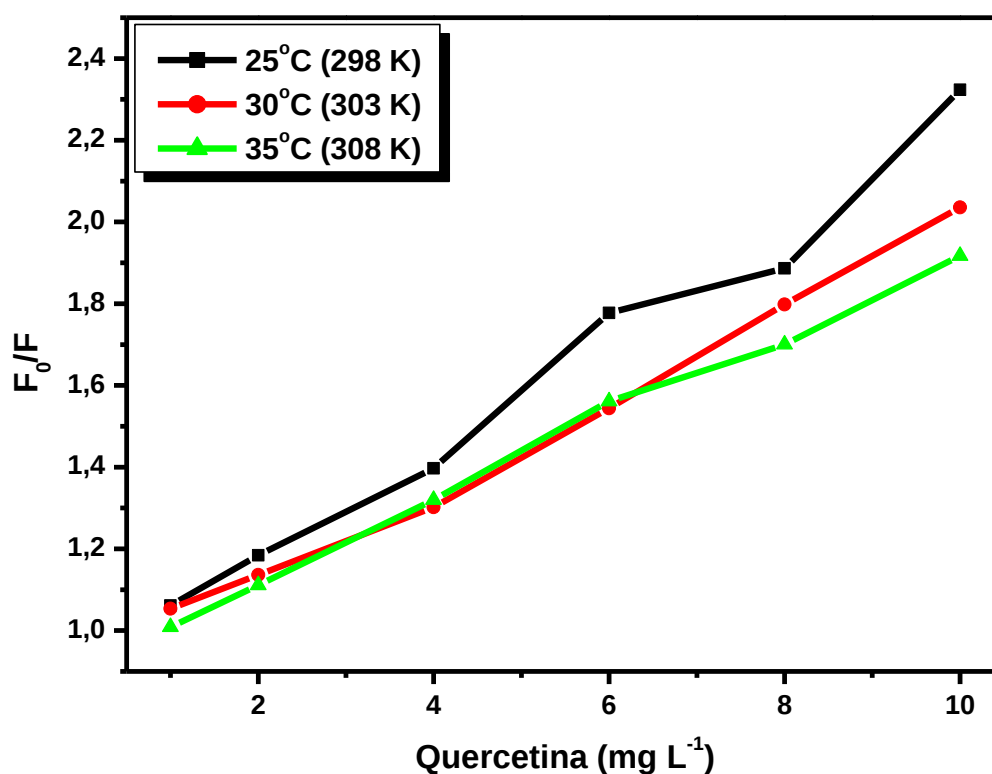


Fonte: A autora (2019).

A Figura 15 mostra a influência da temperatura na intensidade da fluorescência dos CDs em 298, 303 e 308 K. É possível observar que ocorre uma diminuição na constante de Stern-Volmer com o aumento da temperatura do meio reacional.

Este fenômeno demonstra que o mecanismo envolvido no *quenching* da fluorescência dos CDs causado pela quercetina é estático. Quando o *quenching* da fluorescência é dinâmico, o aumento da temperatura aumenta a difusão bem como o número de colisões entre os CDs e o *quencher*, o que aumenta o valor da constante de Stern-Volmer. Quando o mecanismo envolvido é estático, com o aumento da temperatura ocorre a dissociação dos complexos formados durante a reação entre os CDs e o *quencher*, ocasionando um decréscimo na constante de Stern-Volmer.

Figura 15 - Curvas analíticas obtidas da reação entre os CDs e a quercetina sob diferentes temperaturas: 25, 30 e 35°C, respectivamente.



Fonte: A autora (2019).

Na Tabela 11, é possível observar que houve um decréscimo na constante de Stern-Volmer com o aumento da temperatura da interação entre os CDs e a quercetina.

Os valores das constantes de ligação (K_b) e o número de sítios ligantes (n) foram obtidos através da curva de regressão logarítmica do $\log(F_0 - F/F)$ em função do $\log[Q]$ com base na Equação 1:

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log K_b + n \log[Q] \quad \text{Equação 1}$$

A partir da interceptação e inclinação da curva, utilizando a Equação 1, foram obtidos os valores de K_b e n para cada temperatura (298, 303 e 308 K).

Foram calculados também os parâmetros termodinâmicos da interação entre os CDs e a quercetina. O cálculo da energia livre (ΔG) foi realizado através da Equação 2:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_b \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo, R a constante universal dos gases (8,314462 J/mol K), T a temperatura em Kelvin e K_b a contante de ligação.

A variação de entalpia (ΔH) foi calculada através da Equação 3:

$$\Delta H = - \left(\frac{\left(\ln \frac{K_{b2}}{K_{b1}} \right) * R}{\left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right)} \right) \quad (\text{Equação 3})$$

Onde, K_{b2} e K_{b1} são as constantes de ligação em duas temperaturas diferentes, R a constante universal dos gases a T_1 e T_2 são as temperaturas nas quais K_{b1} e K_{b2} foram calculados.

A variação da entropia (ΔS) foi calculada através da Equação 4:

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde, ΔH e ΔG são a entalpia e energia livre calculadas, respectivamente (DWIECKI et al., 2017). Os valores dos parâmetros termodinâmicos encontram-se na Tabela 11 abaixo.

Tabela 11 - Constantes de Stern-Volmer (K_{sv}), constantes de ligação (K_b), número de sítios ligantes (n) e os parâmetros termodinâmicos obtidos da interação entre os CDs e a quercetina em diferentes temperaturas.

T (K)	$K_{sv} \times 10^3$ (L mol ⁻¹)	R ^a	$K_b \times 10^5$ (L mol ⁻¹)	n	R ^b	ΔH (KJ mol ⁻¹)	ΔG (KJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹)
298	41,08	0,9909	9,26	1,30	0,9964	-88,12	-34,04	-32,20
303	36,18	0,9967	5,15	1,26	0,9989		-33,13	
308	34,75	0,9982	1529,67	1,80	0,9768		-48,26	

^a: Coeficiente de correlação para os valores de K_{sv} ; ^b: Coeficiente de correlação para os valores de K_b .

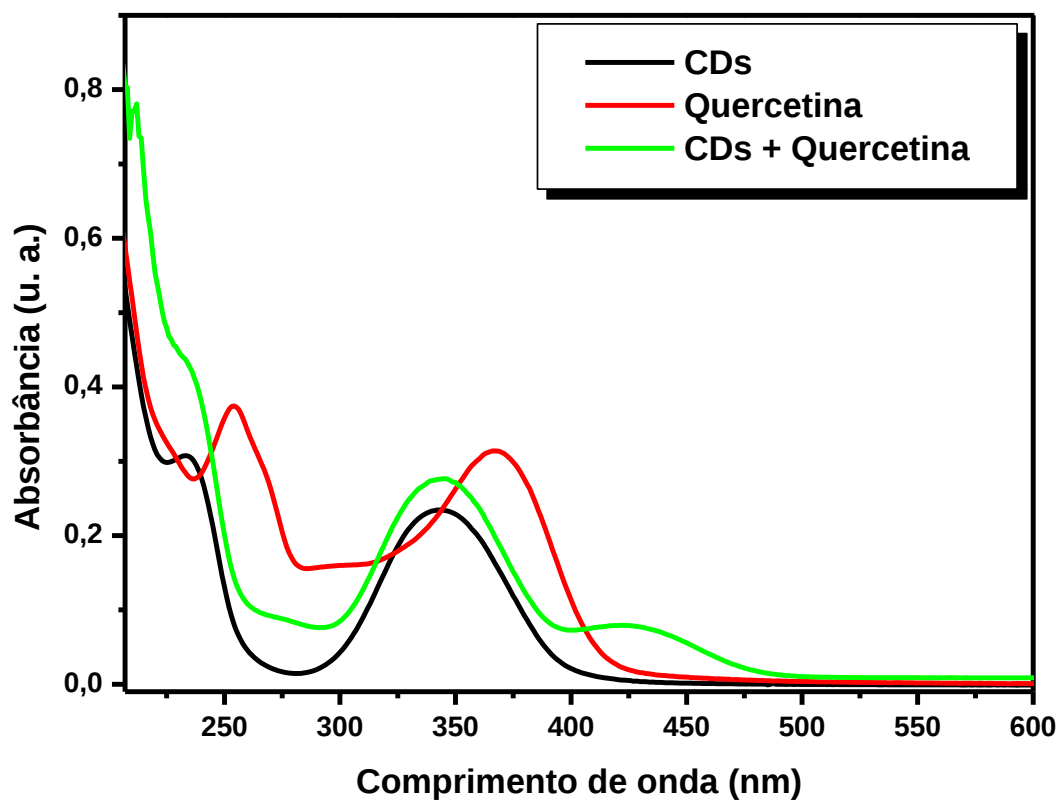
Fonte: A autora (2019).

Foi observado que para todas as temperaturas estudadas foram obtidos valores de energia livre negativos, indicando a formação espontânea dos complexos formados da interação entre os CDs e a quercetina. O valor obtido de entalpia foi negativo, demonstrando que a complexação ocorre através de um processo exotérmico, ou seja, ocorre liberação de energia (DWIECKI et al., 2017).

Através dos parâmetros termodinâmicos também é possível prever que tipo de interação ocorre entre os CDs e a quercetina. Os valores de entalpia e entropia negativos são característicos de sistemas onde ocorrem interações de Van der Waals e ligações de hidrogênio. Uma forma de confirmar os tipos de interação é através da avaliação da força iônica, foi possível observar a influência da força iônica através do estudo da variação da concentração da solução tampão. Neste estudo foi observado que o aumento da concentração da solução tampão (força iônica), não afetou significativamente o sinal analítico, indicando que não há preferência por forças eletrostáticas, sendo preferenciais as ligações de hidrogênio e as forças de Van der Waals (VAZ et al., 2017).

Outra forma de verificar se o mecanismo envolvido no *quenching* da fluorescência dos CDs é estático é através do espectro de absorção dos CDs na presença e na ausência da quercetina, como ilustrado na Figura 16. A formação de complexo no estado fundamental pode ocasionar a mudança no espectro de absorção dos CDs (ZU et al., 2017). É possível observar a mudança no espectro de absorção dos CDs após a reação com a quercetina. Existe uma banda em torno de 425 nm (Figura 14) indicando que houve uma perturbação na nuvem eletrônica dos CDs. Esta banda não aparece no espectro de absorção da quercetina, demonstrando que ela é proveniente da interação entre os CDs e a quercetina.

Figura 16 - Espectro de absorção dos CDs, da quercetina e do produto da interação entre os CDs e a quercetina.

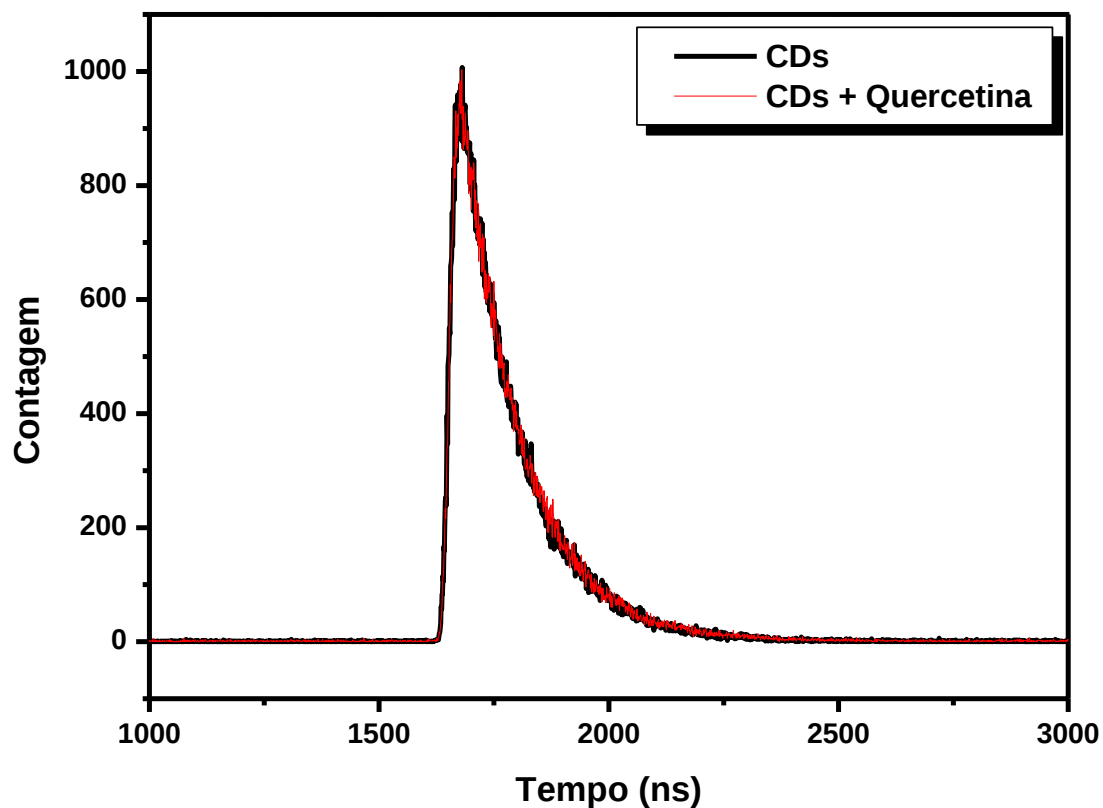


Fonte: A autora (2019).

A forma mais eficiente de avaliar se o mecanismo envolvido no *quenching* da fluorescência é estático ou dinâmico é através da medida do tempo de vida de fluorescência (τ). Quando o *quenching* é estático, o tempo de vida da fluorescência não sofre variação na presença da quercetina ($\tau_0/\tau = 1$), τ_0 e τ são referentes ao tempo de vida dos CDs na ausência e na presença de quercetina, respectivamente. Os CDs complexados não fluorescem, então somente a fluorescência dos CDs não complexados é observada.

Por outro lado, quando o mecanismo do *quenching* é dinâmico $F_0/F = \tau_0/\tau$. É possível observar na Figura 17 que o tempo de vida de fluorescência dos CDs e dos CDs na presença de 10 mg L^{-1} de quercetina em solução tampão pH 11,0 foi 6,43 ns e 6,54 ns, respectivamente, assim podemos dizer que $\tau_0/\tau = 1$, o que comprova que o mecanismo envolvido no *quenching* da fluorescência da reação dos CDs com a quercetina foi estático (LAKOWICZ, 2006; YANG et al., 2018).

Figura 17 - Perfil de decaimento de emissão de fluorescência dos CDs e dos CDs na presença de 10 mg L⁻¹ de quercetina em solução tampão pH 11,0 (λ_{ex} = 380 nm, λ_{em} = 450 nm).



Fonte: A autora (2019).

Guo e colaboradores (2013) observaram que os CDs em pHs baixos apresentavam baixa fluorescência e em pHs altos apresentavam fluorescência alta. Sendo assim, concluíram que existe a presença de grupos carboxílicos nos CDs sintetizados. Estes grupos podem ser protonados em meio ácido, o que poderia levar à agregação dos CDs, resultando no *quenching* da fluorescência. A interação entre a quercetina e os CDs pode ocorrer na superfície dos CDs (XIAO et al., 2013). Possivelmente, esta interação ocorre entre os CDs sintetizados e os compostos formados, devido à instabilidade na estrutura do anel da quercetina em meio básico, resultando na fragmentação da estrutura do anel (CHEN; ZHOU; JI, 2010) e desta forma a superfície dos CDs se modificada o que ocasiona o *quenching* da fluorescência.

3.4.8 Estudo de interferentes para a determinação de quercetina

Para avaliar a seletividade do método proposto foi investigado o efeito de possíveis interferentes que podem afetar a análise de amostras reais. O efeito destas substâncias no sinal da solução de referência foi avaliado no método otimizado empregando solução de referência de 5 mg L⁻¹ quercetina contendo diferentes concentrações das espécies potencialmente interferentes, tais como, ácido ascórbico, ácido gálico, ácido cítrico, ácido málico, catequina, epicatequina, kaempferol, resveratrol e miricetina. Foram consideradas como interferentes, as espécies químicas as quais os sinais obtidos usando a solução padrão de quercetina com a substância interferente ocasionasse uma variação de até $\pm 5\%$ com relação ao sinal da solução padrão de quercetina (DE ANDRADE et al., 2014).

Analisando os resultados obtidos, mostrados na Tabela 12, pode-se observar que as espécies com maior potencial interferente são catequina, kaempferol e miricetina, pois estas substâncias apresentaram um limite de concentração menor que os demais interferentes.

Tabela 12 - Estudo de interferência para diferentes substâncias na determinação de quercetina.

Substância	Concentração (mg L ⁻¹)	Variação do sinal (%)
Ácido ascórbico	5,00	-1,84
Ácido gálico	5,00	-2,32
Ácido cítrico	5,00	+1,08
Ácido málico	10,00	-4,74
Catequina	2,00	+0,71
Epicatequina	15,00	+4,76
Kaempferol	0,04	-2,95
Resveratrol	10,00	-1,36
Miricetina	1,00	-4,85

Solução de referência de quercetina 5 mg L⁻¹.

Fonte: A autora (2019).

Em amostras de cervejas a catequina, o kaempferol e a miricetina são encontrados em teores que variam de 5,9 a 10,1 mg L⁻¹ para a catequina

(CORTACERO-RAMÍREZ et al., 2004), para o kaempferol foi encontrado um teor de 16,4 mg L⁻¹ (SIQUEIRA; BOLINI; MACEDO, 2008) e para a miricetina foi encontrado um valor de 0,08 mg L⁻¹ (JANDERA et al., 2005). Considerando que a amostra de cerveja foi diluída 1:10 (v/v), a concentração de catequina, kaempferol e miricetina se mantiveram em um máximo de aproximadamente 1,01; 1,64 e 0,008 mg L⁻¹, respectivamente. Portanto, não é esperado um efeito interferente da catequina e miricetina uma vez que sua concentração na cerveja é menor que a concentração que causa interferência na análise. Caso a cerveja analisada não tenha um teor máximo de kaempferol, que é de 16,4 mg L⁻¹ como descrito na literatura, poderia ser esperado também que não houvesse interferência deste polifenol após a sua diluição para a análise de quercetina.

Em amostras de chás, apesar das concentrações de catequina, kaempferol e miricetina serem altas (BEHLING et al., 2004), como relatado na literatura, o teste de adição e recuperação confirmou a exatidão do método, mostrando que não houve efeito de interferente nas amostras de chá analisadas. Desta forma, através do teste de recuperação (Tabela 14), foi avaliada a exatidão do método.

3.4.9 Figuras de mérito do método proposto para a determinação de quercetina

Os parâmetros estabelecidos no procedimento proposto para a determinação de quercetina empregando tempo de reação de 30 s e uma solução tampão de Ringer (Na₂HPO₄ – NaOH) são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13 - Parâmetros estabelecidos após a otimização do procedimento proposto para a determinação de quercetina.

Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
pH	1 – 12	11
Volume da dispersão dos CDs (mL)	0,05 – 0,10	0,08
Concentração da solução tampão (mol L ⁻¹)	0,1 – 0,6	0,1

Fonte: A autora (2019).

Na Figura 14 é possível observar que a intensidade de emissão de fluorescência dos CDs foi sensível a quercetina e diminuiu com o aumento da concentração da mesma. Também foi observado um *red-shift* na emissão dos CDs que se tornava mais pronunciado com o aumento da concentração de quercetina.

Obteve-se uma resposta linear entre 1,0 e 10,0 mg L⁻¹ quercetina. Estimou-se a equação linear empregando-se o método dos mínimos quadrados como sendo $F_0/F = (0,1511 \pm 0,0075) \cdot [Q] + (0,8922 \pm 0,0384)$ ($R = 0,9963$, $n = 3$) (F_0 e F representam a intensidade de fluorescência dos CDs na ausência e na presença, respectivamente, de quercetina) e $[Q]$ é a concentração da quercetina, em mg L⁻¹). Este fenômeno pode ser descrito pela equação de Stern-Volmer (DE SOUZA et al., 2015), como ilustrado na Equação 5, onde observa-se a dependência linear de F_0/F com a concentração do *quencher* $[Q]$. Onde K_{sv} é a constante do *quenching* ou a constante de Stern-Volmer, estabelecida em 0,1511 L mg⁻¹ (KEIZER, 1983; HU et al., 2019).

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] \quad \text{(Equação 5)}$$

O limite de detecção foi estimado em 0,85 mg L⁻¹ e foi obtido um desvio padrão relativo (RSD) de 0,21% ($n = 3$, 4 mgL⁻¹ quercetina). No teste de adição e recuperação foi possível obter valores de recuperação para as amostras de chás e cervejas entre 80 e 107%, demonstrado que não houve efeito de matriz. Assim, pode-se dizer que o método proposto para análise de quercetina é viável para aplicações analíticas.

O método proposto foi comparado com outros previamente reportados na literatura para determinação de quercetina (Tabela 14), mostrando que o presente trabalho apresentou uma faixa linear comparável a métodos reportados na literatura (REZAZADEH et al., 2015). Na análise empregando CLAE-EM, aquecimento e uso de solventes como ácido fórmico e acetonitrila foram necessários, e as análises foram demoradas (JESZKA-SKOWRON; KRAWCZYK; ZGOŁA-GRZESKOWIAK, 2015). Em alguns trabalhos, o preparo de amostra era dispendioso e demandava muito tempo (ZIYATDINOVA; KOZLOVA; BUDNIKOV, 2018; REZAZADEH et al., 2015; HU; FENG; LI, 2014).

No método espectrofotométrico, embora as análises tenham sido realizadas diretamente devido à simplicidade das amostras (fármaco), houveram desvantagens como a quantidade de solvente necessária e tempo de reação de 4 min, sendo oito vezes mais lento que o tempo de reação relatado no presente trabalho (PEJIC et al., 2004). São também reportados métodos com detecção por fluorescência, que utilizam nanopartículas de carbono para determinação de quercetina em solução aquosa como o método utilizando *carbon dots* funcionalizados com organossilano (ZOU et al., 2015) e também o método empregando nanopartículas fluorescentes de carbono (XIAO et al., 2013) embora esses métodos sejam interessantes, eles não foram aplicados em amostras reais.

O presente trabalho tem vantagens sobre os outros, como alta frequência analítica, economia de reagentes sendo ecologicamente correta, não envolve nenhuma etapa de extração com solvente, a análise é viável após etapas simples de filtração e diluição não sendo necessário nenhum pré-tratamento complexo.

Tabela 14 - Comparação das características analíticas de metodologias empregadas na determinação de quercetina.

Método de detecção	Faixa linear (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Limite de detecção (mg L ⁻¹)	Amostra	Referências
Voltamétrico	0,0002 – 7,55	3,5	0,0001	Ervas medicinais	(ZIYATDINOVA; KOZLOVA; BUDNIKOV, 2018)
CLAE-EM	0,002 – 2,0	-	-	Infusões de chá	(JESZKA-SKOWRON; KRAWCZYK; ZGOŁA- GRZESKOWIAK, 2015)
Eletroquímico	0,12 – 9,07	5	0,012	Chá	(REZAZADEH et al., 2015)
Fluorescência	0,02 – 0,8	4,1	0,005	Urina e casca de cebola	(HU; FENG; LI, 2014)
Espectrofotométrico	1,0 – 12,0	< 3	0,76	Cápsulas de Quercetina com vit. C	(PEJIC et al., 2004)
Fluorescência	0 – 12,0	-	0,02	Solução aquosa	(ZOU et al., 2015)
Fluorescência	0,87 – 9,54	2,9	0,03	Solução aquosa	(XIAO et al., 2013)
Fluorescência	1,0 – 10,0	1,22	0,85	Chá e cerveja	Presente trabalho

CLAE-EM: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Espectrometria de Massa; DPR: desvio padrão relativo.

Fonte: A autora (2019).

3.4.10 Método de adição e recuperação para a determinação de quercetina em amostras de chás e cervejas

O teste de adição e recuperação é uma das maneiras de avaliar a exatidão dos resultados analíticos (XU et al., 2012). Em um teste de adição e recuperação, uma quantidade conhecida do constituinte a ser analisado (analito) é adicionada à matriz e, em seguida, a análise é realizada neste material. Uma comparação da concentração encontrada na matriz sem adição pela quantidade adicionada fornece a recuperação do método, o que nos fornece uma estimativa da exatidão do método (BETZ; BROWN; ROMAN, 2011).

Seis tipos de amostras de cerveja (*Weissbier*, *Pilsen* e *Lager*) e seis tipos de amostras de chá foram analisados: verde e preto em infusão e chá verde pronto para consumo. A adição foi realizada em dois níveis de concentração de quercetina, 2,0 e 5,0 mg L⁻¹. Antes das análises as amostras foram filtradas e diluídas, 1:10 (v/v) para amostras de cervejas e 1:30 (v/v) para amostras de chás, com o intuito de manter a concentração de quercetina dentro da faixa de trabalho do procedimento proposto.

Na análise realizada, como demonstrado na Tabela 15, foram obtidos valores de recuperação entre 80 e 107%, indicando a exatidão do método proposto e demonstrando que não houve efeito de matriz na determinação de quercetina. Sendo assim, método pode ser empregado na determinação de quercetina em amostras de cervejas e chás.

Tabela 15 - Resultados obtidos para o teste de adição e recuperação para a determinação de quercetina.

Amostras	Adicionado (mg L⁻¹)	Encontrado (mg L⁻¹)	Recuperação (%)
Lager Beer	0	5,14	-
	2,0	5,90	83
	5,0	8,65	85
Lager Beer	0	1,73	-
	2,0	3,01	81
	5,0	6,09	91
Weissbier	0	4,37	-
	2,0	5,94	93
	5,0	8,12	87
Pilsen Beer	0	1,88	-
	2,0	3,12	81
	5,0	7,01	101
Pilsen Beer	0	2,96	-
	2,0	4,32	87
	5,0	7,70	97
Pilsen Beer	0	1,51	-
	2,0	3,39	96
	5,0	5,22	80
Chá verde*	0	3,87	-
	2,0	6,27	107
	5,0	8,30	94
Chá verde	0	8,45	-
	2,0	10,62	102
	5,0	13,17	98

Continua

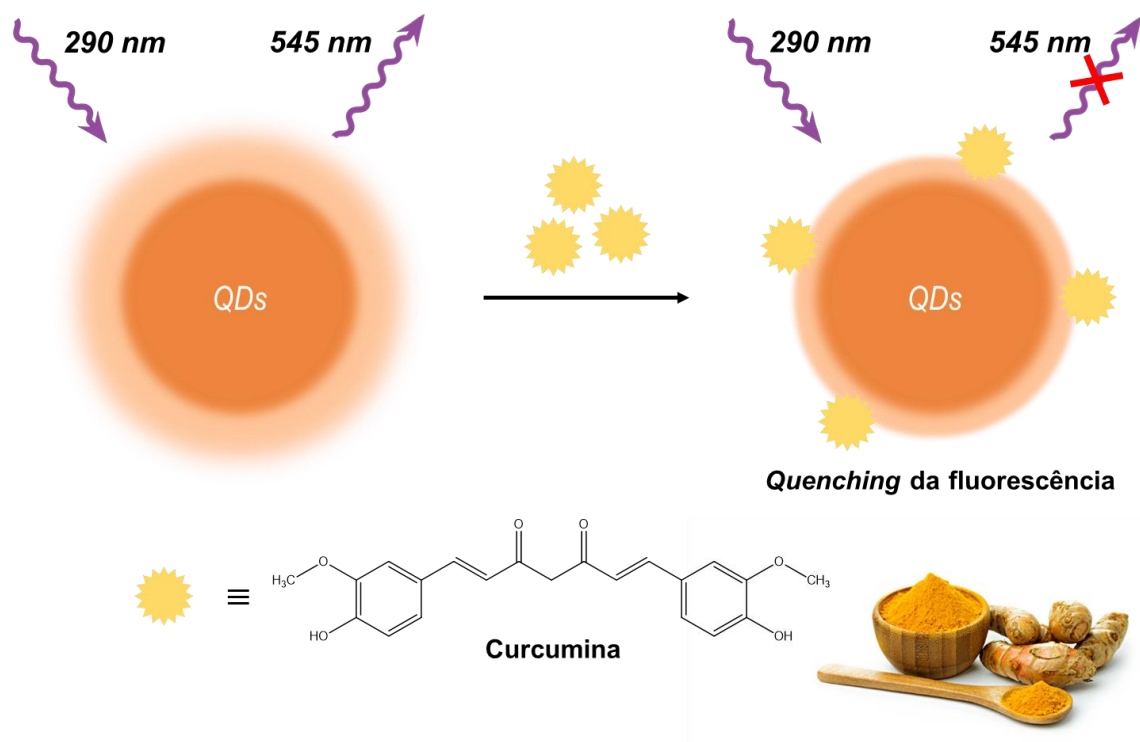
Amostras	Adicionado (mg L⁻¹)	Encontrado (mg L⁻¹)	Recuperação (%)
Chá verde	0	6,54	-
	2,0	8,15	95
	5,0	13,64	104
Chá verde	0	8,72	-
	2,0	8,99	84
	5,0	11,24	82
Chá preto	0	7,48	-
	2,0	9,22	97
	5,0	11,32	91
Chá preto	0	6,37	-
	2,0	8,76	91
	5,0	10,07	89

* Pronto para consumo.

Fonte: A autora (2019).

4 USO DE *QUANTUM DOTS* TERNÁRIOS SINTETIZADOS VIA ELETROQUÍMICA COMO SENSOR FLUORESCENTE PARA A DETERMINAÇÃO DE CURCUMINA EM AMOSTRAS DE AÇAFRÃO-DA-TERRA

Figura 18 - Esquema ilustrativo da aplicação dos QDs ternários na determinação de curcumina através do *quenching* da fluorescência.



Fonte: A autora (2019).

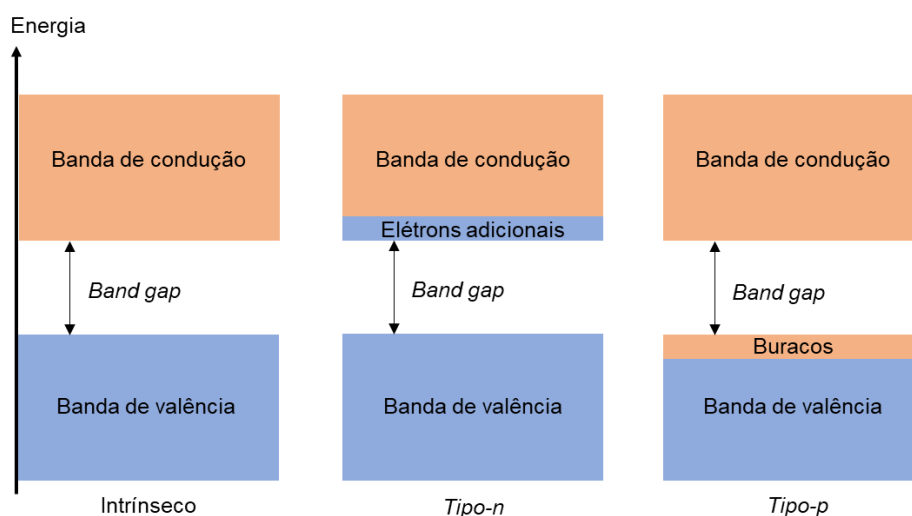
4.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1.1 *Quantum dots*

Existem materiais que possuem uma condutividade intermediária, sua condutividade fica entre a dos materiais condutores (como no caso dos metais) e a dos isolantes, estes materiais são chamados de semicondutores. Os semicondutores que possuem uma banda de valência (BV) completa e uma banda de condução (BC) vazia, separadas por um *band gap* relativamente pequeno, são os chamados de semicondutores intrínsecos (ATKINS; JONES, 2012). Devido ao tamanho do *band gap* (E_g), com o aumento da temperatura alguns elétrons são excitados da BV para a BC, onde podem se deslocar pelo sólido, por isso, a condutividade destes materiais dependem fortemente da temperatura (RAHMAN, 2015).

Outra forma de aumentar a condutividade de um semicondutor é através da adição de elétrons na BC (semicondutores *tipo-n*) ou pela remoção de elétrons na BV (semicondutores *tipo-p*), isso é possível através do processo de dopagem do sólido com impurezas, que são átomos que possuem mais ou menos elétrons de valência do que o material semicondutor (Figura 19). Quando a BV perde elétrons, pode-se dizer que ela possui “buracos” que fazem com que ela atue como uma BC, permitindo o movimento dos elétrons.

Figura 19 - Esquema das bandas de semicondutores intrínseco, *tipo-n* e *tipo-p*.

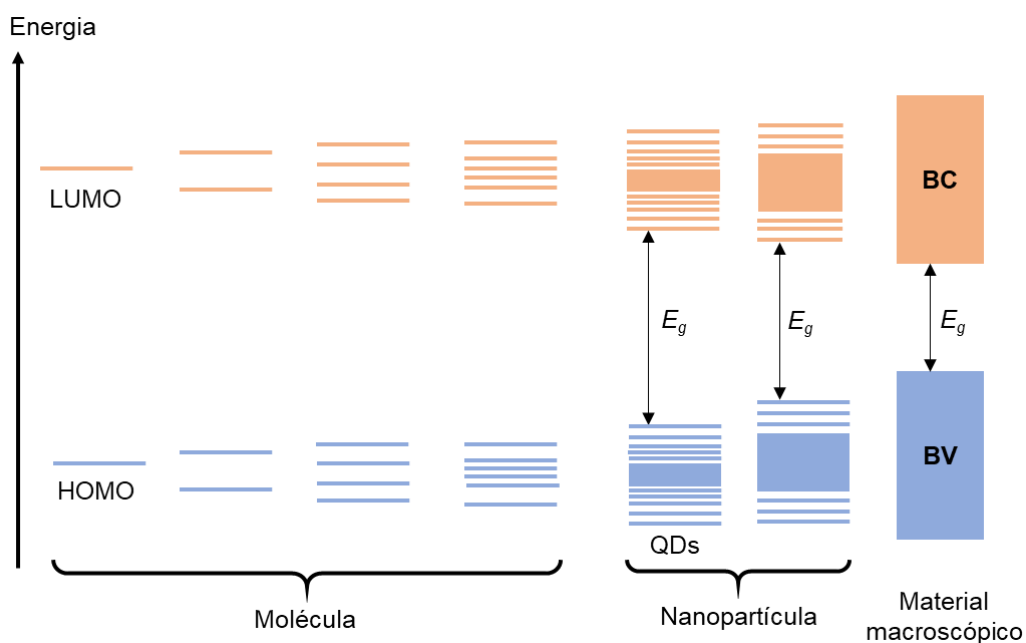


Fonte: Adaptado de Atkins (ATKINS; JONES, 2012).

Um tipo de semicondutor que trouxe uma grande inovação tecnológica no campo de nanomateriais funcionais são os nanocristais semicondutores. Quando o tamanho desses nanocristais semicondutores é menor ou igual ao raio de Bohr do *éxciton* (nome dado ao par elétron-buraco ligados através de interação coulômbica) que pode variar de ~ 2 a ~ 50 nm dependendo do material, ocorre um efeito de confinamento quântico que levam a algumas manifestações como a aparição de novas propriedades óticas (RABOUW; DONEGA, 2016; LI et al., 2018).

Quando o raio da nanopartícula ultrapassa o raio de Bohr, sendo o dobro ou o triplo do tamanho, o confinamento é classificado como fraco e as mudanças nos níveis de energia são consideradas moderadas em comparação ao estado de confinamento forte. Em nanopartículas, a estrutura eletrônica possui uma elevada densidade de estados no centro da banda e níveis discretos nas bordas devido ao efeito do confinamento quântico, como ilustrado na Figura 20 (BACCARO; GUTZ, 2018).

Figura 20 - Níveis de energia ou orbitais moleculares de moléculas diatômicas ao material na sua forma macroscópica. LUMO: Orbital Molecular desocupado de menor energia; HOMO: Orbital Molecular Ocupado de maior energia; QDs: *quantum dots*; Eg: *Band Gap*; BC: banda de condução; BV: banda de valência.

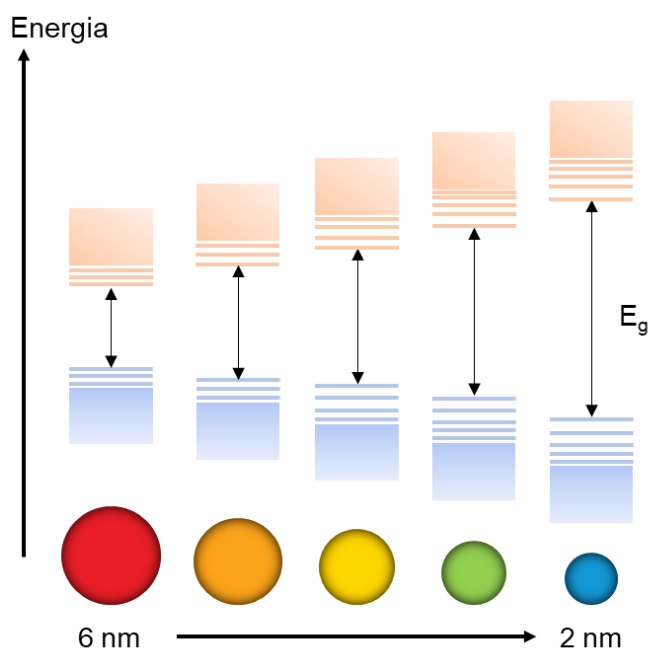


Fonte: Adaptado de Baccaro (BACCARO; GUTZ, 2018).

Os níveis discretos de energia se fundem à medida que o número de átomos aumenta, assim, as moléculas maiores exibem uma quasi-continuidade dos níveis de energia pois, o número de átomos enfileirados tende ao infinito. Com a redução do número de átomos, os níveis de energia em nanopartículas são quebrados, não obedecendo ao modelo de banda do material em sua forma macroscópica, apresentando uma configuração de BV e BC mais próximas dos modelos de orbitais moleculares. Com a diminuição do diâmetro das partículas também é observado um aumento no *band gap* relacionado ao efeito de confinamento quântico (RABOUW; DONEGA, 2016; BACCARO; GUTZ, 2018).

O efeito de confinamento quântico possibilita o ajuste dos espectros óticos (absorção e fotoluminescência) dos semicondutores cristalinos dentro de uma ampla janela espectral, apenas pela variação do tamanho das nanopartículas sintetizadas (Figura 21) mantendo sua composição constante (RABOUW; DONEGA, 2016).

Figura 21 - Representação esquemática da influência do efeito do confinamento quântico nos níveis de energia dos nanocristais semicondutores de mesma composição. O *band gap* (E_g) aumenta com a diminuição do tamanho das nanopartículas.



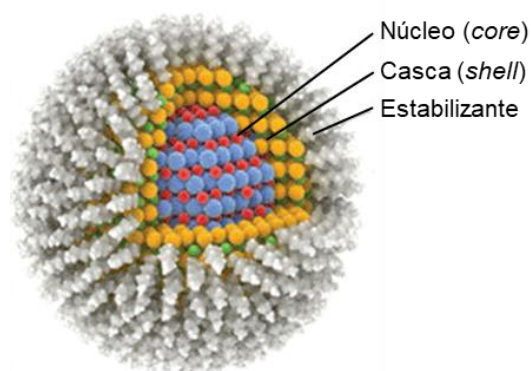
Fonte: Adaptado de Rabouw (RABOUW; DONEGA, 2016).

Quando um semicondutor absorve um fóton com energia igual ou maior que o valor do seu *band gap*, um elétron é promovido da BV para a BC, assim, ocorre a formação de um *éxciton*, quando esse elétron retorna para a banda de valência a fluorescência é emitida. Se um *éxciton* está espacialmente confinado em todas as direções é obtido os chamados pontos quânticos ou *quantum dots* (RABOUW; DONEGA, 2016).

Os QDs foram descobertos no início dos anos 1980 (EKIMOV; ONUSHCHENKO, 1981; ÉFROS; ÉFROS, 1982; ROSSETTI; NAKAHARA; BRUS, 1983), mas o termo *quantum dot* só foi empregado em 1988 (REED et al., 1988). As suas propriedades óticas e eletrônicas fizeram com que, nos últimos anos, eles fossem aplicados em bioimagem, fotodetectores, células solares, sensores fluorescentes, entre outros (WAGNER et al., 2019).

Os *quantum dots* possuem tipicamente uma faixa de diâmetro entre 2 e 10 nm, são constituídos por um núcleo (*core*) de um semicondutor com *band gap* (E_g) e uma casca (*shell*) de outro semicondutor com *band gap* (E_g') maior que E_g e pode ainda estar ligado a uma molécula orgânica que configura como estabilizante (Figura 22).

Figura 22 - Representação esquemática da estrutura core-shell do *quantum dot*.



Fonte: Adaptado de Nasirzadeh (NASIRZADEH; NAZARIAN; HAYAT, 2016).

O núcleo é responsável pelas propriedades óticas fundamentais, como absorção eletrônica, emissão, etc. A casca é empregada para suprimir defeitos existentes na superfície do núcleo, pois esses defeitos funcionam como armadilhas onde um elétron ou buraco podem ficar presos, resultando assim, na inibição da fluorescência. Portanto, a casca evita a diminuição do rendimento

quântico, fotodegradação e diminui a largura da linha da banda de emissão (FONTES; SANTOS, 2014; RESHMA; MOHANAN, 2019).

A incorporação de agentes estabilizantes nos QDs é determinante na aplicação dos mesmos. A aplicação final dos QDs está relacionada à natureza do agente estabilizante empregado na síntese, pois eles auxiliam na interação das nanopartículas com o alvo por meio de interações hidrofóbicas ou acoplamento eletrostático ou covalente. Estes estabilizantes são utilizados para determinar a estabilidade coloidal dos QDs, solubilidade, distribuição do tamanho das partículas, controle da morfologia das partículas, interromper o crescimento descontrolado e a aglomeração dos QDs (RESHMA; MOHANAN, 2019).

Em geral os QDs são constituídos por elementos dos grupos: II (Zn, Cd, etc) e VI (Se, S, etc); III e V; IV e VI da tabela periódica. Assim como na síntese de diversas nanopartículas, os QDs são fabricados por métodos *top-down* e *bottom-up*. Entre os métodos utilizados estão os métodos de aquecimento/combustão, hidrotermal, micro-ondas/ultrassom assistido, síntese eletroquímica, ablação a laser, entre outros (PAWAR; UPADHAYA; PATRAVALE, 2018).

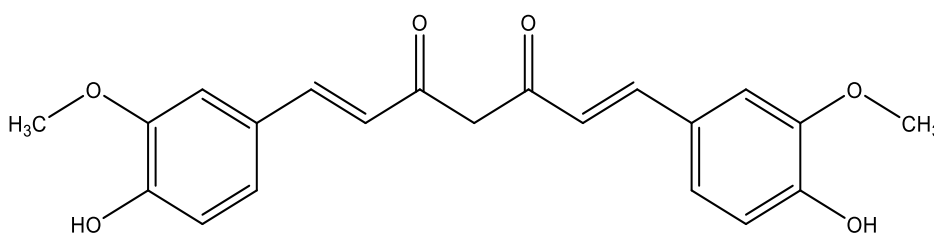
Nos últimos anos os QDs constituídos por elementos dos grupos II-VI, III-IV e IV-VI foram bastante investigados, porém, muitos QDs tradicionais do tipo II-VI contêm elementos tóxicos ao meio ambiente, como Hg, Cd e Pb, restringindo suas aplicações. Recentemente, nanocristais semicondutores do tipo I-III-VI têm atraído atenção devido ao fato de alguns deles serem menos tóxicos que os do tipo II-VI e possuírem excelentes propriedades óticas. A substituição de átomos com valência equivalentes, átomos do grupo II por átomos do grupo I e III, leva a obtenção de nanocristais semicondutores ternários I-III-VI. Alguns exemplos de QDs do tipo I-III-VI incluem CuInX_2 ($X = \text{S}, \text{Se} \text{ e } \text{Te}$) e AgInX_2 ($X = \text{S}, \text{Se} \text{ e } \text{Te}$) (ARSHAD et al., 2016; LI et al., 2018; MAY; PARANI; OLUWAFEMI, 2019).

4.1.2 Curcumina

Curcumina, ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$ - 1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona) (Figura 21) é um pigmento natural de cor amarela derivado do rizoma

da planta *Curcuma longa* L., planta pertencente à família das Zingiberaceae. O rizoma pode ser consumido fresco ou, para fins de conservação, pode ser desidratado e moído dando origem ao turmerico (pó amarelo obtido dos rizomas). É conhecida popularmente como açafrão-da-índia, açafrão-da-terra, cúrcuma, gengibre dourado, entre outros (SUETH-SANTIAGO et al., 2015; MARCHI et al., 2016).

Figura 23 - Estrutura química da curcumina.



Fonte: A autora (2019).

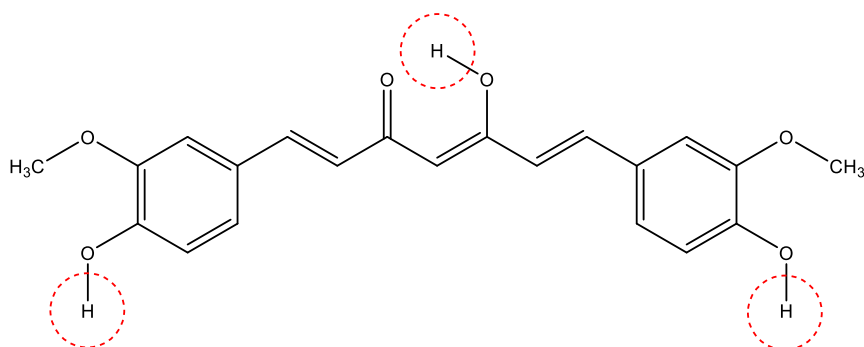
A planta *Curcuma longa* L. é originária da Índia e do sudeste da Ásia, sendo introduzida no Brasil na década de 1980. É utilizada há 6000 anos pela medicina ayurvédica, um tipo de medicina tradicional desenvolvida na Índia. É comumente utilizada em cosméticos, corantes alimentícios e aromatizantes de alimentos, porém suas atividades biológicas e farmacológicas, como atividades antioxidantes, anticâncer, anti-inflamatórios, antibacterianos e antidiabéticos, tem atraído bastante atenção e aumentado seu consumo (HU et al., 2017; HU et al., 2019).

De forma geral o açafrão-da-terra é composto de 6,3% de proteína, 5,1% de gordura, 3,5% de minerais, 69,4% de carboidratos, 13,1% de umidade, 3,5% de óleo essencial, 2,5 a 6% de curcuminóides e 5,7% de oleoresinas. A presença da cor amarela é devido a presença de pigmentos polifenólicos, chamados curcuminóides, onde o mais importante é a curcumina. Em média o açafrão-da-terra possui 3% de curcumina, 1,3% de desmetoxicurcumina (DMC) e 1,2% bisdesmetoxicurcumina (BDMC) (SALEHI et al., 2019; THANGAVEL; DHIVYA, 2019).

A curcumina apresenta algumas características frente ao meio em que ela se encontra, por exemplo, a partir de observações experimentais verificou-se que ela apresenta efeito solvatocrômico, havendo uma alteração no

comprimento de onda máximo de absorção com a variação da polaridade do solvente empregado. Outra propriedade que também interfere no comprimento de onda máximo da curcumina é o pH do meio, uma vez que em sua estrutura existem três hidrogênios ácidos (Figura 24), com valores de pK_a 8,31, 10,0 e 10,2, os quais são desprotonados com o aumento do pH (LEUNG; COLANGELO; KEE, 2008; SALEHI et al., 2019).

Figura 24 - Estrutura da curcumina na sua forma enólica com os hidrogênios ácidos destacados em vermelho.

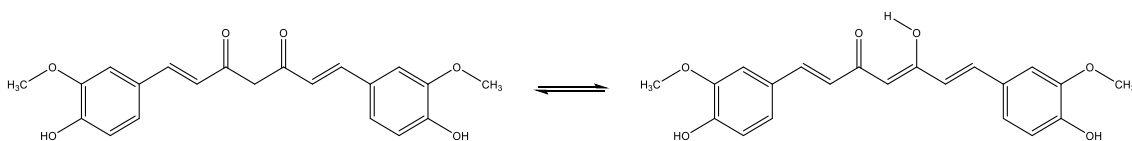


Fonte: A autora (2019).

O aumento do pH, aumenta a solubilidade da curcumina e a solução contendo curcumina passa do amarelo para o vermelho, devido ao efeito batocrômico, que é um tipo de solvatocronismo positivo pois ocorre a alteração do comprimento de onda para comprimento de ondas maiores (deslocamento para o vermelho) (REICHARDT, 1965).

A estrutura da curcumina apresenta um equilíbrio ceto-enólico numa faixa de pH entre 3 e 7 (Figura 25). O equilíbrio é deslocado no sentido da formação do enol devido à estabilidade conferida pela existência da ligação de hidrogênio intramolecular e da maior planaridade da molécula nesta configuração, favorecendo uma conjugação da cadeia carbônica (SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

Figura 25 - Equilíbrio ceto-enólico apresentado pela curcumina.



Fonte: A autora (2019).

As propriedades farmacológicas da curcumina se mostraram promissoras em diversas aplicações, como na indução de apoptose celular, inibição da proliferação celular anormal e atividades antiangiogênicas e antimicrobianas, entre outras (HU et al., 2017).

Estudos realizados em pacientes com artrite, comprovaram a eficiência da ação anti-inflamatória da curcumina, melhorando a rigidez articular e o inchaço das articulações destes pacientes (PAREEK et al., 2019). A eficácia anti-inflamatória da curcumina também foi verificada em pacientes com osteoartrite e artrite reumatoide, confirmando o efeito da curcumina no combate da artrite (SALEHI et al., 2019).

A curcumina possui um efeito antifibrótico através de múltiplos mecanismos, pela estimulação ou inibição de muitos genes, fatores de transcrição, proteínas e células (LELLI et al., 2017). Também apresentou ação antioxidante no tratamento de patologias de distúrbios neurológicos (BABU; MOHAMMED; HARIKUMAR, 2019) e atividades farmacológicas duplas devido a suas ações anticâncer e antifúngica, atuando na prevenção e tratamento do câncer (CHEN et al., 2016).

Apesar dos inúmeros benefícios à saúde proporcionados pela curcumina, existe uma preocupação com o uso indiscriminado de produtos contendo este pigmento. Os benefícios estão relacionados a quantidade consumida, foi relatado que uma concentração elevada de curcumina ($10 - 25 \mu\text{mol L}^{-1}$) pode levar a uma atividade pró-oxidante no DNA, como também, pode causar a diminuição dos níveis intracelulares de ATP desencadeando o processo de necrose. Sendo assim, é importante não ingerir elevadas concentrações de curcumina, evitando os malefícios trazidos pelo seu uso em excesso (KELLY et al., 2001; HU et al., 2019).

A curcumina está presente em diversos alimentos presentes no nosso cotidiano, como chás, curry, mostarda em pó, páprica vermelha em pó, gengibre em pó, açafrão em pó, entre outros. Alguns trabalhos propõe a determinação de curcumina nestas matrizes apresentando as seguintes concentrações: $0,31 \text{ mg L}^{-1}$ para o chá de canela, $0,35 \text{ mg L}^{-1}$ para o chá de ervas com açafrão e limão, $0,45 \text{ mg L}^{-1}$ para curry, $0,83 \text{ mg L}^{-1}$ para mostarda em pó, $2,85 \text{ mg L}^{-1}$ para páprica vermelha em pó, $1,72 \text{ mg L}^{-1}$ para gengibre em pó e $25,64 \text{ mg L}^{-1}$ para açafrão em pó (HU et al., 2019)(ALTUNAY; ELIK; GÜRKAN, 2020).

4.1.3 Métodos para a determinação de curcumina

Diversos métodos são descritos na literatura para a determinação de curcumina nas mais variadas matrizes, como por exemplo, espectrofotometria UV-Vis (BEHBAHANI; GHAEDI; ASFARAM, 2019), fluorimetria (HU et al., 2019), espectroscopia no infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) (THANGAVEL; DHIVYA, 2019), cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa (YU et al., 2019a), cromatografia de camada fina de alta eficiência (ANSARI et al., 2005), cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta (SYED et al., 2015), entre outros métodos.

No trabalho desenvolvido por Behbahani e colaboradores (2019), foi proposta a síntese de uma nanopartícula lipídica magnética (NLM) que posteriormente seria empregada como adsorvente na pré-concentração e determinação de curcumina em amostras de água através de espectrofotometria UV-Vis. Todo o processo de adsorção e extração da curcumina teve duração média de 1h. A curcumina foi determinada em amostras de água, com faixa linear de 0,05 e 0,9 mg L⁻¹ e foi obtido um limite de detecção de 0,022 mg L⁻¹.

Na determinação fluorimétrica proposta por Hu e colaboradores (2019), os autores sintetizaram *carbon dots* dopados com nitrogênio e cloro através do uso de etilenodiamino e ácido clorídrico. Os *carbon dots* sintetizados foram empregados na determinação de curcumina em amostras de alimentos (mostarda em pó, gengibre em pó, páprica vermelha em pó e açafrão-da-terra. As amostras foram centrifugadas durante 15 min. A faixa linear de trabalho foi entre 0,04 e 12,9 mg L⁻¹ com um limite de detecção de 0,014 e um RSD menor que 5,61%.

No método empregando espectroscopia no infravermelho próximo com transformada de Fourier (FTNIR) proposto por Thangavel e Dhivya (2019), os autores determinaram curcumina, amido e umidade nos rizomas do açafrão-da-terra. Para a extração de curcumina, as amostras foram colocadas em refluxo com aquecimento durante 2h30min. Os autores fizeram a comparação dos valores, em porcentagem, obtidos através do método espectrofotométrico com o método empregando FTNIR, pevedo o teor de curcumina com alta precisão.

Diversos métodos envolvendo cromatografia também são bastante empregados. Yu e colaboradores (2019) utilizaram a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa em Tandem na determinação simultânea de curcumina, tetrahidrocurcumina, quercetina e paeoniflorina em plasma de ratos. O preparo de amostra foi realizado através de diversas etapas com a aplicação de vários solventes, como acetato de etila, acetonitrila e ácido fórmico. Após a otimização do método, os autores obtiveram um coeficiente de determinação igual a 0,99 e um limite de quantificação para a curcumina de 0,001 mg L⁻¹.

Outro método envolvendo cromatografia foi proposto por Ansari e colaboradores (2005). Os autores utilizaram cromatografia em camada fina de alta eficiência na determinação de curcumina em medicamentos. Para o preparo de amostra os comprimidos foram macerados e o equivalente a 10 mg foi pesado e levado para extração em metanol, após a extração o conteúdo foi sonificado por 30 min e o volume foi completado para 100 mL. Após estas etapas, a solução foi centrifugada, filtrada e em seguida analisada. O método apresentou um coeficiente de correlação de 0,994, uma faixa linear de 50 a 300 mg L⁻¹, um RSD menor que 0,98% e um limite de detecção de 8 mg L⁻¹.

O método de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta foi empregado por Syed e colaboradores (2015) para a determinação de curcumina em extrato de cúrcuma. Para o preparo de amostra os autores pesaram o extrato de cúrcuma em um frasco com volume de 20 mL, solubilizaram o extrato em metanol e o frasco foi levado para o ultrassom por 5 min. O trabalho apresentou faixa linear entre 2 e 200 mg L⁻¹ com um RSD de 2% e um limite de detecção de 0,3 mg L⁻¹.

Nos métodos apresentados acima, a curcumina foi determinada em várias faixas de concentração com boa precisão. Porém os métodos apresentaram algumas limitações, como por exemplo, análises que exigiam um preparo de amostra laboriosa e dispendiosa e emprego de diversos solventes que tornavam o método não viável do ponto de vista ambiental, alto consumo de reagentes, alto custo dos equipamentos empregados, resultados complexos, necessidade de utilizar modelos de calibração, etapas de extração e pré-concentração tornando as análises mais demoradas.

Em comparação com outros métodos analíticos, os métodos envolvendo fluorescência possuem vantagens, como, instrumentação simples, fácil manipulação, alta sensibilidade e excelente seletividade (SHI et al., 2019b). Essas vantagens somadas ao emprego de nanopartículas fluorescentes como os *quantum dots* ternários sintetizados com elementos das famílias I-III-VI da tabela periódica, torna o método fluorescente ainda mais vantajoso, pois, além de apresentarem todas as propriedades inerentes aos QDs, como estabilidade, espectros de excitação amplos e espectro de emissão estreito (BONILLA et al., 2019), essas nanopartículas são menos tóxicas frente aos QDs clássicos, que eram constituídos por elementos como Hg, Cd e Pb, o que torna os QDs ternários *eco-friendly* e biocompatíveis (ARSHAD et al., 2016).

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Geral

Desenvolver um método analítico para a determinação de curcumina em amostras de açafrão-da-terra baseado no *quenching* da fluorescência de *quantum dots* ternários sintetizados por via eletroquímica.

4.2.2 Específicos

- Avaliar o melhor comprimento de onda de excitação dos *quantum dots* sintetizados;
- Estabelecer o pH, a composição química e a concentração da solução tampão para a interação entre os *quantum dots* sintetizados e a curcumina;
- Avaliar o tempo de reação entre os *quantum dots* sintetizados e a curcumina;
- Realizar estudo do volume de *quantum dot* utilizado na reação;
- Avaliar o mecanismo de interação entre os QDs e a curcumina;
- Realizar análise de interferentes;
- Validação do método: intervalo linear de concentração, desvio padrão relativo, limite de detecção e quantificação, realizar teste de adição e recuperação;
- Analisar amostras reais.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Reagentes e solventes

Para o preparo das soluções foram utilizados os reagentes e solventes apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 - Reagentes, solventes e suas especificações.

Reagentes e solventes	Marca	Massa molar (g mol ⁻¹)	Teor %
Glutathione (γ-L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine)	Sigma-Aldrich	307,32	98
Sulfato de cobre (CuSO ₄)	Sigma-Aldrich	159,61	≥ 99,99
Nitrato de Índio (In(NO ₃) ₃)	Sigma-Aldrich	300,83	≥ 99,99
Grafite em pó (< 20 mm)	Sigma-Aldrich	12,01	≥ 99,99
Enxofre (S)	Sigma-Aldrich	32,07	99,98
Cloreto de manganês (MnCl ₂)	Vetec	125,84	98
Fosfato de cálcio bibásico (CaHPO ₄)	Synth	136,06	99
Albumina	Vetec	58,44	80

Fonte: A autora (2019).

4.3.2 Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada, com reagentes de alto grau analítico e vidrarias devidamente calibradas.

4.3.2.1 Soluções estoque

As soluções estoque 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, cloreto de manganês, fosfato de cálcio bibásico e albumina foram preparadas a partir de seus

reagentes sólidos em água deionizada e armazenadas em recipiente de vidro âmbar.

A solução $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ de CuSO_4 foi preparada a partir de seu reagente sólido em água deionizada e armazenada em recipiente de vidro âmbar.

A solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{In}(\text{NO}_3)_3$ foi preparada a partir de seu reagente sólido em etanol e armazenada em recipiente de vidro âmbar.

4.3.2.2 Soluções tampão

As soluções tampão foram preparadas a partir das soluções estoque como descrito na Tabela 2.

4.3.3 Equipamentos e acessórios

Para a síntese dos QDs foi utilizada uma célula de cavidade, vidro sinterizado, bastão de grafite, agitador e chapa aquecedora. Para aplicação do potencial foi utilizado um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT30. Todos estes equipamentos estão instalados no Laboratório de Eletrossíntese (LES) no Departamento de Química Fundamental da UFPE. Foi utilizado um espectrofluorímetro Shimadzu (modelo RF-5301PC, São Paulo, Brasil) para as medidas de fluorescência.

4.3.4 Método

3.3.4.1 Síntese dos *Quantum dots* (QDs)

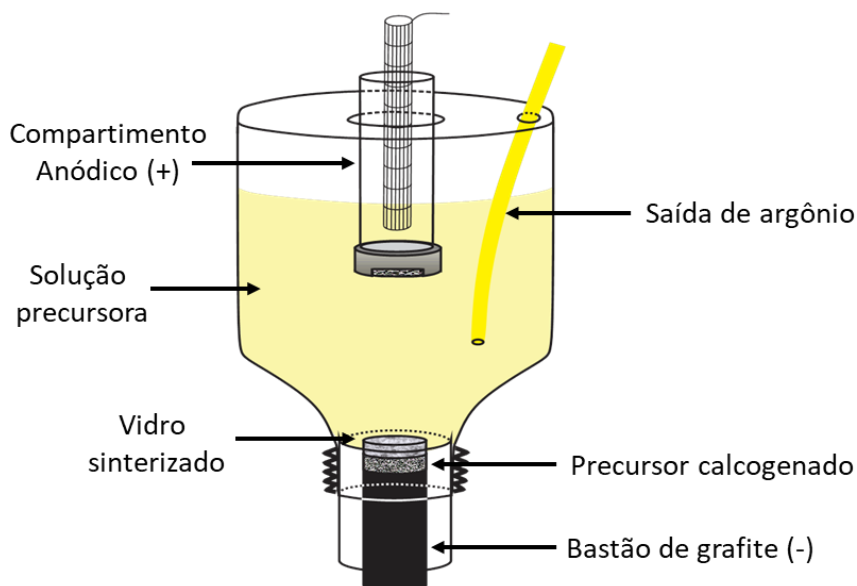
O *quantum dot* CuInS_2 -GSH foi sintetizado no Laboratório de Eletrossíntese (LES) do departamento de Química Fundamental da UFPE, por metodologia eletroquímica, em meio aquoso, estabilizado pela Glutathione (GSH). A síntese foi realizada pelo aluno de mestrado Richardson Robério da Silva do grupo de pesquisa do professor Dr. Marcelo Navarro no LES na UFPE. A montagem da célula de cavidade ilustrada na Figura 26 foi realizada com a introdução do bastão de grafite na cavidade da célula, de modo que foi deixado apenas um pequeno espaço, suficiente para adição do precursor calcogenado e

do vidro sinterizado. Foram adicionados à cavidade 50 mg de $C_{(\text{grafite})}$ e 0,06 mmol de enxofre elementar, homogeneizados previamente, e o sistema foi submetido a prensagem por 10 minutos. A solução contendo os precursores metálicos (Cu^{2+} e In^{3+}) e o estabilizante (GSH) foi preparada a partir da adição das soluções estoque de CuSO_4 e $\text{In}(\text{NO}_3)_3$, na proporção Cu:In igual a 1:8 (75 μL de CuSO_4 e 240 μL de $\text{In}(\text{NO}_3)_3$) em 10 mL de água deionizada seguida da adição de 92,25 mg de GSH (0,3 mmol) e 175,5 mg de NaCl que funcionou como eletrólito. O pH da solução foi fixado em 9,0 usando a solução de NaOH 1,0 mol L^{-1} e o volume completado para 30 mL com água deionizada.

Após a prensagem, a cavidade foi fechada através da introdução do vidro sinterizado, previamente imerso em solução aquosa de NaCl. Em seguida, a parte superior da célula de cavidade foi encaixada e a solução contendo o estabilizante foi adicionada. O compartimento anódico (solução NaOH 1,0 mol L^{-1} + grade inox) foi separado da solução $\text{In}^{3+}/\text{Cu}^{2+}$ por uma membrana Nafion®.

A eletrossíntese ocorreu sob atmosfera inerte de argônio, à corrente constante ($i = -30 \text{ mA}$), durante 500 segundos. Após a reação, os QDs sintetizados foram submetidos a tratamento térmico (refluxo) por 30 minutos.

Figura 26 - Célula de cavidade utilizada nas sínteses dos QDs.



Fonte: Adaptado de Freitas (FREITAS et al., 2017).

Tabela 17 - Parâmetros utilizados na síntese dos QDs.

Condições experimentais	
Massa de enxofre	1,95 mg
Massa de grafite	50 mg
Massa de glutathiona (GSH)	92,25 mg
Massa de NaCl (eletrólito)	175,5 mg
Preparo da solução de CuSO₄	319,22 mg de CuSO ₄ + 20 mL de água deionizada (0,1 mol L ⁻¹)
Preparo da solução de In(NO₃)₃	376,04 mg de In(NO ₃) ₃ + 5 mL de etanol (0,25 mol L ⁻¹)

Fonte: A autora (2019).

3.3.4.2 Estudo do pH ideal para determinação de curcumina

O estudo do melhor pH para a determinação de curcumina utilizando os QDs sintetizados foi realizado com o auxílio de soluções tampão com pH variando entre 2 e 12. Para cada pH foram realizadas duas medidas, uma do branco e outra com solução 4 mg L⁻¹ de curcumina. Para as medidas foram separados 22 tubos Falcon® nos quais foram adicionados, volumes fixos dos QDs e da solução tampão de 0,1 e 0,25 mL, respectivamente, e volumes variados da água deionizada, 0,65 mL para o tubo contendo a soluções do branco e 0,61 mL para o tubo contendo a soluções 4 mg L⁻¹ de curcumina e foi adicionado 0,04 mL de curcumina nos tubos contendo a solução 4 mg L⁻¹ de curcumina, de forma a manter o volume final nos tubos igual a 1 mL.

As soluções tampão empregadas neste estudo foram preparadas a partir das soluções estoque como descrito na Tabela 2.

3.3.4.3 Estudo da composição química da solução tampão a ser empregada da determinação de curcumina

Após o ajuste do pH na determinação de curcumina, foi realizado um estudo para verificar qual a composição química da solução tampão a ser empregada. Foi obtida uma curva para cada uma das 5 soluções tampão empregadas: 1 – Na₂B₄O₇ 0,05 mol L⁻¹/NaOH 0,1 mol L⁻¹; 2 – Na₂HPO₄/NaOH

0,1 mol L⁻¹; 3 – NaHCO₃ 0,05 mol L⁻¹/NaOH 0,1 mol L⁻¹; 4 – Glicocol/NaOH 0,1 mol L⁻¹ e 5 – Na₂CO₃/HCl 0,1 mol L⁻¹. As curvas foram obtidas, com os volumes de soluções mostrados na Tabela 18.

Tabela 18 - Volumes, em mL, usados na construção das curvas analíticas para o estudo da composição química da solução tampão na determinação de curcumina.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7
QDs	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Solução tampão	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
H ₂ O	0,65	0,64	0,63	0,61	0,59	0,57	0,55
Curcumina	0,00	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10
Volume total	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Fonte: A autora (2019).

3.3.4.4 Estudo da concentração da solução tampão a ser empregada na determinação de curcumina

Após a escolha da solução tampão a ser empregada, foi realizado um estudo para verificar a influência da concentração da solução tampão na determinação de curcumina. O estudo foi realizado variando a concentração da solução tampão entre 0,05 e 0,25 mol L⁻¹ (0,05; 0,10; 0,15; 0,20 e 0,25 mol L⁻¹) para uma concentração de 4 mg L⁻¹ de curcumina. Foram separados 10 tubos Falcon e preenchidos com 0,1 mL de QDs, 0,25 mL da solução tampão e para os 5 tubos contendo o branco foram adicionados 0,65 mL de água deionizada e nos 5 tubos com 4 mg L⁻¹ de curcumina foram adicionados 0,61 mL de água deionizada e 0,04 mL de solução padrão de curcumina 100 mg L⁻¹.

3.3.4.5 Estudo do tempo de reação entre os QDs e a Curcumina

Verificado que a curcumina causava um *quenching* na fluorescência do QDs, foram realizadas medidas de fluorescência dos QDs na ausência e na presença de 8 mg L⁻¹ curcumina para verificar o melhor tempo para a reação entre os QDs e a curcumina. Para avaliar o tempo de reação foram adicionados em dois tubos Falcon 0,1 mL dos QDs, 0,25 mL de solução tampão, para o tubo contendo a solução do branco foi adicionado 0,65 mL de água deionizada e para

o tubo contendo 8 mg L^{-1} de curcumina foram adicionados 0,57 mL de água deionizada e 0,08 mL da solução 100 mg L^{-1} de curcumina. Após a adição de curcumina o conteúdo do tubo Falcon foi levado para leitura no espectrofluorímetro onde foram obtidos sinais transientes de variação da intensidade da fluorescência em função do tempo.

3.3.4.6 Estudo do volume da solução contendo QDs a ser empregado da determinação de curcumina

Para avaliar o volume de QDs a ser empregado na determinação de curcumina, foi realizado um estudo variando o volume de QDs entre 0,05 a 0,10 mL e as curvas analíticas obtidas para cada volume foram comparadas. Em 7 tubos Falcon foram adicionados volumes fixos da solução tampão, volumes variados da solução padrão de curcumina 100 mg L^{-1} de forma a obter diferentes concentrações da curcumina conforme ilustrado na Tabela 17 e volumes variados de água deionizada e dos QDs (0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09 e 0,10 mL) mantendo o volume final nos tubos igual a 1 mL.

3.3.4.7 Estudo de possíveis interferentes para a determinação de curcumina

Após estudar as principais variáveis que podem afetar o método proposto, foi realizado o estudo dos possíveis interferentes. O estudo foi realizado utilizando soluções com concentração de curcumina fixa em 4 mg L^{-1} contendo de 0,50 a $3,00 \text{ mg L}^{-1}$ dos possíveis interferentes: manganês, cálcio, ácido ascórbico, albumina e quercetina adicionados separadamente.

3.3.4.8 Teste de adição e recuperação para a determinação de curcumina em amostras de açafrão-da-terra

Para a realização do teste de adição e recuperação foram utilizadas duas amostras de açafrão-da-terra. Inicialmente foram preparadas as soluções com as amostras açafrão, 10 mg de cada amostra de açafrão foi solubilizada em 100 mL de etanol, então o teste foi realizado mediante diluição da amostra 1:20 (v/v). Neste sentido, foram realizadas leituras da amostra diluída (tubo 1) e da amostra

diluída com a adição de curcumina nas concentrações de 2 e 5 mg L⁻¹ (tubos 2 e 3). Para a análise foi construída uma curva analítica para calcular as concentrações das amostras analisadas com e sem adição de curcumina. Os volumes utilizados dos reagentes e amostra para este experimento são mostrados na Tabela 19:

Tabela 19 - Volumes, em mL, de QDs, solução tampão, água, curcumina e amostra, usados no experimento de adição e recuperação na determinação de curcumina.

Tubo	1	2	3
QDs	0,10	0,10	0,10
Tampão	0,25	0,25	0,25
H₂O	0,60	0,58	0,55
Curcumina	0,00	0,02	0,05
Amostra	0,05	0,05	0,05
Volume total	1,00	1,00	1,00

Fonte: A autora (2019).

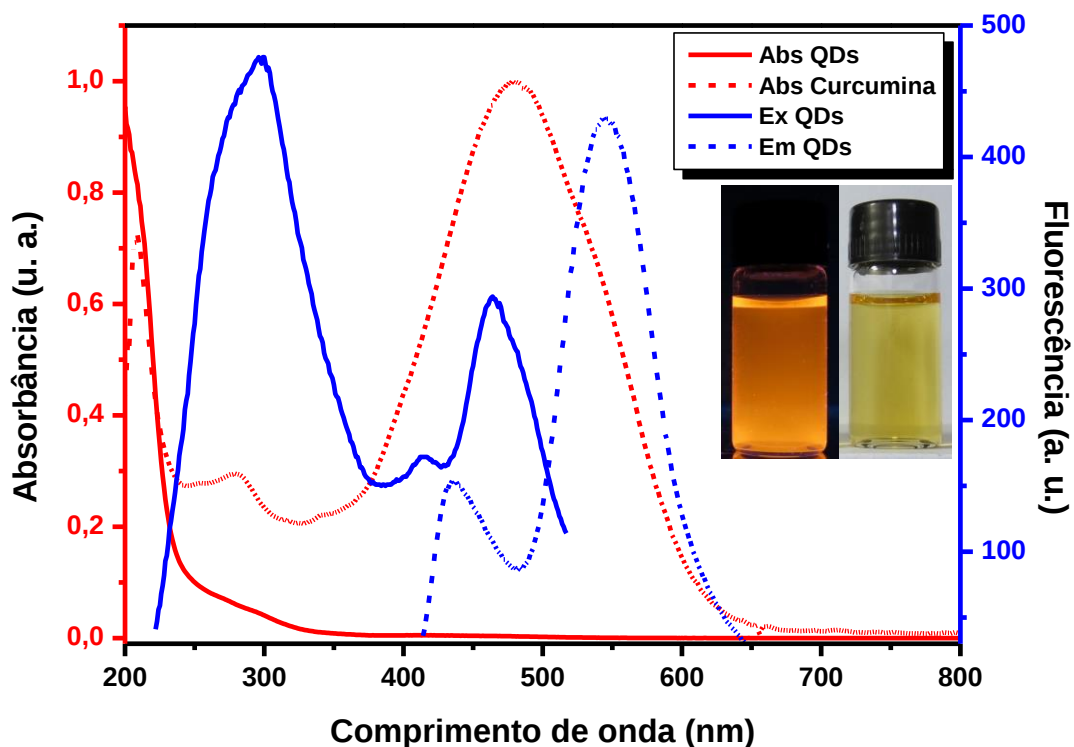
No cálculo dos valores de recuperação de curcumina foi empregada a mesma expressão matemática anteriormente utilizada para o cálculo da recuperação da quercetina.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Síntese dos *quantum dots*

O *quantum dots* sintetizado, $\text{CuInS}_2\text{-GSH}$, apresentou coloração amarela e duas bandas no espectro de excitação em torno de 290 e 460 nm como ilustrado na Figura 27. O comprimento de onda selecionado para excitação dos QDs foi 290 nm, pois nesse comprimento de onda o espectro de emissão de fluorescência apresentava uma máxima intensidade de emissão em 545 nm. No espectro de absorção na região do UV-Vis dos QDs apresentado na Figura 27 não foram encontrados picos de absorção muito claros, o que é coerente com o que é apresentado na literatura para estes QDs.

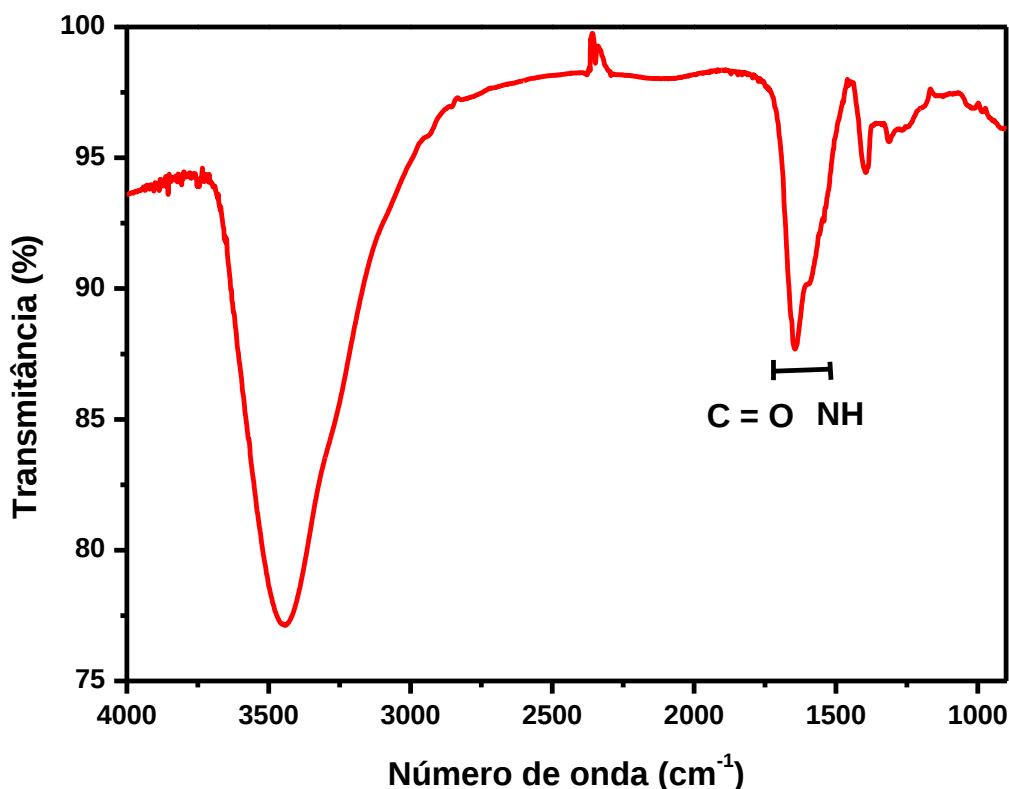
Figura 27 - Sobreposição dos espectros de absorção (—), excitação (—) e emissão com excitação fixada em 290 nm (---) dos QDs e espectro de absorção da curcumina em pH 11 (---), a figura em miniatura representa a imagem dos QDs sob irradiação de luz por uma lâmpada UV-290 nm (esquerda) e sob luz natural (direita).



Fonte: A autora (2019).

Para melhor caracterização foi obtido um espectro de infravermelho dos QDs (Figura 28). Foi possível observar um pico de deformação da ligação NH na região de 1590 cm^{-1} e um pico de estiramento de ligação C=O na região de 1650 cm^{-1} demonstrando que estes grupos, referentes ao estabilizante glutathiona, foram anexados a superfície dos QDs (ARSHAD et al., 2016).

Figura 28 - Espectro de infravermelho dos QDs ternários.



Fonte: A autora (2019).

Os QDs sintetizados são apresentados na foto inserida no gráfico da Figura 27A, consiste em uma solução amarela quando não estão sob irradiação. Sob irradiação de luz ultravioleta (290 nm) é possível observar a emissão de cor laranja.

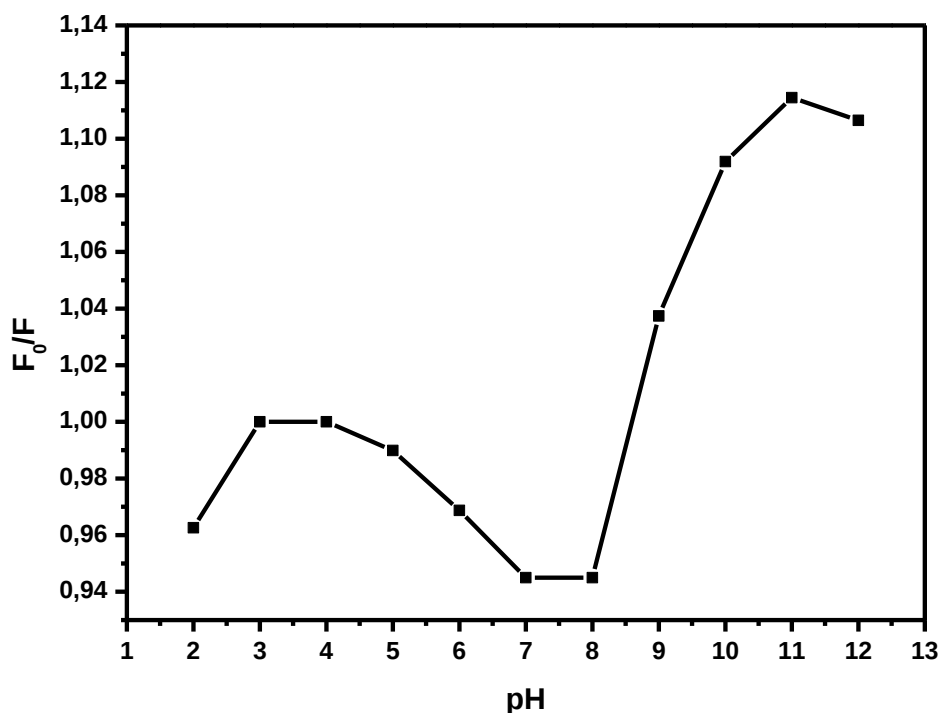
Os QDs sintetizados foram aplicados na análise da curcumina e as melhores condições de reação entre os QDs e a curcumina foram estabelecidas. Foram avaliadas as condições experimentais utilizadas para o procedimento proposto, incluindo pH do meio, natureza e concentração (força iônica) da solução tampão, tempo de reação, volume de QDs e seletividade dos QDs. Os estudos para avaliar o desempenho do ensaio analítico foram realizados

utilizando análise univariada com a finalidade de alcançar a sensibilidade mais elevada, ou seja, o *quenching* máximo da fluorescência.

4.4.2 Estudo do pH ideal para a determinação de curcumina

O pH do meio é um parâmetro importante a ser avaliado em reações que ocorrem em meio aquoso, sendo assim, um estudo para verificar qual o pH ideal para a reação entre os QDs e a curcumina foi realizado. O pH foi variado entre 2 e 12 com o emprego de soluções tampão adequadas a cada pH avaliado, usando solução de curcumina 4 mg L^{-1} . É possível observar na Figura 28 que a interação entre os QDs e a curcumina aumenta com o aumento do pH, sendo maior com pH igual a 11.

Figura 29 - Estudo do pH com valores de F_0/F obtidos para solução de 4 mg L^{-1} de curcumina em função da variação do pH.



Fonte: A autora (2019).

Estudos mostraram que a curcumina é apresentada como uma estrutura beta-dicetona e exibe tautomerismo ceto-enólico. Na sua forma enólica a curcumina apresenta três sítios ácidos, ilustrados na Figura 24, com valores de

pK_a 8,31, 10,0 e 10,2, os quais são desprotonados com o aumento do pH (LEUNG; COLANGELO; KEE, 2008; SALEHI et al., 2019). Assim, essa interação pode ser justificada devido a uma possível ligação de hidrogênio formada entre os grupos hidroxilas desprotonados da curcumina e os grupos amina presentes na superfície dos QDs (ARSHAD et al., 2016).

4.4.3 Estudo da composição química da solução tampão a ser empregada na determinação de curcumina

Foi realizado um estudo variando a composição química da solução tampão pH 11: $Na_2B_4O_7/NaOH$, $Na_2HPO_4/NaOH$, $NaHCO_3/NaOH$, Glicina/ $NaCl/NaOH$ e Na_2CO_3/HCl de acordo com a Tabela 20. Conforme pode ser observado, o melhor valor do coeficiente de correlação linear foi obtido para a solução tampão 2. Embora a sensibilidade (K_{sv}) para esta solução tampão não seja a melhor entre os tampões empregados no estudo, optou-se por escolher esta solução tampão para realizar as demais análises pois a linearidade é um fator determinante para que seja possível a determinação da curcumina através do método proposto. Sendo assim, a solução tampão 2: Glicina/ $NaCl/NaOH$ 0,1 mol L^{-1} foi escolhida.

Tabela 20 - Equação da reta e coeficiente de correlação de acordo com a variação da composição química da solução tampão utilizada na determinação de curcumina.

Tampão	Solução tampão	Equação da reta	R
1	$Na_2B_4O_7$ 0,05 mol L^{-1} / $NaOH$ 0,1mol L^{-1}	$F_0/F = (0,0635 \pm 0,0166) \times C + (0,9589 \pm 0,1008)$	0,8862
2	Glicina/ $NaCl/NaOH$ 0,1 mol L^{-1}	$F_0/F = (0,0399 \pm 0,0018) \times C + (0,9654 \pm 0,0110)$	0,9959
3	Na_2CO_3/HCl 0,1 mol L^{-1}	$F_0/F = (0,0662 \pm 0,0148) \times C + (0,9748 \pm 0,0900)$	0,9127
4	$Na_2HPO_4/NaOH$ 0,1 mol L^{-1}	$F_0/F = (0,1027 \pm 0,0207) \times C + (0,8915 \pm 0,1254)$	0,9278
5	$NaHCO_3$ 0,05 mol L^{-1} / $NaOH$ 0,1 mol L^{-1}	$F_0/F = (0,0894 \pm 0,0156) \times C + (0,9479 \pm 0,0949)$	0,9539

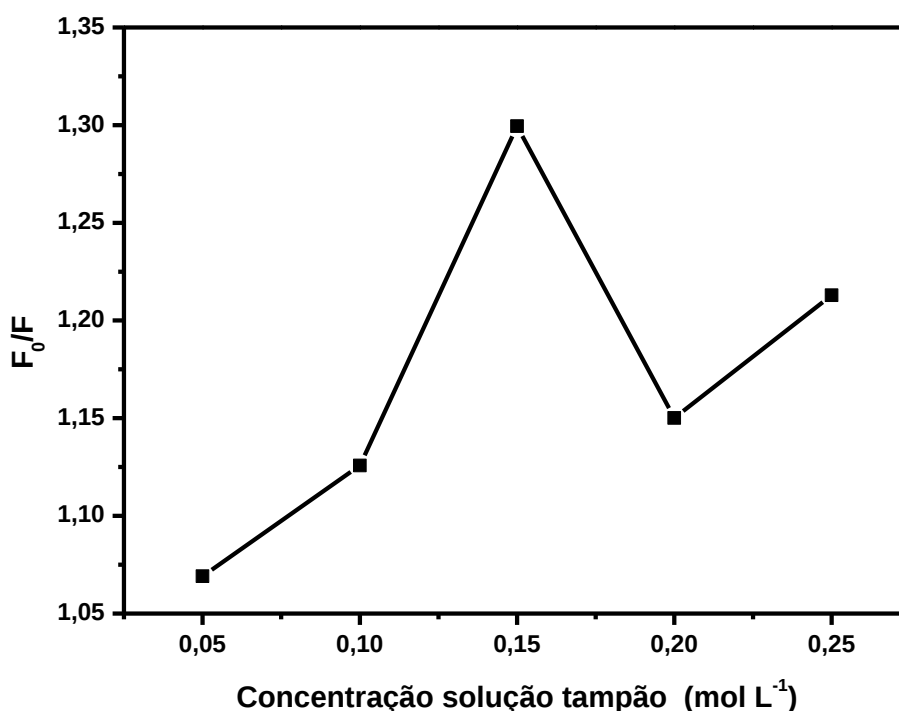
C: concentração de curcumina; F_0/F : Intensidade de fluorescência na ausência (F_0) e presença (F) de curcumina.

Fonte: A autora (2019).

4.4.4 Estudo da concentração da solução tampão a ser empregada na determinação de curcumina

Estabelecidos os parâmetros de pH (pH 11) e da composição da solução (Glicina/NaCl/NaOH) a ser empregada, foi avaliada a melhor concentração da solução tampão empregada na determinação de curcumina, pois a magnitude da interação da curcumina com a superfície dos QDs pode ser influenciada pela força iônica do meio. A avaliação deste parâmetro foi realizada variando a concentração da solução tampão Glicina/NaCl/NaOH entre 0,05 e 0,25 mol L⁻¹. Como mostrado na Figura 30, é possível observar que a maior interação da curcumina com os QDs ocorreu quando a concentração da solução tampão foi de 0,15 mol L⁻¹. Assim sendo, foi empregada a concentração de 0,15 mol L⁻¹, para os estudos posteriores.

Figura 30 - Estudo da concentração da solução tampão (força iônica) a ser empregada na determinação de curcumina.



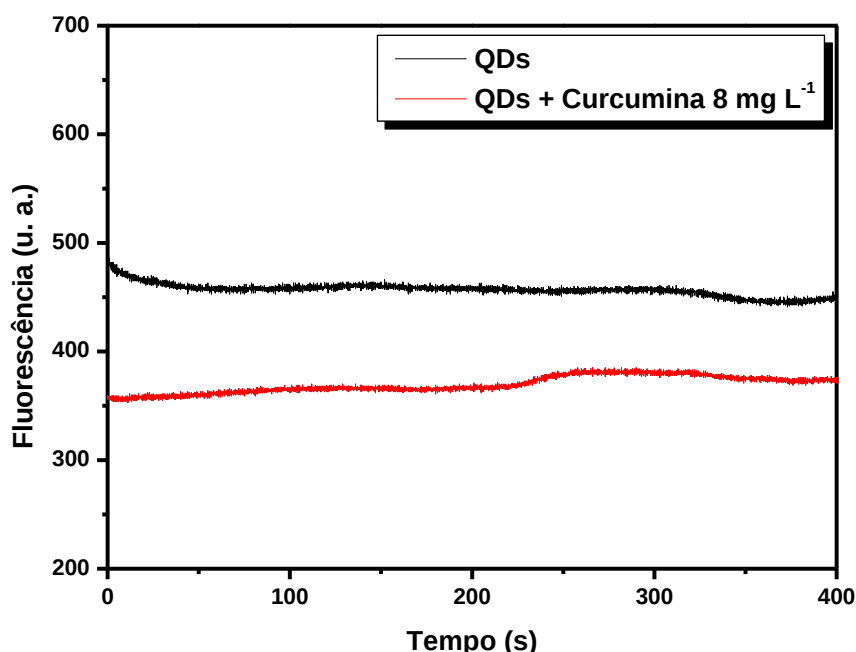
Fonte: A autora (2019).

4.4.5 Estudo do tempo de reação entre os QDs e a curcumina

Como no caso dos CDs, os QDs também podem ter a repetibilidade e exatidão das sucessivas medidas de fluorescência durante as análises das amostras afetada pela estabilidade das soluções de QDs, o que pode influenciar as medidas de fluorescência na determinação de curcumina. Assim é importante conhecer o comportamento da reação ao longo do tempo para conhecer o intervalo de tempo com o qual a reação ocorre.

Na Figura 31 é apresentado o sinal transiente referente ao estudo do tempo de reação dos QDs com a curcumina empregando as condições previamente estudadas. É possível observar que a reação entre os QDs e a curcumina ocorreu de forma rápida. A partir do momento em que a curcumina foi adicionada ao tubo contendo o meio reacional com os QDs, ocorreu o *quenching* e a intensidade do sinal se manteve estável durante toda a análise (400 s), não ocorrendo uma variação significativa no sinal em função do tempo. Sendo assim, a leitura do sinal de fluorescência do meio reacional poderia ser realizada a partir do momento em que a curcumina foi adicionada ao meio, sem a necessidade de um controle rigoroso do tempo.

Figura 31 - Sinais transientes referentes aos QDs e a reação entre os QDs e a curcumina (8 mg L^{-1}), pH 11. O sinal foi monitorado em 545 nm.



Fonte: A autora (2019).

4.4.6 Estudo do volume da solução contendo QDs a ser empregado da determinação de curcumina

Para minimizar o consumo de reagentes foi realizado um estudo para verificar o volume de QDs necessário para a determinação de curcumina através do método proposto. O volume foi variado entre 0,05 e 0,10 mL e foi obtida uma curva analítica para cada volume de QDs empregado. Foi selecionado o volume de 0,10 mL, pois neste volume foi obtido o melhor coeficiente de correlação linear (R) e uma boa sensibilidade (K_{sv}), como demonstrado na Tabela 21. Volumes maiores não foram verificados, pois, o propósito deste estudo é minimizar o consumo de QDs empregados nas análises.

Tabela 21 - Equação da reta e coeficiente de correlação de acordo com a variação do volume de QDs utilizados na determinação de curcumina.

Volume de QD (mL)	Equação da reta	R
0,05	$F_0/F = (0,0453 \pm 0,0071) \times C + (0,9087 \pm 0,0429)$	0,9546
0,06	$F_0/F = (0,0630 \pm 0,0058) \times C + (0,9511 \pm 0,0353)$	0,9834
0,07	$F_0/F = (0,0494 \pm 0,0049) \times C + (0,9389 \pm 0,0296)$	0,9811
0,08	$F_0/F = (0,0842 \pm 0,0070) \times C + (0,9576 \pm 0,0424)$	0,9865
0,09	$F_0/F = (0,0911 \pm 0,0081) \times C + (0,8659 \pm 0,0490)$	0,9846
0,10	$F_0/F = (0,0796 \pm 0,0051) \times C + (0,9377 \pm 0,0310)$	0,9919

C: concentração de curcumina; F_0/F : Intensidade de fluorescência na ausência (F_0) e presença (F) de curcumina.

Fonte: A autora (2019).

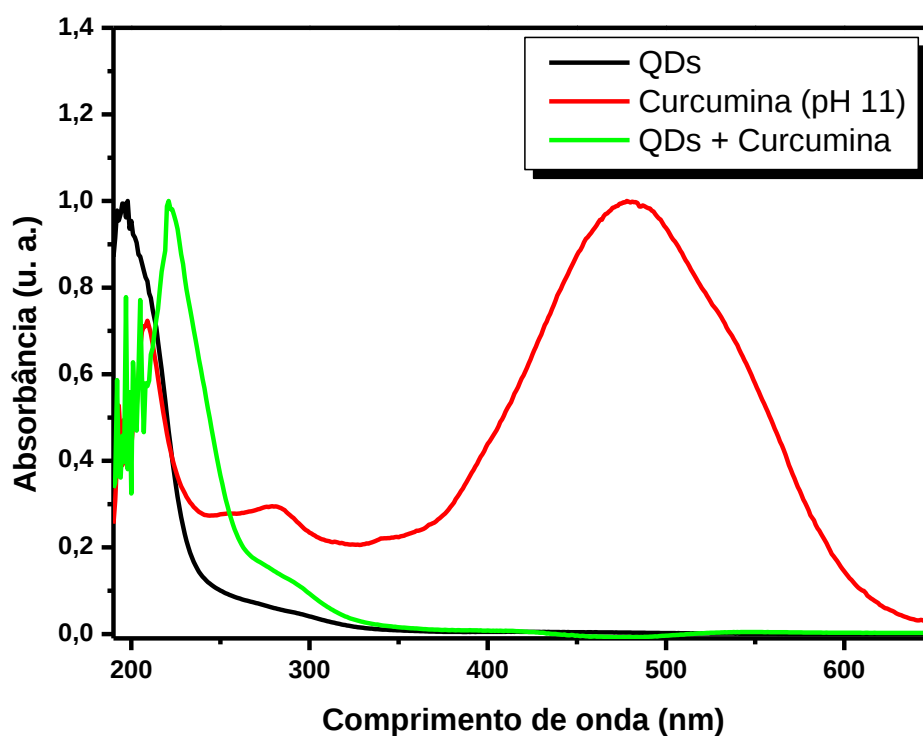
4.4.7 Mecanismo de interação entre os QDs e a curcumina

O *quenching* da fluorescência pode ocorrer através de dois mecanismos, dinâmico (difusional) ou estático (formação de complexo não fluorescente). Para verificar o mecanismo envolvido entre o QDs e a curcumina foi observado o espectro de absorção eletrônica dos QDs na ausência e na presença da curcumina. Nos espectros da Figura 32 foi possível observar que após a adição da curcumina houve um deslocamento do pico de absorção do QDs para comprimentos de onda maiores o que indica a formação de complexo entre o

QDs e a curcumina, podendo presumir que o mecanismo envolvido no *quenching* da fluorescência dos QDs é o estático (SAFARI et al., 2019). É possível observar também que no espectro de absorção da curcumina não aparece banda bem definida em torno de 220 nm, demonstrando que o pico em 220 nm é proveniente da interação entre os QDs e a curcumina e não devido a presença da curcumina na sua forma isolada.

Na Figura 27 foi possível observar que existe uma sobreposição de um dos picos de absorção da curcumina com o espectro de excitação dos QDs o que sugere que o *quenching* da fluorescência dos QDs ocorre devido ao efeito de filtro interno (VAZ et al., 2017). Possivelmente a interação da curcumina com os QDs acontece através de ligação de hidrogênio. Como foi possível observar no FTIR, os QDs possuem grupos carboxílicos e amina em sua superfície, provenientes do estabilizante glutatona que foi empregado na síntese. A curcumina apresenta três sítios ácidos que são desprotonados em meio básico, assim favorecendo a formação das ligações de hidrogênio na superfície dos QDs (ARSHAD et al., 2016; LEUNG; COLANGELO; KEE, 2008).

Figura 32 - Espectros de absorção eletrônica dos QDs, da curcumina e do produto da interação entre os QDs e a curcumina.



Fonte: A autora (2019).

4.4.8 Estudo de interferentes para a determinação de curcumina

A avaliação da seletividade do método proposto para a determinação de curcumina foi realizada através da investigação do efeito de possíveis interferentes que podem afetar a análise nas amostras de açafrão-da-terra. O efeito destas substâncias no *quenching* foi avaliado empregando solução de referência de 4 mg L⁻¹ curcumina contendo diferentes concentrações das espécies potencialmente interferentes, tais como, manganês, cálcio, ácido ascórbico, albumina e quercetina. Foram consideradas como interferentes, as espécies químicas que resultassem em variação de até $\pm 5\%$ com relação ao sinal da solução padrão 4 mg L⁻¹ curcumina.

Na Tabela 22 pode-se observar que as espécies com maior potencial interferente são manganês e cálcio, pois estas substâncias apresentaram um limite de concentração menor que os demais interferentes.

Tabela 22 - Tolerância para os possíveis interferentes estudados na determinação de curcumina.

Substância	Concentração (mg L ⁻¹)	Variação do sinal (%)
Mn²⁺	0,50	+1,19
Ca²⁺	1,50	+3,57
Ácido ascórbico	2,00	-1,19
Albumina	3,00	+1,21
Quercetina	2,00	+4,76

Solução de referência de curcumina 4 mg L⁻¹.

Fonte: A autora (2019).

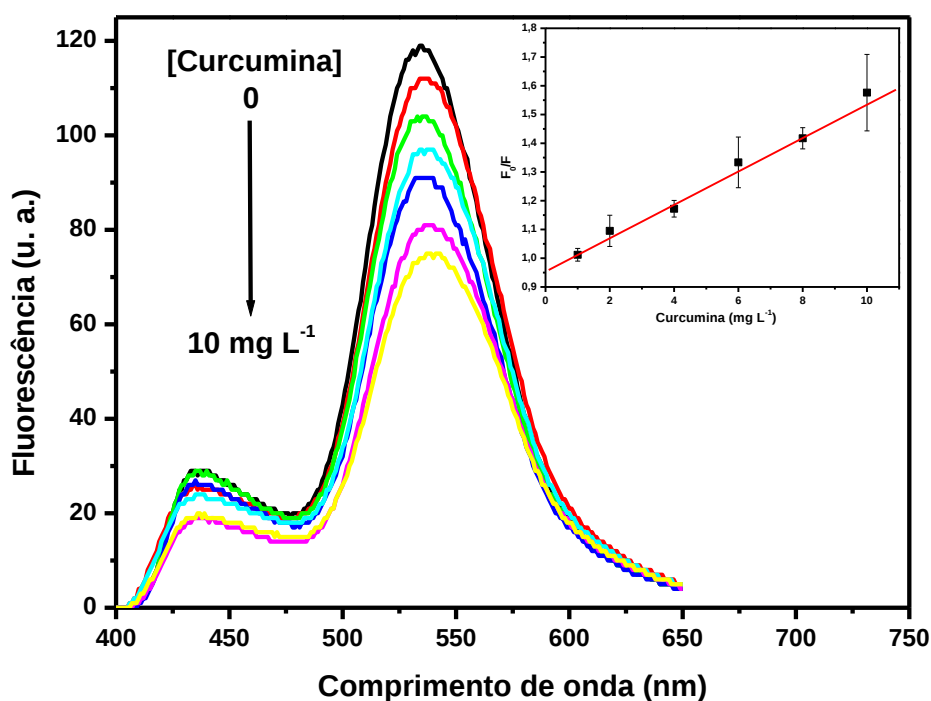
As amostras de curcumina contêm pequenas quantidades de manganês e cálcio, pois o material mineral é responsável por 3 a 7% da composição química da curcumina, desta forma uma solução de amostra de açafrão com concentração de 100 mg L⁻¹, contém 7 mg L⁻¹ de material mineral. Para a análise de curcumina as soluções da amostra foram diluídas 1:20 (v/v), assim, a concentração máxima de material mineral total é de 0,35 mg L⁻¹, não sendo esperado um efeito interferente dos minerais analisados pois a concentração está abaixo da concentração que causa interferência na análise de curcumina. As proteínas são responsáveis por 6 a 8% da composição da curcumina, assim, a concentração máxima de proteínas encontrada em uma solução de açafrão com concentração de 100 mg L⁻¹ é 0,4 mg L⁻¹, não sendo esperado efeito

interferente das proteínas, pois, a proteína empregada no estudo de interferentes, albumina, só causa efeito interferente quando sua concentração é maior que 3 mg L^{-1} . O ácido ascórbico é responsável por 0,005% da composição da curcumina, assim, um efeito interferente não é esperado pois sua concentração é muito baixa (RAVINDRAN; BABU; SIVARAMAN, 2007). O teor de flavonoides não é relatado na literatura.

4.4.9 Figuras de mérito do método proposto para a determinação de curcumina

Na Figura 33 são apresentados os espectros obtidos para as soluções de referência contendo de 0 a 10 mg L^{-1} curcumina após a reação com o QD CuInS_2 -GSH, em pH 11. É possível observar a resposta analítica para as soluções de referência, havendo um aumento no *quenching* da fluorescência em função do aumento da concentração do padrão de curcumina.

Figura 33 - Espectros de fluorescência para determinação de curcumina, soluções de referência contendo, 0 - 10 mg L^{-1} , em destaque a curva analítica para a curcumina.



Fonte: A autora (2019).

Após a otimização dos parâmetros para a análise de curcumina, foi construída uma curva analítica (Figura 33, em destaque) com resposta linear entre 1 e 10 mg L⁻¹ de curcumina. Estimou-se equação linear empregando-se o método dos mínimos quadrados como sendo $F_0/F = (0,0581 \pm 0,0023) \cdot [C] + (0,9533 \pm 0,0097)$, $R = 0,9969$ (F_0/F representa o sinal analítico; F_0 = intensidade de fluorescência para a solução do branco; F = intensidade de fluorescência para as soluções de referência de curcumina) e $[C]$ é a concentração da curcumina em mg L⁻¹), à temperatura ambiente, empregando solução tampão Glicina/NaCl/NaOH e os parâmetros estabelecidos na otimização do procedimento proposto, como pode ser observado na Tabela 23.

Tabela 23 - Parâmetros estabelecidos após a otimização do procedimento proposto para determinação de curcumina.

Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
pH	2 – 12	11
Volume dos QDs (mL)	0,05 – 0,10	0,10
Concentração da solução tampão (mol L ⁻¹)	0,05 – 0,25	0,15

Fonte: A autora (2019).

O limite de detecção para a análise de curcumina foi de 0,17 mg L⁻¹ com um RSD de 0,1% ($n = 3$, 4 mg L⁻¹ curcumina). No teste de adição e recuperação foi possível obter valores de recuperação para as amostras de açafrão-da-terra analisadas entre 94 e 107%, demonstrado que não houve efeito de matriz. Como exposto anteriormente, este fenômeno pode ser descrito pela equação de Stern-Volmer (Equação 5), demonstrando a dependência linear de F_0/F com a concentração de curcumina, sendo a constante de Stern-Volmer (K_{SV}) estabelecida em 0,0581 L mg⁻¹ (KEIZER, 1983; HU et al., 2019). Assim, pode-se afirmar que o método proposto para a análise de curcumina apresenta viabilidade para aplicações analíticas.

O procedimento proposto foi comparado com outros previamente reportados na literatura para a determinação de curcumina, como demonstrado na Tabela 24. Na literatura existem métodos com detecção por fluorescência para a determinação de curcumina, porém nestes métodos é observada a necessidade de um pré-tratamento de amostra, passando por etapas como

aquecimento e centrifugação, demandando um maior tempo para as análises (PETROVA et al., 2016; LIU et al., 2018; HU et al., 2019). Na análise empregando CLAE-UV, foram necessárias etapas de aquecimento, extração e uso de solventes como clorofórmio e metanol o que tornava o método demorado, com maior custo e não sustentável (SYED et al., 2015).

O presente trabalho possui vantagens como economia de reagentes demonstrando ser um método sustentável, as amostras não necessitam de etapas de aquecimento e extração, sendo apenas solubilizadas em etanol e filtradas antes das análises o que permite que as medidas sejam realizadas de forma simples e rápida.

Tabela 24 - Características analíticas de metodologias empregadas na determinação de curcumina.

Método de detecção	Faixa linear (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Limite de detecção (mg L ⁻¹)	Amostra	Referências
Fluorescência	0,37 – 3,68	1,6 – 1,8	0,11	Suplementos e temperos	(PETROVA et al., 2016)
Fluorescência	0,18 – 7,3	0,1 – 5,4	0,02	Água e alimentos	(LIU et al., 2018)
Fluorescência	0,04 – 12,9	< 5,61	0,014	Alimentos	(HU et al., 2019)
CLAE-UV	2,0 – 200,0	2,0	0,3	Extrato de Cúrcuma	(SYED et al., 2015)
Fluorescência	1,0 – 10,0	0,1	0,17	Açafrão-da-terra	Presente trabalho

CLAE-UV: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Ultravioleta; CCFAE: Cromatografia de Camada Fina em Alta Eficiência; DPR: desvio padrão relativo.

Fonte: A autora (2019).

4.4.10 Teste de adição e recuperação para a determinação de curcumina em amostras de açafrão-da-terra

O teste de adição e recuperação foi realizado para duas amostras de açafrão-da-terra adquiridas no comércio local da região metropolitana do Recife. Para a análise, a solução, previamente preparada da amostra, foi diluída. As diluições foram realizadas para que o teor de curcumina estivesse dentro da faixa de trabalho do método proposto, que é de 1,0 a 10,0 mg L⁻¹.

O resultado para o teste de adição e recuperação foi realizado mediante diluição da amostra na proporção de 1:20 (v/v). O método de adição e recuperação está entre os procedimentos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método (RIBANI et al., 2004). Na análise realizada, como demonstrado na Tabela 25, foram obtidos valores de recuperação que variaram de 94 a 107% para adição de em dois níveis de curcumina, 2 e 5 mg L⁻¹, demonstrando que não houve efeito de matriz na determinação de curcumina nas amostras de açafrão analisadas.

Tabela 25 - Resultados obtidos para o teste de adição e recuperação nas amostras de açafrões analisadas.

Amostra	Adicionado (mg L⁻¹)	Encontrado (mg L⁻¹)	Recuperação (%)
	0	0,87*	-
Açafrão-da-terra 1	2	3,07	107
	5	5,62	96
	0	2,83	-
Açafrão-da-terra 2	2	4,55	94
	5	7,78	99

*Valor detectado.

Fonte: A autora (2019).

4 CONCLUSÃO

Os CDs sintetizados a partir do citrato de sódio foram aplicados na determinação de quercetina em amostras de chás e cervejas. As medidas foram realizadas nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 380 e 450 nm, respectivamente, o pH 11 (solução tampão $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$ 0,1 mol L^{-1}) foi selecionado e o tempo de interação entre os CDs e a quercetina foi de 30 s. A análise foi realizada com um baixo consumo de dispersão de CDs (0,08 mL) devido à alta fluorescência dos CDs. O mecanismo de interação entre os CDs e a quercetina ocorreu devido ao efeito de filtro interno, como também devido ao estado fundamental do composto formado. Foi verificado, através da variação da temperatura, dos gráficos de absorção e do tempo de vida de fluorescência dos CDs na presença e na ausência de quercetina que o *quenching* da fluorescência envolvido foi estático. Espécies potencialmente interferentes foram avaliadas, apenas catequina, kaempferol e miricetina apresentaram-se como possíveis interferentes, no entanto, ao diluir as amostras de chás e cervejas, o teor destas substâncias é menor que aqueles interferentes. O método apresentou um intervalo linear de 1 a 10 mg L^{-1} , com um limite de detecção estimado em 0,85 mg L^{-1} , com recuperações entre 80 e 107% para as amostras de chás e cervejas, demonstrando a precisão do método e que não houve efeito de matriz na determinação de quercetina nas amostras analisadas, sendo um método simples, rápido, seletivo e versátil podendo ser aplicado em diferentes amostras.

O QD ternário ($\text{CuInS}_2\text{-GSH}$) foi empregado na determinação de curcumina nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 290 nm e 545 nm, respectivamente, pH 11 (Glicina/ NaCl/NaOH 0,1 mol L^{-1}), 0,10 mL QD. O tempo de interação entre os QDs e a curcumina também foi rápido, a estabilidade da reação permitia que as medidas no espectrofluorímetro fossem realizadas sem a necessidade de controle do tempo. O mecanismo de interação entre os QDs e a curcumina foi avaliado analisando os espectros de absorção dos QDs na presença e ausência da curcumina, sendo o *quenching* da fluorescência estático. Após a otimização dos parâmetros analíticos o método apresentou uma faixa linear de 1 a 10 mg L^{-1} , com um limite de detecção estimado em 0,17 mg L^{-1} (pH 11), com recuperações entre 94 e 107% para as amostras de açafrão-da-

terra, demonstrando a exatidão do método e que não houve efeito de matriz na determinação de curcumina nas amostras analisadas, sendo um método simples e rápido.

REFERÊNCIAS

- ABE-MATSUMOTO, L. T.; SAMPAIO, G. R.; BASTOS, D. H. M. Suplementos vitamínicos e/ou minerais: regulamentação, consumo e implicações à saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 31, n. 7, p. 1371–1380, 2015.
- ALIVISATOS, A. P. Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 95, p. 13226–13239, 1996.
- ALLOUCHE, J. Synthesis of Organic and Bioorganic Nanoparticles: An Overview of the Preparation Methods. In: BRAYNER, R. (Ed.). . **Nanomaterials: A Danger or a Promise?: A Chemical and Biological Perspective**. Pau: [s.n.]. p. 27–57.
- ALTUNAY, N.; ELIK, A.; GÜRKAN, R. Preparation and application of alcohol based deep eutectic solvents for extraction of curcumin on food samples prior to its spectrophotometric determination. **Food Chemistry**, v. 310, 2020.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202, 2010.
- ANSARI, M. J. et al. Stability-indicating HPTLC determination of curcumin in bulk drug and pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 1–2, p. 132–138, 2005.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5ª ed. Viçosa: UFV, 2011.
- ARSHAD, A. et al. Aqueous synthesis of tunable fluorescent, semiconductor CuInS₂ quantum dots for bioimaging. **Arabian Journal of Chemistry**, p. 4–11, 2016.
- ASADIAN, E.; GHALKHANI, M.; SHAHROKHIAN, S. Electrochemical sensing based on carbon nanoparticle: A review. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 293, p. 183, 2019.
- ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de Química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2012.
- BABU, A.; MOHAMMED, S.; HARIKUMAR, K. B. Antioxidant Properties of Curcumin: Impact on Neurological Disorders. In: **Curcumin for Neurological and Psychiatric Disorders**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 155–167.
- BACCARO, A. L. B.; GUTZ, I. G. R. Fotoeletrocatalise em semicondutores: dos princípios básicos até sua conformação à nanoescala. **Química Nova**, v. 41, n. 3, p. 326–339, 2018.
- BAKER, S. N.; BAKER, G. A. Luminescent carbon nanodots: emergent nanolights. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, n. 38, p. 6726, 2010.
- BARUA, S.; GOGOI, S.; KHAN, R. Fluorescence biosensor based on gold-carbon dot probe for efficient detection of cholesterol. **Synthetic Metals**, v. 244, p. 92, 2018.

BEHBAHANI, E. S.; GHAEDI, M.; ASFARAM, A. One-pot synthesis of magnetic lipid nanoparticles as an efficient sorbent for curcumin determination on magnetic dispersive solid-extraction system. **European Polymer Journal**, v. 118, p. 661, 2019.

BEHLING, E. B. et al. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 15, n. 3, p. 285, 2004.

BETZ, J. M.; BROWN, P. N.; ROMAN, M. C. Accuracy, precision, and reliability of chemical measurements in natural products research. **Fitoterapia**, v. 82, p. 44, 2011.

BHUIYA, S. et al. Inhibitory effects of the dietary flavonoid quercetin on the enzyme activity of zinc(II)-dependent yeast alcohol dehydrogenase: Spectroscopic and molecular docking studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 177, 2017.

BONILLA, J. C. et al. Applications of quantum dots in food science and biology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 53, p. 75, 2019.

BOURLINOS, A. B. et al. Surface functionalized carbogenic quantum dots. **Small**, v. 4, n. 4, p. 455–458, 2008.

BOVERHOF, D. R. et al. Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 137–150, 2015.

BRISCOE, J. et al. Biomass-derived carbon quantum dot sensitizers for solid-state nanostructured solar cells. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 54, n. 15, p. 4463, 2015.

CÂNDIDO, L. M. B. **Documentos 85 - Alimentos funcionais e nutracêuticos - O estado da arte alimentos funcionais e nutracêuticos no Brasil**. Curitiba: Embrapa, 2002.

CAO, G. **Nanostructures & nanomaterials: synthesis, properties & applications**. Danvers: Imperial College Press, 2004.

CHAU, C.; WU, S.; YEN, G. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 269–280, 2007.

CHEN, C.; ZHOU, J.; JI, C. Quercetin: A potential drug to reverse multidrug resistance. **Life Sciences**, v. 87, n. 11–12, p. 333–338, 2010.

CHEN, H. et al. Electrodeposition of gold nanoparticles on Cu-based metal-organic framework for the electrochemical detection of nitrite. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 286, p. 401, 2019a.

CHEN, J. et al. Curcumin and its promise as an anticancer drug: An analysis of its anticancer and antifungal effects in cancer and associated complications from invasive fungal infections. **European Journal of Pharmacology**, v. 772, p. 33, 2016.

CHEN, X. et al. Multifunctional sensing applications of biocompatible N-doped

carbon dots as pH and Fe³⁺ sensors. **Microchemical Journal**, v. 149, n. March, p. 1–7, 2019b.

CHENG, Z. et al. Multifunctional nanoparticles: cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities. **Science (New York, N.Y.)**, v. 338, n. 6109, p. 903–10, 2012.

CORTACERO-RAMÍREZ, S. et al. Simultaneous determination of multiple constituents in real beer samples of different origins by capillary zone electrophoresis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 380, n. 5–6, p. 831, 2004.

D'AMORA, M.; GIORDANI, S. Carbon Nanomaterials for Nanomedicine. In: **Smart Nanoparticles for Biomedicine: Micro and Nano Technologies**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. p. 103–113.

DAGER, A. et al. Synthesis and characterization of Mono-disperse Carbon Quantum Dots from Fennel Seeds: Photoluminescence analysis using Machine Learning. **Nature: Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

DAHMAN, Y. et al. Nanosensors. In: **Nanotechnology and Functional Materials for Engineers: Micro and Nano Technologies**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. p. 67–91.

DE ANDRADE, M. F. et al. Multicommuted Flow Analysis Procedure for Total Polyphenols Determination in Wines Employing Chemiluminescence Detection. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 5, p. 967–976, 2014.

DE PAULA, N. et al. 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.

DE SOUZA, G. C. S. et al. Employment of electrochemically synthesized TGA-CdSe quantum dots for Cr³⁺ determination in vitamin supplements. **Talanta**, v. 144, p. 986–991, 2015.

DESCHNER, E. E. et al. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 7, p. 1193, 1991.

DISSANAYAKE, N. M. et al. Highly sensitive plasmonic metal nanoparticle-based sensors for the detection of organo phosphorus pesticides. **Talanta**, v. 200, p. 218, 2019.

DRIDI, F. et al. Nanomaterial-based electrochemical biosensors for food safety and quality assessment. In: GRUMEZESCU, A. M. (Ed.). **Nanobiosensors**. [s.l.] Elsevier In, 2017. p. 167–204.

DWIECKI, K. et al. Mechanism study of selected phenolic compounds determination using β -cyclodextrin-coated CdSe/ZnS quantum dots. **Journal of Luminescence**, v. 192, p. 1119–1126, 2017.

EALIAS, A. M.; SARAVANAKUMAR, M. P. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 263, n. 3, 2017.

ÉFROS, A. L.; ÉFROS, A. L. Interband Absorption of Light in Semiconductor

Spheres. **Soviet Physics Semiconductors USSR**, v. 16, p. 772–775, 1982.

EKIMOV, A. I.; ONUSHCHENKO, A. A. Quantum size effect in three-dimensional microscopic semiconductor crystals. **Soviet Journal of Experimental and Theoretical Physics Letters**, v. 34, p. 345, 1981.

ELEAZU, C. et al. The role of dietary polyphenols in the management of erectile dysfunction-Mechanisms of action. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 644, 2017.

FAVIER, I.; PLA, D.; GÓMEZ, M. Metal-based nanoparticles dispersed in glycerol: An efficient approach for catalysis. **Catalysis Today**, v. 310, p. 98, 2018.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61, 1997.

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

FONTES, A.; SANTOS, B. S. **Quantum Dots: Applications in Biology**. Second ed. [s.l.] Springer Protocols, 2014.

FREITAS, D. V. et al. Toward greener electrochemical synthesis of composition-tunable luminescent CdX-based (X = Te, Se, S) quantum dots for bioimaging cancer cells. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 250, p. 233–243, 2017.

GUO, L.-P.; ZHANG, Y.; LI, W.-C. Sustainable microalgae for the simultaneous synthesis of carbon quantum dots cellular imaging and porous carbon for CO₂ capture. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 493, p. 257, 2017.

GUO, Y. et al. Hydrothermal synthesis of highly fluorescent carbon nanoparticles from sodium citrate and their use for the detection of mercury ions. **Carbon**, v. 52, p. 583, 2013.

HU, Q. et al. Nitrogen and chlorine dual-doped carbon nanodots for determination of curcumin in food matrix via inner filter effect. **Food Chemistry**, v. 280, p. 195, 2019.

HU, R. W. et al. Curcumin in hepatobiliary disease: pharmacotherapeutic properties and emerging potential clinical applications. **Annals of hepatology**, v. 16, n. 6, p. 835, 2017.

HU, Y.; FENG, T.; LI, G. A novel solid fluorescence method for the fast determination of quercetin in biological samples based on the quercetin – Al(III) complex imprinted polymer. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 118, p. 921–928, 2014.

HUANG, S. et al. Graphene quantum dots as on-off-on fluorescent probes for chromium(VI) and ascorbic acid. **Microchimica Acta**, v. 182, n. 9–10, p. 1723–1731, 2015.

ISO. **International Organization for Standardization - ISO/TS 80004-2:2008, Technical Specification: Nanotechnologies - Terminology and definitions for nano-objects - Nanoparticle, nanofibre and nanoplate**, 2008.

JAISWAL, A.; GHOSH, S. S.; CHATTOPADHYAY, A. One step synthesis of C-dots by microwave mediated caramelization of poly(ethylene glycol). **Chemical Communications**, v. 48, p. 407–409, 2012.

JANDERA, P. et al. RP-HPLC analysis of phenolic compounds and flavonoids in beverages and plant extracts using a CoulArray detector. **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 9–10, p. 1005, 2005.

JEEVANANDAM, J. et al. Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 9, n. 1, p. 1050–1074, 2018.

JESZKA-SKOWRON, M.; KRAWCZYK, M.; ZGOŁA-GRZESKOWIAK, A. Determination of antioxidant activity, rutin, quercetin, phenolic acids and trace elements in tea infusions: Influence of citric acid addition on extraction of metals. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 40, p. 70–77, 2015.

JIA, X. et al. Multi-functionalized hyaluronic acid nanogels crosslinked with carbon dots as dual receptor-mediated targeting tumor theranostics. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 391, 2016.

KARMAKAR, A.; MALLICK. Antioxidant flavone functionalized and biocompatible metal nanoparticles: Exploring their efficacy as cell imaging agents. **Nano-Structures & Nano-Objects**, v. 18, p. 1–13, 2019.

KEIZER, J. Nonlinear Fluorescence Quenching and the Origin of Positive Curvature in Stern-Volmer Plots. **Journal of the American Chemical Society**, v. 105, n. 5, p. 1494–1498, 1983.

KELLY, M. R. et al. Disparate effects of similar phenolic phytochemicals as inhibitors of oxidative damage to cellular DNA. **Mutation Research - DNA Repair**, v. 485, n. 4, p. 309–318, 2001.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, 2017.

KRAFT, J. C. et al. Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 1, p. 29–52, 2014.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3rd ed. ed. Baltimore: Springer, 2006.

LELLI, D. et al. Curcumin use in pulmonary diseases: State of the art and future perspectives. **Pharmacological Research**, v. 115, p. 133–148, 2017.

LEUNG, M. H. M.; COLANGELO, H.; KEE, T. W. Encapsulation of curcumin in cationic micelles suppresses alkaline hydrolysis. **Langmuir**, v. 24, n. 11, p. 5672–5675, 2008.

LI, S. et al. I-III-VI chalcogenide semiconductor nanocrystals: Synthesis, properties, and applications. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 39, n. 4, p. 590, 2018.

LIM, S. Y.; SHEN, W.; GAO, Z. Carbon quantum dots and their applications. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 1, p. 362, 2015.

LIMA, K. M. G. et al. Sensores ópticos com detecção no infravermelho próximo e médio. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1635–1643, 2009.

LIU, L. et al. Sensitive determination of kaempferol using carbon dots as a fluorescence probe. **Talanta**, v. 144, p. 390, 2015.

LIU, Q. et al. A novel electrochemiluminescence biosensor for the detection of microRNAs based on a DNA functionalized nitrogen doped carbon quantum dots as signal enhancers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 92, p. 273, 2017.

LIU, R. et al. An aqueous route to multicolor photoluminescent carbon dots using silica spheres as carriers. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 48, n. 25, p. 4598, 2009.

LIU, Y. et al. Nitrogen and phosphorus dual-doped carbon dots as a label-free sensor for Curcumin determination in real sample and cellular imaging. **Talanta**, v. 183, n. December 2017, p. 61–69, 2018.

LÓPEZ-GUTIÉRREZ, N. et al. Determination of poluphenols in grape-based nutraceutical products using high resolution mass spectrometry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 249, 2016.

MA, X. et al. An aptamer-based electrochemical biosensor for the detection of Salmonella. **Journal of Microbiological Methods**, v. 98, n. 1, p. 94–98, 2014.

MARCHI, J. P. et al. Curcuma Longa L., o açafrão da terra, e seus benefícios medicinais. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 20, n. 3, p. 189–194, 2016.

MASTERI-FARAHANI, M.; KHADEMABBASI, K.; MOLLATAYEFEH, N. A selective morphine nanosensor derived from functionalized CdS quantum dots. **Materials Letters**, v. 228, p. 68–71, 2018.

MAY, B. M. M.; PARANI, S.; OLUWAFEMI, O. S. Detection of ascorbic acid using green synthesized AgInS₂ quantum dots. **Materials Letters**, v. 236, p. 432–435, 2019.

MAZUR, F. et al. Liposomes and lipid bilayers in biosensors. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 249, p. 88–99, 2017.

MEENU, M. et al. Green method for determination of phenolic compounds in mung bean (*Vigna radiata* L.) based on near-infrared spectroscopy and chemometrics. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 12, p. 2520, 2016.

MEMON, A. F. et al. Simultaneous determination of quercetin, rutin, naringin, and naringenin in different fruits by capillary zone electrophoresis. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 1, p. 83, 2017.

MENDONÇA, L. M. et al. Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of curcumin in PC12 cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 675, n. 1–2, p. 29–34, 2009.

MIRTCHEV, P. et al. Solution phase synthesis of carbon quantum dots as sensitizers for nanocrystalline TiO₂ solar cells. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 1265, 2012.

MIYAZAKI, C. M.; RIUL JR, A. Low-Dimensional Systems: Nanoparticles. In: DA RÓZ, A. L. et al. (Eds.). . **Nanostructures**. Oxford: Matthew Deans, 2017. p. 126–145.

MOLINELLI, A.; WEISS, R.; MIZAIKOFF, B. Advanced solid phase extraction using molecularly imprinted polymers for the determination of quercetin in red wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 1804, 2002.

NAMDARI, P.; NEGAHDARI, B.; EATEMADI, A. Synthesis, properties and biomedical applications of carbon-based quantum dots: An updated review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, n. 88, p. 209, 2017.

NASIRZADEH, K.; NAZARIAN, S.; HAYAT, S. M. G. Inorganic nanomaterials: A brief overview of the applications and developments in sensing and drug delivery. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, v. 3, n. 2, p. 395–402, 2016.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418, 2001.

PALMQVIST, N. G. M. **Nanoparticles: Case studies of their synthesis, properties and biological interaction**. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 2017.

PAREEK, S. et al. Curcumin: An Antiinflammatory Compound From Turmeric and Its Role in Alleviating Arthritis. In: **Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases**. Second ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 425–435.

PARIS, J. L.; VALLET-REGÍ, M. Nanostructures for imaging, medical diagnostics and therapy. In: BARHOUM, A.; MAKHLOUF, A. S. H. (Eds.). . **Fundamentals of Nanoparticles**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. p. 1.

PATTADAR, D. K. et al. Anodic stripping electrochemical analysis of metal nanoparticles. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 13, p. 147–156, 2019.

PAWAR, R. S.; UPADHAYA, P. G.; PATRAVALE, V. B. Quantum Dots: Novel Realm in Biomedical and Pharmaceutical Industry. In: **Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications: Micro and Nano Technologies**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 621–637.

PEDZIWIATR-WERBICKA, E. et al. Dendrimers and hyperbranched structures for biomedical applications. **European Polymer Journal**, 2019.

PEJIC, N. et al. Direct spectrophotometric determination of quercetin in the presence of ascorbic acid. **IL Farmaco**, v. 59, n. 1, p. 21, 2004.

PENG, H.; TRAVAS-SEJDIC, J. Simple aqueous solution route to luminescent carbonogenic dots from carbohydrates. **Chemistry of Materials**, v. 21, n. 23, p. 5563, 2009.

PETROVA, A. et al. Determination of curcumin in biologically active supplements and food spices using a mesofluidic platform with fluorescence detection. **Talanta**, v. 159, p. 300, 2016.

PRASONGSIDH, B. C.; SKURRAY, G. R. Capillary electrophoresis analysis of

trans- and cis-reveratrol, quercetin, catechin and gallic acid in wine. **Food Chemistry**, v. 62, p. 355, 1998.

RABOUW, F. T.; DONEGA, C. M. Excited-State Dynamics in Colloidal Semiconductor Nanocrystals. **Topics in Current Chemistry**, v. 374, n. 5, p. 58, 2016.

RAHMAN, A. A Review on Semiconductors Including Applications and Temperature Effects in Semiconductors. **American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences**, v. 7, n. 1, p. 50–70, 2015.

RAI, M. et al. Bioactivity of noble metal nanoparticles decorated with biopolymers and their application in drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, p. 159, 2015.

RAVINDRAN, P. N.; BABU, K. N.; SIVARAMAN, K. **Turmeric: The Genus *Cúrcuma***. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2007. v. 33

REED, M. A. et al. Observation of discrete electronic states in a zero-dimensional semiconductor nanostructure. **Physical Review Letters**, v. 60, n. 6, p. 535, 1988.

REICHARDT, C. Empirical parameters of the polarity of solvent. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 4, n. 1, p. 29–40, 1965.

RESHMA, V. G.; MOHANAN, P. V. Quantum dots: Applications and safety consequences. **Journal of Luminescence**, v. 205, p. 287–298, 2019.

REZAZADEH, F. et al. A Quercetin Biosensor Based on Chitosan-Entrapped Carbon Nanotube Paste Electrode Coated with DNA. **Food Composition and Additives**, v. 98, n. 5, p. 1375, 2015.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RODRÍGUES-DELGADO, M. Á. et al. Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines. **Food Chemistry**, v. 78, p. 523, 2002.

ROMERO, G.; MOYA, S. E. Synthesis of Organic Nanoparticles. In: FUENTE, J. M.; GRAZU, V. (Eds.). **Nanobiotechnology: Inorganic Nanoparticles vs Organic Nanoparticles**. 1. ed. [s.l.] Elsevier LTD., 2012. v. 4p. 115–141.

ROSSETTI, R.; NAKAHARA, S.; BRUS, L. E. Quantum size effects in the redox potentials, resonance Raman spectra, and electronic spectra of CdS crystallites in aqueous solution. **The Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 1086–1088, 1983.

SAFARI, M. et al. Facile aqueous synthesis of Ni-doped CdTe quantum dots as fluorescent probes for detecting pyrazinamide in plasma. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 293–299, 2019.

SALEHI, B. et al. The therapeutic potential curcumin: A review of clinical trials. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 163, p. 527–545, 2019.

SANTINI, A.; TENORE, G. C.; NOVELLINO, E. Nutraceuticals: A paradigm of proactive medicine. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 53, 2017.

SARDELLA, D.; GATT, R.; VALDRAMIDIS, V. P. Metal nanoparticles for controlling fungal proliferation: quantitative analysis and applications. **Current Opinion in Food Science**, v. 30, p. 49, 2019.

SARSWAT, P. K.; FREE, M. L. Light emitting diodes based on carbon dots derived from food, beverage, and combustion wastes. **Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP**, v. 17, n. 41, p. 27642, 2015.

SELEEM, D.; PARDI, V.; MURATA, R. M. Archives of oral biology review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti- *Candida albicans* activity in vitro. **Archives of Oral Biology**, v. 76, p. 76, 2017.

SHAH, S. N. A.; LIN, J. M. Recent advances in chemiluminescence based on carbonaceous dots. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 241, p. 24, 2017.

SHI, W. et al. Carbon nanodots as peroxidase mimetics and their applications to glucose detection. **Chemical Communications**, v. 47, n. 23, p. 6695, 2011.

SHI, X. et al. Review on carbon dots in food safety applications. **Talanta**, v. 194, p. 809, 2019a.

SHI, Y. et al. Facile synthesis of gadolinium (III) chelates functionalized carbon quantum dots for fluorescence and magnetic resonance dual-modal bioimaging. **Carbon**, v. 93, p. 742, 2015.

SHI, Y. et al. Competitive method for fluorescent dopamine detection on cerebrospinal fluid based on the peroxidase-like activity of ficin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 209, p. 8, 2019b.

SILVA, F. O. et al. O estado da arte da síntese de semicondutores nanocristalinos coloidais. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1933–1939, 2010.

SIMÕES, F. R.; TAKEDA, H. H. Basic Concepts and Principles. In: DA RÓZ, A. L. et al. (Eds.). **Nanostructures**. Oxford: Matthew Deans, 2017. p. 1.

SIQUEIRA, P. B.; BOLINI, H. M. A.; MACEDO, G. A. O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 491, 2008.

SKOOG et al. **Fundamentos de química analítica. Tradução da 8ª Edição norte-americana**. 8. ed. São Paulo: Thomson, 2006.

STEVANOVI, M. et al. Biomedical inorganic nanoparticles: preparation, properties, and perspectives. In: GRUMEZESCU, V.; GRUMEZESCU, A. (Eds.). **Materials for Biomedical Engineering: Inorganic Micro and Nanostructures**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 1–46.

SUETH-SANTIAGO, V. et al. Curcumina, o pó dourado do açafrão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 538–552, 2015.

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

SUN, Y. P. et al. Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 24,

p. 7756, 2006.

SYED, H. K. et al. Stability indicating HPLC–UV method for detection of curcumin in *Curcuma longa* extract and emulsion formulation. **Food Chemistry**, v. 170, p. 321, 2015.

THANGAVEL, K.; DHIVYA, K. Determination of curcumin, starch and moisture content in turmeric by Fourier transform near infrared spectroscopy (FT-NIR). **Engineering in Agriculture, Environment and Food**, v. 12, n. 2, p. 264, 2019.

TUERHONG, M.; YANG, X.; XUE-BO, Y. Review on carbon dots and their applications. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 45, n. 1, p. 139, 2017.

VAZ, R. et al. High luminescent carbon dots as an eco-friendly fluorescence sensor for Cr(VI) determination in water and soil samples. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 346, p. 502–511, 2017.

WAGNER, A. M. et al. Quantum dots in biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 94, p. 44–63, 2019.

WANG, R.; WANG, X.; SUN, Y. One-step synthesis of self-doped carbon dots with highly photoluminescence as multifunctional biosensors for detection of iron ions and pH. **Sensors and Actuators B**, v. 241, p. 73, 2017.

WANG, Y. et al. Subcritical ethanol extraction of flavonoids from *Moringa oleifera* leaf and evaluation of antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 218, p. 152, 2017.

WANG, Y.; HU, A. Carbon quantum dots: synthesis, properties and applications. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 2, p. 6921, 2014.

XIAO, D. et al. Microwave assisted one-step green synthesis of fluorescent carbon nanoparticles from ionic liquids and their application as novel fluorescence probe for quercetin determination. **Journal of Luminescence**, v. 140, p. 120–125, 2013.

XU, J. et al. A critical view on spike recovery for accuracy evaluation of analytical method for medicinal herbs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 62, p. 210–215, 2012.

XU, X. et al. Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 40, p. 12736–12737, 2004.

YANG, H. et al. Carbon dots synthesized by hydrothermal process via sodium citrate and NH_4HCO_3 for sensitive detection of temperature and sunset yellow. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 516, p. 192–201, 2018.

YANG, S.-T. et al. Carbon dots for optical imaging in vivo. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 32, p. 11308, 2009.

YANG, X. et al. One-step synthesis of photoluminescent carbon dots with excitation-independent emission for selective bioimaging and gene delivery. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 492, p. 1, 2017.

YANG, Y. et al. One-step synthesis of amino-functionalized fluorescent carbon nanoparticles by hydrothermal carbonization of chitosan. **Chemical**

Communications, v. 48, n. 3, p. 380–382, 2012.

YANG, Y. et al. Rhodamine B assisted graphene quantum dots fluorescent sensor system for sensitive recognition of mercury ions. **Journal of Luminescence**, v. 207, p. 273, 2019.

YOKOYAMA, T. et al. Basic properties and measuring methods of nanoparticles. In: HOSOKAWA, M. et al. (Eds.). . **Nanoparticle Technology Handbook**. [s.l.: s.n.]. p. 5.

YU, W. et al. Simultaneous determination of curcumin, tetrahydrocurcumin, quercetin, and paeoniflorin by UHPLC-MS/MS in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 172, p. 58, 2019a.

YU, Y. et al. Recent advances in delivery of photosensitive metal-based drugs. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 387, p. 154, 2019b.

YU, Y. et al. Saccharomyces-derived carbon dots for biosensing pH and vitamin B 12. **Talanta**, v. 195, p. 117, 2019c.

ZHANG, H.; MI, P. Polymeric Micelles for Tumor Theranostics. In: CUI, W.; ZHAO, X. (Eds.). . **Theranostic Bionanomaterials**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 289–302.

ZHAO, Y. et al. Carbon dots: from intense absorption in visible range to excitation-independent and excitation-dependent photoluminescence. **Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures**, v. 23, p. 922–929, 2015.

ZHENG, M. et al. On-off-on Fluorescent Carbon Dot Nanosensor for Recognition of Chromium (VI) and Ascorbic Acid Based on the Inner Filter Effect. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 24, n. VI, p. 13242, 2013.

ZHOU, J. et al. An electrochemical avenue to blue luminescent nanocrystals from multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs). **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p. 744, 2007.

ZHU, J.-H. et al. Fluorescent carbon dots for auramine O determination and logic gate operation. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 219, p. 261, 2015a.

ZHU, L. et al. Highly sensitive determination of dopamine by a turn-on fluorescent biosensor based on aptmer labeled carbon dots and nano-graphite. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 231, p. 506, 2016.

ZHU, S. et al. The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots and polymer dots): current state and future perspective. **Nano Research**, v. 8, n. 2, p. 355, 2015b.

ZIYATDINOVA, G.; KOZLOVA, E.; BUDNIKOV, H. Poly(gallic acid)/MWNT-modified electrode for the selective and sensitive voltammetric determination of quercetin in medicinal herbs. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 821, p. 73–81, 2018.

ZOU, Y. et al. Highly luminescent organosilane-functionalized carbon dots as a nanosensor for sensitive and selective detection of quercetin in aqueous solution. **Talanta**, v. 135, p. 145–148, 2015.

ZU, F. et al. The quenching of the fluorescence of carbon dots: A review on mechanisms and applications. **Microchim Acta**, v. 184, n. 7, p. 1899–1914, 2017.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO EM PERIÓDICO

Article

JBCS

<http://dx.doi.org/10.21577/0003-5053.20190045>J. Braz. Chem. Soc., Vol. 30, No. 11, 2355-2366, 2019
Printed in Brazil - ©2019 Sociedade Brasileira de Química

Use of Carbon Dots Synthesized from Citrate as a Fluorescent Probe for Quercetin Determination in Tea and Beer Samples

Nattany T. G. de Paula,^a Raquel Milani,^b André F. Lavorante^c and Ana Paula S. Paim^{a,*}^aDepartamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco,
Av. Jornalista Aníbal Fernandes, s/n, Cidade Universitária, 50740-560 Recife-PE, Brazil^bDepartamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco,
Av. Jornalista Aníbal Fernandes, s/n, Cidade Universitária, 50740-560 Recife-PE, Brazil^cDepartamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife-PE, Brazil

In this work, carbon dots (CDs) prepared by a one-step hydrothermal method were employed for the determination of quercetin in teas and beers. The fluorescence quenching of CDs was proportional to the concentration of quercetin. Under optimum experimental conditions, linear quenching was observed for quercetin in the range of 1.0 to 10 mg L⁻¹ ($F/F_0 = (0.1511 \pm 0.0075)[Q] + (0.8922 \pm 0.0384)$, $R^2 = 0.9926$), at room temperature, using 80 µL CDs and 0.1 mol L⁻¹ Na₂HPO₄/NaOH buffer solution (pH 11.0). A limit of detection (3σ criterion) of 0.85 mg L⁻¹, and a relative standard deviation of 0.21% (n = 3) for 4.0 mg L⁻¹ quercetin solution was obtained. Addition and recovery tests with tea and beer samples were performed resulting in recoveries at the range between 80 and 118%. This procedure served successfully to determine quercetin in beer and tea samples presenting high sample throughput.

Keywords: flavonoids, quercetin, carbon dots, fluorescence

Introduction

There is a growing concern about the quality of life, leading to a greater number of people who care about having a healthier diet. Thus, there is an increase in the consumption of foods that, in addition to nutritional value, also provide health benefits. These are the so-called nutraceutical foods.¹ Nutraceuticals are foods from vegetable or animal sources which in addition to their nutritional value have bioactive compounds that are beneficial for human health.² One type of nutraceutical/micronutrient that has received increasing attention recently are the polyphenols, due to their antioxidant action in the prevention of a number of diseases that involve free radicals. They are the most abundant antioxidants present in the human diet, found in foods such as fruits, vegetables, nuts, chocolate, wine, beer, coffee and tea.^{3,4} Among antioxidant polyphenols, flavonoids stand out because of their ability to fight free radicals.⁵

Quercetin (3,5,7,3',4'-pentahydroxy-flavone) is one of

the most abundant flavonoids, classified as a flavonol, with antioxidant and antitumoral activity due to the ability to act as a free radical scavenger.⁶ The action of quercetin in the process of inhibiting the formation of free radicals can occur in three different stages, at initiation (by interaction with superoxide ions), in the formation of hydroxyl radicals (by chelating iron ions) and in lipid peroxidation (by reacting with peroxy radicals of lipids).⁷ In addition, quercetin also has antiallergic, antiviral, antimutagenic, cardiovascular protection, cataract prevention, and lipid peroxidation inhibitory properties.⁸ It is reported that when compared to healthy people patients with diabetes have less ability to eliminate free radicals. One likely cause is that the concentration of natural antioxidants in people with diabetes is lower. Thus, increased consumption of foods high in quercetin may be useful in improving the side effects of chronic hyperglycemia.⁹ This flavonol is found in various foods consumed daily in the human diet, especially in fruits and vegetables. It is also found in a higher concentration in drinks like beer and tea. Considering this fact, it is important to analyze foods that are sources of quercetin to know how much quercetin they contain.

*e-mail: anaspaim@ufpe.br

There are several methods for determination of quercetin in foods and beverages, such as high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet-visible (UV-Vis) and fluorescence detection,^{3,10} spectrophotometric method,¹¹ capillary zone electrophoresis,¹² solid phase extraction,¹³ and near-infrared spectroscopy and chemometrics.¹⁴

Although these methods may be reasonably accurate and sensitive, they have certain disadvantages, such as laborious analysis, high conductor consumption, expensive instruments and time-consuming analysis. The methods involving fluorescence as detection are fast, economical, simple and very sensitive.¹⁵

The carbon dots (CDs) are a new carbon fluorescent material with a diameter less than 10 nm. The CDs are becoming an alternative to the use of quantum dots (QDs), since the QDs are synthesized from metals and the CDs from a carbon source, thus being biocompatible, exhibiting good conductivity, high chemical stability, low toxicity, strong emission photoluminescence, easy and low cost synthesis, and a contribution to greener chemistry.^{16,17} Owing to their properties, the carbon dots have been used as fluorescent sensors for detection of many species such as glucose,¹⁸ microRNAs,¹⁹ iron ions and pH,²⁰ dopamine,²¹ ascorbic acid,²² Cu²⁺,²³ Al³⁺,²⁴ and D-penicillamine.²⁵

In the process of carbon dots synthesis, it is possible to perform doping or surface passivation which can significantly improve their properties.²⁶ CDs containing nitrogen present wide and strong emission of light when excited in the ultraviolet region, being promising in several applications like fluorophores.²⁷

In this paper, an analytical procedure for quantification of quercetin based on quenching of the fluorescence of carbon dots is reported. The procedure was based on an interaction between synthesized carbon dots from citrate, using ammonium bicarbonate as resource of the nitrogen, and quercetin, providing a quenching on the fluorescence signal proportional to the concentration of analyte present in the tea and beer samples analyzed.

Experimental

Reagents, solutions and samples

All solutions were prepared with analytical grade chemicals. The solutions were prepared with water from a Milli-Q system (Millipore Inc., Bedford, USA) with resistivity of 18 M Ω cm, and all chemicals were of analytical reagent grade, and methanol (HPLC grade) from Merck (Darmstadt, Germany) and stored in amber glass bottles.

Stock solutions of 100 mg L⁻¹ quercetin, kaempferol, myricetin, catechin, epicatechin and resveratrol (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) were prepared by dissolving an appropriate amount of the reagents in methanol (HPLC grade).

Stock solutions of 100 mg L⁻¹ ascorbic (Vetec, Darmstadt, Germany), gallic (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), citric (Nuclear, Diadema, Brazil) and malic (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) acids were prepared by dissolving an appropriate amount of the reagents in water.

Buffer solutions were prepared with KCl/HCl 0.1 mol L⁻¹ (pH 2.0); citric acid/K₂HPO₄ 0.1 mol L⁻¹ (pH 3.0; 4.0; 5.0; 6.0; 7.0 and 8.0); Na₂CO₃/NaHCO₃ 0.1 mol L⁻¹ (pH 9.0); Na₂CO₃/HCl 0.1 mol L⁻¹ (pH 10.0); Na₂HPO₄/NaOH 0.1 mol L⁻¹; Na₂B₄O₇/NaOH 0.1 mol L⁻¹; Na₂CO₃/HCl 0.1 mol L⁻¹; glycine in aqueous solutions of NaCl/NaOH 0.1 mol L⁻¹ and NaHCO₃/NaOH 0.1 mol L⁻¹ (pH 11.0); and Na₂HPO₄/NaOH 0.1 mol L⁻¹ (pH 12.0).

Working solutions containing quercetin between 1.0 to 10.0 mg L⁻¹ were prepared, by appropriate dilution of the stock solution to a volume of 5 mL for each solution.

Tea and beer samples were purchased from local stores. The tea samples were green and black tea infusions and a ready-to-drink green tea; the beer samples were Weissbier, Pilsen and Lager beers. All the samples were filtered and diluted adequately prior to analysis.

Apparatus

For the carbon dot synthesis, a temperature-controlled oven (MMM Ecocell Confort Line, Planegg, Germany) was used. Ultraviolet-visible (UV-Vis) absorption spectra of the carbon dot was obtained using a spectrophotometer (Agilent model 8453, Palo Alto, USA). Transmission electron microscopy (TEM) images were produced with a transmission electron microscope (JEOL model JEM 2100, Tokyo, Japan) operated at an acceleration voltage of 200 kV to characterize the synthesized carbon dot. For pH measurement, a bench pH meter (Q400AS, Quimis[®], São Paulo, Brazil) was used. FTIR spectra were recorded on a Fourier transform infrared spectrophotometer-IRTracer-100 from Shimadzu, using the KBr pellet technique in the wavenumber region 4000-400 cm⁻¹. A spectrofluorometer (RF-5301PC, Shimadzu[®], São Paulo, Brazil) was used for detection of quercetin. The measurement of the photoluminescence quantum yield of the synthesized carbon dot was carried out in a Quantaaurus QY-C11347-11 Absolute QY Spectrometer equipped with an integration sphere (Hamamatsu, Japan). The photoluminescence properties were measured with a spectrofluorometer Horiba-Jobin

Yvon Fluorolog-3 with the continuous 450 W xenon lamp and UV xenon flash tube for excitation, double-grating monochromator in the excitation and UV-Vis emission position, single-grating monochromator in the NIR (near infrared) emission position, R928P and H10330A-75 Hamamatsu photomultipliers, respectively for the UV-Vis and NIR range emissions. All emission spectra were corrected by spectral response of the monochromators using a silicon photodiode reference detector to monitor and compensate for variation in the xenon lamp output, using typical correction spectra provided by the manufacturer. The nanosecond emission decay curves were acquired in this equipment operating in the time-correlated single photon counting mode (TCSPC) and using a pulsed NanoLED-340 (pulses at 339 nm) as the excitation source. Instrumental function response for the NanoLED-340 was obtained by use of a Ludox (colloidal silica) scattering water solution. Fluorescence decay analysis software, DAS6, was used to fit the model functions to the experimental data. All these instruments are installed either in the Laboratório de Análise Química, Inorgânica e Sensores (LAQIS) in the Department of Chemistry of Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE, Recife, Brazil), in the Laboratório Associado para a Química Verde (LAQV) da Rede de Química e Tecnologia (REQUIMTE) in the Department of Applied Chemistry of Porto University (Porto, Portugal), in the Laboratório de Terras Raras (BSTR) in the Department of Fundamental Chemistry of Federal University of Pernambuco (UFPE, Recife, Brazil), in the Laboratório de Polímeros Não-Convencionais in the Department of Physics of Federal University of Pernambuco (UFPE, Recife, Brazil) and in the analytical central in the Chemistry Institute of USP (São Paulo, Brazil).

Carbon dot synthesis

A carbon dot from citrate was prepared using the hydrothermal method in a single step, according to a procedure described by Guo *et al.*²⁸ 0.2 g of sodium citrate and 1.5 g of ammonium bicarbonate were weighed separately, then dissolved in 10 mL of deionized water and transferred to a Teflon® reactor. Subsequently, the Teflon® reactor was coupled to a stainless-steel reactor and the reaction was carried out in a controlled oven at 180 °C over a period of 4 h, under high pressure with a heating ramp of 10 °C min⁻¹. After this, the vessel was cooled to room temperature and the solution containing 25 mg mL⁻¹ of carbon dots was stored in a Falcon tube and kept under refrigeration.

Procedures for the detection of quercetin

Each Falcon tube had a total volume of 10.0 mL. To make this up, 0.1 mL of the carbon dot was added to 1 mL of buffer solution (pH 11), 3.9 mL of water (representing the blank solution) or different amounts of quercetin stock solution (100 mg L⁻¹) and the final volume (5.0 mL) completed with water. Then, the readouts were performed on the spectrofluorometer to verify the maximum fluorescence quenching. The excitation wavelength was 380 nm and the emission spectra were obtained in the 400 to 650 nm range with maximum emission at 450 nm and the slit widths of excitation and emission at 1.5 nm. The analytical curve was plotted for F_0/F (F_0 and F are the fluorescence intensity of the carbon dot solution in the absence and presence, respectively, of quercetin) versus quercetin concentrations.

Determination of quercetin in beer and tea samples

The proposed method was used to determine the amount of quercetin in beer (Weissbier, Pilsen and Lager beers) and tea (green and black tea infusions and a ready-to-drink green tea) samples that had been purchased from a local supermarket. The contents of three bags of each tea sample was weighed and 1.8 g of the leaves were placed in 100 mL of heated water (90 °C). After 5 min, the tea was filtered and stored in amber glasses. The samples of tea and beer were filtered, diluted and the amount of quercetin concentration was detected.

Study of the chemical parameters

The pH study for the determination of quercetin employing the synthesized carbon dot was carried out using pH buffer solutions ranging from 1 to 12. For each pH, an analytical curve was obtained in the range of quercetin concentration from 1.0 to 10.0 mg L⁻¹. For this, fixed volumes of the carbon dot and the buffer solution were mixed in Falcon tubes, then different volumes of a quercetin stock solution (100.0 mg L⁻¹) were added, to obtain a quercetin concentration range of 1.0-10.0 mg L⁻¹. Finally, deionized water completed the solution to a total volume of 5 mL.

The study of the reaction time between the carbon dot and quercetin was evaluated. To do this, the following were mixed in a Falcon tube: 0.1 mL of the carbon dot, 1.0 mL of buffer solution (pH 11), 3.4 mL of deionized water and 0.5 mL of quercetin stock solution (100.0 mg L⁻¹) to obtain a final quercetin concentration of 10.0 mg L⁻¹. Immediately after the addition of quercetin, the Falcon tube content was transferred to the spectrofluorometer for readout to

obtain the transient signals from the fluorescence intensity variation as a time function.

In order to use the least amount of carbon dot in the determination of quercetin, a study was carried out by varying the amount of carbon dot from 0.05 to 0.10 mL and the analytical curves obtained for each were compared. In six Falcon tubes, fixed amounts of the buffer solution were added, varying the added amounts of quercetin to obtain different concentrations of quercetin from 1.0 to 10.0 mol L⁻¹ and varying the amounts of deionized water and carbon dot (0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09 and 0.10 mL), maintaining the final volume in the tubes equal to 5 mL.

After evaluating the optimal pH in the determination of quercetin, a study was carried out to verify composition of the buffer solution to be used. A curve was obtained for each of the buffer solutions, pH 11: (1) Na₂B₄O₇ 0.05 mol L⁻¹/NaOH 0.1 mol L⁻¹; (2) Na₂HPO₄/NaOH 0.1 mol L⁻¹; (3) NaHCO₃ 0.05 mol L⁻¹/NaOH 0.1 mol L⁻¹; (4) glycine in aqueous solutions of NaCl/NaOH 0.1 mol L⁻¹, and (5) Na₂CO₃/HCl 0.1 mol L⁻¹.

The influence of the concentration of the buffer solution was evaluated. The buffer solution concentration varied between 0.1 and 0.6 mol L⁻¹ (0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5 and 0.6 mol L⁻¹) and a curve for each concentration of the buffer solution was obtained.

The fluorescence quenching as a function of temperature was monitored to verify the type of interaction between the carbon dot and quercetin. The carbon dot-quercetin interaction kinetics were recorded at different temperatures (varied from 25 to 40 °C). Temperature control was maintained using a water bath and the variation of temperature was controlled to be within 0.1 °C.

Interference test

The interference studies were performed using a quercetin standard solution of 5.0 mg L⁻¹ containing from 0.02 to 20 mg L⁻¹ of the possible interfering agents: ascorbic acid, gallic acid, citric acid, malic acid, catechin, epicatechin, kaempferol, resveratrol and myricetin, tested separately. Solutions with the quercetin mixed with each potential interfering compound in equal concentrations were prepared. When interference did not occur, the concentration of the interfering compound was increased or decreased until there was an effect.

Addition and recovery test

The accuracy of the method was determined using spiked beer and tea samples in two different concentration levels, 2.0 and 5.0 mg L⁻¹ for six beer and six tea samples.

These experiments were performed to evaluate matrix effects that may affect the measurements using the proposed method. Once the best operating conditions had been established, 12 samples were analyzed to test the usefulness of the proposed system.

Results and Discussion

Characterization of carbon dot

The carbon dot was synthesized according to the method adapted from Guo *et al.*²⁸ with some modifications and showed a yellow color. The UV-Vis absorption and fluorescence emission and excitation spectra were obtained to study the optical properties of the CDs, as shown in Figure 1a. There are three bands in the excitation spectrum, around 260, 300 and 380 nm. Regardless of the chosen excitation wavelength, the fluorescence emission spectrum had a maximum of 450 nm, so the excitation wavelength at 380 nm was selected, as it presented the highest emission intensity. The synthesized material presented wide absorption in the ultraviolet and visible range of the electromagnetic spectrum with two bands characteristic of the CDs, as previously reported in the literature.²⁸ The UV-Vis absorption spectra, presented in Figure 1a, showed two bands around 230 and 340 nm. The band around 230 nm corresponds to the π - π^* transition, corresponding to sp²-type carbon bonds of nanocarbon.^{29,30} The band around 340 nm corresponds to the n- π^* transition of the C=O bond and carboxylic groups C=O.^{30,31} In both absorption and emission spectra, the CDs characteristic curves are similar to those in the literature.²⁸

The synthesized carbon dot exhibits colloidal stability in an aqueous medium, being a translucent yellow when not under light irradiation, as shown in the photo insert in Figure 1a.

When the solution is exposed to an irradiation of ultraviolet light at 380 nm, the emission of a blue color occurs showing the formation of the carbon dot as displayed in the photo in Figure 1a. This indicates that even after practical changes were made to simplify the methodology, it was still possible to obtain the carbon dot with the same efficiency and quality as obtained by Guo *et al.*²⁸ The absolute quantum yield (QY) of CDs dispersed in water was 9.3% (excitation wavelength 380 nm), which is higher than most of the CDs previously reported.³²⁻³⁴ We still did not reach a 68% QY as demonstrated in the work of Guo *et al.*²⁸ The decrease in the QY can be due to the non-realization of the dialysis step, which from the analytical point of view was not necessary in this work, because even without the dialysis step it was possible to perform the analyses in a simpler and faster way.

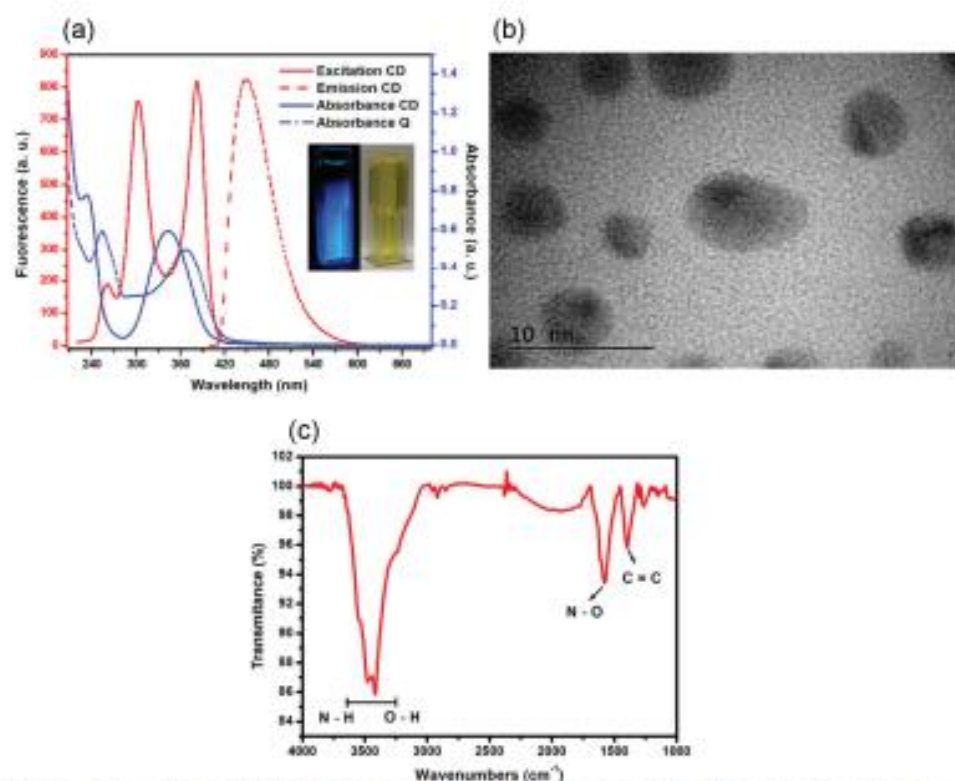


Figure 1. (a) An overlapping of absorption (—) excitation (---) and emission (---) spectra of the synthesized carbon dots and absorption spectrum of quercetin (---). The inset is the picture of carbon dots under light irradiation by a UV lamp at 380 nm (left) and without light irradiation (right); (b) A TEM image of the carbon dots synthesized; (c) FTIR (KBr) spectrum of CDs.

Through the analysis of the TEM images (Figure 1b), it is possible to observe that the nanoparticles have a spherical morphology, as already reported by other authors,²⁸ inferring that the CDs had been obtained as the product of the synthesis.

For a better characterization of the CDs, a FTIR analysis was performed to verify the functional groups present on the surface of the CDs. In Figure 1c, bands at 3200-3630 cm^{-1} are attributed to the stretching vibration of O-H and N-H.²⁵ Peaks at 1577 and 1396 cm^{-1} correspond to the asymmetric and symmetric stretching vibrations of the carboxylate anions.²⁸ Thus, it is possible that the amino groups on the surface of the synthesized CDs interact with the phenolic hydroxyls present in quercetin. In this way the hydrogen bonding between the quercetin and the surface of the CDs occurs, which causes the quenching of the fluorescence.²⁵

The synthesized carbon dot was applied to the analysis of quercetin. Consequently, studies were carried out to establish the best reaction conditions between the carbon dot and quercetin.

The experimental conditions used for the proposed procedure including media pH, reaction time, CDs amount, nature and concentration of the buffer solution, the interaction kinetics, and CDs selectivity were evaluated. Studies to evaluate the performance of the analytical assay were carried using univariate analysis with the purpose of attaining the highest sensitivity, i.e., maximum fluorescence quenching.

Study of the pH

The reactivity and stability of the carbon dot in a solvent are related to the charge on the surface of the nanoparticles, which is dependent on the nature of the binder and the pH of the medium. Due to the presence of carboxyl groups in acidic solution, these groups may be protonated, leading to colloidal instability, which may lead to an aggregation of the nanoparticles and consequent fluorescence inhibition.²⁸ In this study, the pH was varied from 1 to 12 using buffer solutions according to the buffering range required to evaluate the influence of pH on the quenching of carbon dot

fluorescence caused by quercetin. In Figure 2 it can be seen that there was an increase in sensitivity as a function of the pH increase. It was not possible to perform an analytical curve for pH 1, because at this pH the fluorescence intensity for all the points of the curve was close to zero, indicating that there was a degradation of the carbon dot. The highest sensitivity (Stern-Volmer constant, K_{SV}) and the best coefficient of determination (R^2) were obtained when the pH was equal to 11 ($F_0/F = (0.1005 \pm 0.0045)[Q] + (0.9980 \pm 0.0234)$, $R^2 = 0.9938$), which was expected, since the synthesized carbon dot had pH 10.8. Therefore, pH 11 was selected for further studies.

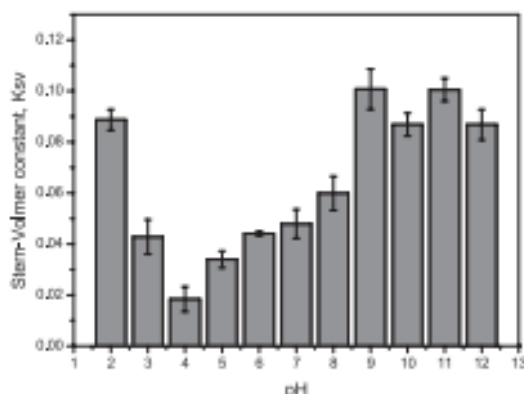


Figure 2. Stern-Volmer constant (K_{SV}) versus pH of the buffer solution used to determination of quercetin. Buffer solution varied from 2 to 12.

Reaction time

The stability of carbon dot solutions can affect the reproducibility and accuracy of successive fluorescence measurements during sample analyses. An unstable solution will affect the relationship between fluorescence intensity and analyte concentration because the loss of fluorescence may be due to the instability of the CDs solution and not to the presence of the analyte in different concentrations. This aspect becomes more important if the reaction requires a long time. Figure 3 shows the transient signal for the time

of the reaction between CDs and quercetin (10 mg L^{-1}), pH 11, monitored for a period of 15 min. It can be seen that the reaction between the CDs and quercetin (10 mg L^{-1}) occurred rapidly and then the equilibrium was displaced in order to partially regenerate the CDs, visible by the partial recovery of the carbon dot fluorescence. Thus, the shortest possible time, 0.5 min, was selected for reading the reaction after the addition of quercetin to the vessel where the reaction occurred.

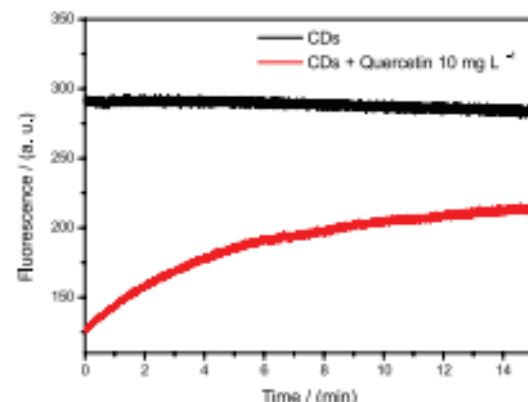


Figure 3. The transient signal for time of the reaction between carbon dot and quercetin (10 mg L^{-1}), pH 11. The signal was monitored at 450 nm.

Carbon dot volume

In each synthesis that was carried out, about 10 mL of the carbon dot solution was produced. Given this, the amount of carbon dot to be used in the quercetin analysis was evaluated to verify what would be the least amount of carbon dot possible that could be used in the analysis without loss of the sensitivity of the method.

The amount was varied between 0.05 and 0.10 mL and an analytical curve was obtained for each amount of carbon dot employed. In all volumes studied, a linear relationship between the fluorescence signal quenching (F_0/F) and the concentration of quercetin was obtained. The amount of 0.08 mL was selected because it presented a curve with

Table 1. Linear equation and coefficient of determination (R^2) obtained according to the carbon dot volume

Carbon dot volume / mL	Linear equation	R^2
0.05	$F_0/F = (0.1513 \pm 0.0049) \times C + (0.8936 \pm 0.0252)$	0.9968
0.06	$F_0/F = (0.1590 \pm 0.0062) \times C + (0.8639 \pm 0.0319)$	0.9954
0.07	$F_0/F = (0.1654 \pm 0.0067) \times C + (0.8889 \pm 0.0341)$	0.9952
0.08	$F_0/F = (0.1579 \pm 0.0039) \times C + (0.9316 \pm 0.0202)$	0.9982
0.09	$F_0/F = (0.1749 \pm 0.0085) \times C + (0.8748 \pm 0.0432)$	0.9930
0.10	$F_0/F = (0.1488 \pm 0.0064) \times C + (0.9814 \pm 0.0329)$	0.9944

C: quercetin concentration; F_0/F : F_0 and F are the fluorescence intensity of the carbon dot solution in the absence and presence, respectively, of quercetin.

Table 2. Linear equation and coefficient of determination (R^2) obtained according to the buffer solution nature

Buffer	Buffer solution	Linear equation	R^2
1	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0.05 mol L ⁻¹ /NaOH 0.1 mol L ⁻¹	$F_0/F = (0.1338 \pm 0.0082) \times C + (0.8006 \pm 0.0416)$	0.9892
2	Na_2HPO_4 /NaOH 0.1 mol L ⁻¹	$F_0/F = (0.1511 \pm 0.0075) \times C + (0.8922 \pm 0.0384)$	0.9926
3	NaHCO_3 0.05 mol L ⁻¹ /NaOH 0.1 mol L ⁻¹	$F_0/F = (0.1761 \pm 0.0119) \times C + (0.8500 \pm 0.0608)$	0.9864
4	glycine/NaCl/NaOH 0.1 mol L ⁻¹	$F_0/F = (0.1323 \pm 0.0043) \times C + (0.9250 \pm 0.0219)$	0.9968
5	Na_2CO_3 /HCl 0.1 mol L ⁻¹	$F_0/F = (0.1672 \pm 0.0091) \times C + (0.8606 \pm 0.0461)$	0.9912

C: quercetin concentration; F_0/F : F_0 and F are the fluorescence intensity of the carbon dot solution in the absence and presence, respectively, of quercetin.

greater sensitivity (a) and better coefficient of determination (R^2), as shown in Table 1.

Buffer solution nature

The study was carried out by varying the chemical composition of the buffer solution at pH 11: $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ /NaOH, Na_2HPO_4 /NaOH, NaHCO_3 /NaOH, glycine/NaCl/NaOH and Na_2CO_3 /HCl, as displayed in Table 2. As can be observed, there was a small loss of sensitivity (a) for buffer solutions 1 and 4. In the curves obtained with buffer solutions 3 and 5, although the sensitivity (K_{sv}) was higher, the quenching for the first concentration of the curve (1 mg L⁻¹) was lower than in the curve obtained for buffer solution 2. The results showed that the Na_2HPO_4 /NaOH buffer solution promoted greater carbon dot stability and greater quenching effect for quercetin analysis. Thus, the Na_2HPO_4 /NaOH buffer solution was chosen.

Buffer solution concentration

After establishing the pH (11.0) and nature of the buffer solution (Na_2HPO_4 /NaOH), the concentration of the buffer was evaluated. The magnitude of the interaction of the analyte with the carbon dot surface can be influenced by the ionic strength of the medium (buffer solution concentration). The evaluation of this parameter was performed by varying the Na_2HPO_4 /NaOH buffer solution concentrations between 0.1 and 0.6 mol L⁻¹. There was no significant variation in sensitivity (K_{sv}) and coefficient of determination (R^2) values in the quercetin analysis as a function of buffer concentration. Thus, the lowest concentration employed, 0.1 mol L⁻¹ Na_2HPO_4 /NaOH ($F_0/F = 0.1502 \times C + 0.9096$, $R^2 = 0.9978$) was maintained in subsequent studies.

Mechanism of interaction between carbon dot and quercetin

Figure 1 shows that the UV-Vis absorption spectra of the quercetin has bands around 255 and 370 nm. The

synthesized carbon dot exhibits an absorption band around 340 nm and an emission band around 450 nm when excited at 380 nm. A partial overlap occurs between the absorption spectrum of quercetin and both the absorption and excitation spectra of the carbon dot. Fluorescence quenching of carbon dot occurs due to the absorbance of quercetin being similar to the excitation wavelength of the carbon dot. The quercetin shields part of the radiation for the excitation of the carbon dot, leading to the inner filter effect between quercetin and the carbon dot, causing the change in the intensity of fluorescence.^{30,34}

In the spectra shown in Figure 4, a red-shift of the emission wavelength after the reaction between the quercetin and the carbon dot occurs. It is possible to observe that with the increase of the quercetin concentration, an increasing displacement for larger wavelengths (red-shift) occurs, suggesting that the quenching mechanism is not only related to the inner filter effect process, but also may be due to the fundamental state of the compounds formed.³⁶

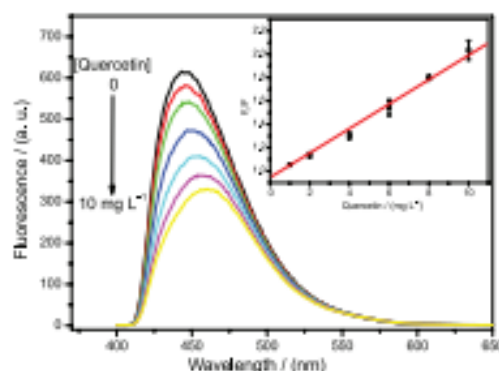


Figure 4. Fluorescence spectra for quercetin determination, reference solutions containing, 0; 1; 2; 4; 6; 8 and 10 mg L⁻¹, the insert is the analytical curve for quercetin.

Figure 5 shows the change in fluorescence intensities of CDs at 298, 303 and 305 K. It is possible to observe that there is a decrease in the Stern-Volmer constant (K_{sv}) with the increase in temperature of the reaction medium.

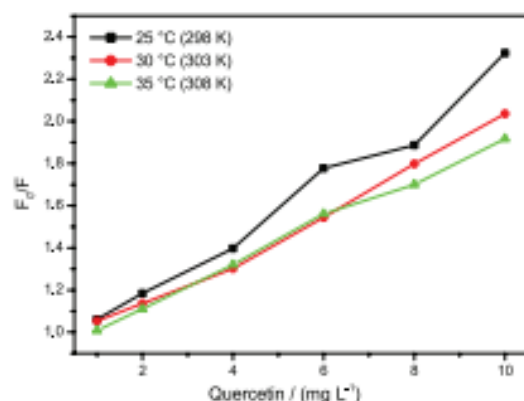


Figure 5. Analytical curves obtained from the reaction between the synthesized carbon dot and quercetin under different temperatures: 25, 30 and 35 °C, respectively.

This phenomenon demonstrates that the mechanism involved in the fluorescence quenching of the carbon dot by quercetin is static. When the quenching mechanism is made more dynamic with the increase in temperature, an increase in the diffusion occurs as well as collisions between the carbon dot and the quencher, increasing the Stern-Volmer constant. When the mechanism is static, with the increase in temperature occurs a dissociation of the complexes formed during the reaction between the carbon dot and the quencher, causing a decrease in the Stern-Volmer constant. Table 3 shows that this occurred between the reaction of the synthesized carbon dot and the quercetin.^{37,38}

Table 3. Stern-Volmer quenching constants (K_{sv}) obtained from the reaction of the carbon dot and quercetin at different temperatures

Temperature / °C	K_{sv} / (L.mg ⁻¹)	R^2
25 (298 K)	0.1357	0.9819
30 (303 K)	0.1103	0.9934
35 (308 K)	0.1007	0.9964

R^2 : coefficient of determination.

Another way to verify if the quenching is static is through the absorption spectrum of the CDs, shown in Figure 6. The formation of the ground state complex can result in the change of the absorption spectrum of the CDs.³⁹ It is possible to observe a change in the absorption spectrum of the CDs after the reaction with quercetin. There is a band at around 425 nm (Figure 6) indicating the occurrence of perturbation in the electron cloud, indicating that there was interaction between the CDs and quercetin.

The most efficient way to evaluate the mechanism involved in quenching, either static or dynamic, is through the measurement of the fluorescence lifetime. When

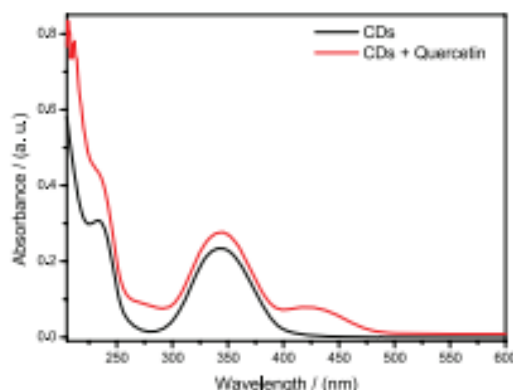


Figure 6. Absorbance spectrum of the CDs and of the product of the reaction between the CDs and quercetin.

quenching is static, the fluorescence lifetime does not change ($\tau_0/\tau = 1$), where τ_0 and τ , are the fluorescence lifetimes of CDs in the absence and presence of quercetin, respectively. The complexed CDs do not fluoresce, so the only observed fluorescence is from the uncomplexed CDs. In contrast, for dynamic quenching $F_0/F = \tau_0/\tau$. Therefore, it is possible to observe in Figure 7 that the fluorescence lifetime of CDs and CDs in the presence of 10 mg L⁻¹ quercetin in buffer solution pH 11 was 6.43 and 6.54 ns, respectively, where $\tau_0/\tau = 1$, which proves that the mechanism of quenching of fluorescence involved in the reaction was static quenching.^{35,37} Fluorescence emission decay profile of the other quercetin concentrations in buffer solution and in aqueous solution can be seen in Figures S1-S6 (Supplementary Information section).

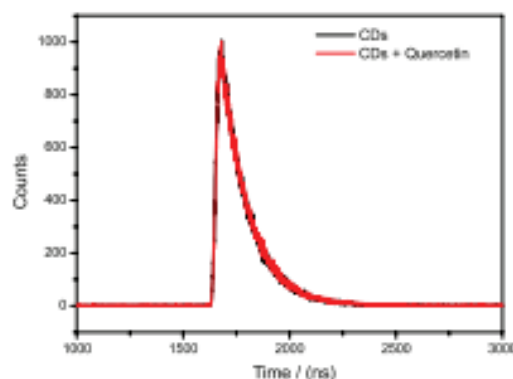


Figure 7. Fluorescence emission decay profile of the CDs and CDs in the presence of 10 mg L⁻¹ quercetin in buffer solution pH 11 (λ_{ex} = 380 nm, λ_{em} = 450 nm).

Guo *et al.*²⁸ observed that CDs synthesized at a lower pH had low fluorescence and at a higher pH had high

fluorescence intensity. Given this, they concluded that there were carboxyl groups present in the nanoparticles synthesized. These groups can be protonated in acidic solutions, which will lead to the aggregation of CDs, resulting in quenching of the fluorescence. The interaction between quercetin and synthesized CDs may have occurred on the carbon dot surface.⁴⁰ It is believed to have occurred through the interaction between the CDs and the formed compounds due to the instability of the ring structure in quercetin under basic conditions, resulting in fragmentation of the ring structure⁴¹ and this may have modified the surface of the CDs and caused the quenching of fluorescence.

Interference study

To evaluate the selectivity of the proposed method, we evaluated the effect of possible interferences that could affect the analysis in real samples. The effects on the analytical signal for reference solutions of 5.0 mg L⁻¹ quercetin containing different concentrations of the potentially interfering species, ascorbic acid, gallic acid, citric acid, malic acid, catechin, epicatechin, kaempferol, resveratrol and myricetin were evaluated. The tolerance limit for interfering substances was defined as the amount of chemical species, which the signals obtained using the reference quercetin solution with the interfering substance causing a variation of $\pm 5\%$ compared to the signal of the reference solution with 5.0 mg L⁻¹ quercetin. As expected, the results presented in Table 4 show that the carbon dot employed gave a high selectivity to the method.

Table 4. Tolerance for potential interfering substances

Substance	Concentration / (mg L ⁻¹)	Variation signal / %
Ascorbic acid	5.00	-1.84
Gallic acid	5.00	-2.32
Citric acid	5.00	+1.08
Malic acid	10.00	-4.74
Catechin	2.00	+0.71
Epicatechin	15.00	+4.76
Kaempferol	0.04	-2.95
Resveratrol	10.00	-1.36
Myricetin	1.00	-4.85

Reference solution for quercetin 5.0 mg L⁻¹.

Analyzing the results shown in Table 4, we concluded that the species with the highest interference potentials are catechin, kaempferol and myricetin, as these substances showed a lower concentration limit than the interfering others.

In beer samples, the following contents have been identified: catechin ranging from 5.9 to 10.1 mg L⁻¹,⁴² kaempferol 16.4 mg L⁻¹,⁴³ and myricetin 0.08 mg L⁻¹.⁴⁴ When the beer samples were diluted 1:10 (v/v), the catechin, kaempferol and myricetin concentrations remained at maximums of 1.01, 1.64 and 0.008 mg L⁻¹, respectively. Since the limit of tolerance for catechin and myricetin is higher than the allowable concentration obtained after dilution, possible effects on the analysis would not be expected. If the analyzed beer does not have a maximum content of kaempferol, which is 16.4 mg L⁻¹ as described in the literature,⁴³ there will also be no interference of this polyphenol after its dilution for quercetin analysis, as expected.

In tea samples, although the concentrations of catechin, kaempferol and myricetin are high as reported in the literature,⁷ the recovery test confirmed the accuracy of the method, showing that there was no interfering effect on the analyzed tea samples. This way, through the recovery test (Table 5), the accuracy of the method was evaluated.

Analytical performance and recovery

Optimization of the proposed procedure for quercetin determination employed a reaction time of 0.5 min, a buffer solution Na₂HPO₄/NaOH and other parameters established, as shown in Table 6.

The fluorescent emission intensity of the carbon dot was sensitive to quercetin and decreased with the increase of the quercetin standard solution concentration. There was a red-shift of the emission wavelength. A linear response between 1.0 and 10.0 mg L⁻¹ was obtained. The linear equation was estimated as $F_0/F = (0.1511 \pm 0.0075)[Q] + (0.8922 \pm 0.0384)$ ($R^2 = 0.9926$, $n = 3$), (the F_0 and F are the fluorescence intensities in the absence and presence of quercetin, respectively, and $[Q]$ is the concentration of quercetin in mg L⁻¹), with a limit of detection of 0.85 mg L⁻¹ and relative standard deviation (RSD) 0.21% ($n = 3$, 4 mg L⁻¹). This phenomenon can be described by the Stern-Volmer equation,⁴⁵ as shown in equation 1. The Stern-Volmer equation predicts a linear dependence of F_0/F on quencher concentration $[Q]$. Where F_0 and F are the fluorescence intensity of the carbon dot solution in the absence and presence, respectively, of quercetin and K_{sv} this is referred to as the quenching constant or the Stern-Volmer constant, established at 0.1511 L mg⁻¹.^{45,46}

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

Given the above, it can be said that the proposed

Table 5. Recovery tests for quercetin

Sample	Added / (mg L ⁻¹)	Found / (mg L ⁻¹)	Recovery / %
Lager beer	0	5.14	—
	2.0	5.90	83
	5.0	8.65	85
Lager beer	0	1.73	—
	2.0	3.01	81
	5.0	6.09	91
Weissbier	0	4.37	—
	2.0	5.94	93
	5.0	8.12	87
Pilsen beer	0	1.88	—
	2.0	3.12	81
	5.0	7.01	101
Pilsen beer	0	2.96	—
	2.0	4.32	87
	5.0	7.70	97
Pilsen beer	0	1.51	—
	2.0	3.39	96
	5.0	5.22	80
Ready-to-drink green tea	0	3.87	—
	2.0	6.27	107
	5.0	8.30	94
Green tea infusion	0	8.45	—
	2.0	10.62	102
	5.0	13.17	98
Green tea infusion	0	6.54	—
	2.0	8.15	95
	5.0	13.64	104
Green tea infusion	0	8.72	—
	2.0	8.99	84
	5.0	11.24	82
Black tea infusion	0	7.48	—
	2.0	9.22	97
	5.0	11.32	91
Black tea infusion	0	6.37	—
	2.0	8.76	91
	5.0	10.07	89

procedure for quercetin analysis is feasible for analytical applications.

Spike recovery test is one of the ways to evaluate the accuracy of analytical results.⁴⁷ In a recovery experiment, a measured amount of the constituent to be analyzed (analyte) is added to the matrix and then the analysis is performed on this material. A comparison of the amount

Table 6. Parameters established after optimization of the proposed procedure

Parameter	Range	Selected value
Buffer solution pH	2-12	11
Carbon dot volume / mL	0.05-0.10	0.08
Buffer solution concentration / (mol L ⁻¹)	0.1-0.6	0.1

found in the matrix without addition *versus* the amount added provides the recovery of the method, which is an estimate of the accuracy of the method.⁴⁸ Six types of beer samples (Weissbier, Pilsen and Lager) and six types of tea samples (green and black teas infusion and ready-to-drink green tea) were tested. The addition was performed at two concentration levels of quercetin, 2.0 and 5.0 mg L⁻¹. Before analysis, the samples were filtered and diluted, 1:10 (v/v) for the beer samples and 1:30 (v/v) for the tea sample, maintaining the quercetin concentration within the linear working range. The results for the analysis of these beers and teas for the recovery test are shown in Table 5. The recovery values were between 80 and 107%, indicating the accuracy of the proposed method, demonstrating that there was no matrix effect. Thus, the method can be used to determine the content of quercetin in beer and tea samples.

The proposed method was compared with other approaches previously reported in the literature for quercetin determination (Table 7), showing that our work has a linear range comparable to the methods reported in the literature.⁴⁹ In the analyses with high performance liquid chromatography mass spectrometry (HPLC-MS), heating and the use of solvents such as formic acid and acetonitrile were necessary, and the analyses were time consuming.⁵⁰ In some studies, the sample preparation made the method expensive and time consuming.^{49,51,52} In the spectrophotometric method, although the analyses were performed directly due to the simplicity of the samples (drug), there were disadvantages such as the amount of solvent needed and reaction time of 4 min, being eight times slower than the reaction time reported in the present work.⁵³ There are fluorescent methods using carbon nanoparticles for determination of quercetin in an aqueous solution such as the method using luminescent organosilane-functionalized carbon dots⁸ and using fluorescent carbon nanoparticles from ionic liquids,⁴⁰ although these methods are interesting, were not applied to real samples.

Our work has advantages over the others, such as high sample throughput, eco-friendly reagent economy, no extraction step using solvent, feasible analysis after simple filtration and dilution steps, without complicated pretreatment.

Table 7. Analytical features of methodologies employed on quercetin determination

Detection method	Linear range / (mg L ⁻¹)	RSD / %	Detection limit / (mg L ⁻¹)	Sample	Reference
Voltammetric	0.0002-7.55	3.5	0.0001	medicinal herbs	51
HPLC-MS	0.002-2.0	—	—	tea infusions	50
Electrochemical	0.12-9.07	5	0.012	tea	49
Fluorescence	0.02-0.8	4.1	0.005	urine and onion skin	52
Spectrophotometric	1.0-12.0	< 3	0.76	quercetin + C capsules	53
Fluorescence	0-12.0	—	0.02	aqueous solution	8
Fluorescence	0.87-9.54	2.9	0.03	—	40
Fluorescence	1.0-10.0	1.22	0.85	tea and beer	this work

RSD: relative standard deviation; HPLC-MS: high performance liquid chromatography mass spectrometry.

Conclusions

In this work, we demonstrated the applicability of a fluorescence procedure using carbon dots synthesized with citrate to determine the amount of quercetin in beer and tea samples. This was a simple and fast procedure, with a 0.5 min reaction time between the synthesized carbon dot and the quercetin, having a high sample throughput. The analysis was performed with a low consumption of carbon dots, using only 0.08 mL in each determination. As the carbon dots are obtained from carbon sources, they could provide eco-friendly sensors for the detection of quercetin. The interaction mechanism between carbon dots and quercetin is known to be not only associated with an inner filter effect but may also be due to the fundamental state of the compounds formed. Through the change of the temperature, it was possible to observe that the quenching was static. After the optimization of the analytical parameters, the method presented a linear range from 1 to 10 mg L⁻¹, limit of detection of 0.85 mg L⁻¹ (pH 11), with recoveries of 80 and 107% for beer and tea samples, respectively, demonstrating that there was no matrix effect on the determination of quercetin in the samples analyzed. The proposed procedure was simple, fast, selective, and versatile for applications with different samples.

Supplementary Information

Supplementary information (Figure S1-S6) is available free of charge at <http://jbcs.sbq.org.br> as PDF file.

Acknowledgments

The authors are grateful to FACEPE (APQ-0557-1.06/15) for financial support, the LAQV-REQUIMTE of the Department of Applied Chemistry of Porto University for the use of Quantaaurus QY-C11347-11 Absolute QY

Spectrometer, the Analytical Central of the IQ-USP for the use of TEM facilities, the BSTR of the Department of Fundamental Chemistry of Federal University of Pernambuco and the Laboratório de Polímeros Não-Convencionais of the Department of Physics of Federal University of Pernambuco for the lifetime and FTIR analysis. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)-Finance Code 001. Research fellowships and scholarship granted by CNPq (proc. 303352/2015-9). The English version was revised by Sidney Pratt, Canadian, BA, MAT (The Johns Hopkins University), RSAdip (TEFL) (Cambridge University).

References

1. Abe-Matsumoto, L. T.; Sampaio, G. R.; Bastos, D. H. M.; *Cad. Saúde Pública* **2015**, *31*, 1371.
2. Santini, A.; Tenore, G. C.; Novellino, E.; *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *96*, 53.
3. Rodrigues-Delgado, M. Á.; González-Hernández, G.; Conde-González, J. E.; Pérez-Trujillo, J. P.; *Food Chem.* **2002**, *78*, 523.
4. Eleazu, C.; Obianuju, N.; Eleazu, K.; Kala, W.; *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *88*, 644.
5. Wang, Y.; Gao, Y.; Ding, H.; Liu, S.; Han, X.; Gui, J.; Liu, D.; *Food Chem.* **2017**, *218*, 152.
6. Bhuiya, S.; Haque, L.; Pradhan, A. B.; Das, S.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *95*, 177.
7. Behling, E. B.; Sendão, M. C.; Francescato, H. D. C.; Antunes, L. M. G.; Bianchi, M. L. P.; *Aliment. Nutr.* **2004**, *15*, 285.
8. Zou, Y.; Yan, F.; Zheng, T.; Shi, D.; Sun, F.; Yang, N.; Chen, L.; *Talanta* **2015**, *135*, 145.
9. Mazloom, Z.; Abdollahzadeh, S. M.; Dabbaghmanesh, M. H.; Rezaianzadeh, A.; *J. Health Sci. Surveill. Syst.* **2014**, *2*, 8.
10. Belmiro, T. M. C.; Pereira, C. F.; Paim, A. P. S.; *Microchem. J.* **2017**, *133*, 114.
11. Pejic, N.; Kuntic, V.; Vujic, Z.; Miele, S.; *Farmaco* **2004**, *59*, 21.

12. Memon, A. F.; Solangi, A. R.; Memon, S. Q.; Mallah, A.; Memon, N.; Memon, A. A.; *Food Anal. Methods* **2017**, *10*, 83.
13. Molinelli, A.; Weiss, R.; Mizaikoff, B.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1804.
14. Meena, M.; Kamboj, U.; Sharma, A.; Gaha, P.; Mishra, S.; *Int. J. Food Sci. Technol.* **2016**, *51*, 2520.
15. Liu, L.; Feng, F.; Pao, M. C.; Hu, Q.; Liu, Y.; Chen, Z.; Bai, Y.; Guo, F.; Choi, M. M. F.; *Talanta* **2015**, *144*, 390.
16. Namdari, P.; Negahdari, B.; Eatemadi, A.; *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *87*, 209.
17. Tuerhong, M.; Yang, X.; Xue-Bo, Y.; *Chinese J. Anal. Chem.* **2017**, *45*, 139.
18. Shi, W.; Wang, Q.; Long, Y.; Cheng, Z.; Chen, S.; Zheng, H.; Huang, Y.; *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6695.
19. Liu, Q.; Ma, C.; Liu, X.-P.; Wei, Y.-P.; Mao, C.-J.; Zhu, J.-J.; *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *92*, 273.
20. Wang, R.; Wang, X.; Sun, Y.; *Sens. Actuators, B* **2017**, *241*, 73.
21. Zhu, L.; Xu, G.; Song, Q.; Tang, T.; Wang, X.; Wei, F.; Hu, Q.; *Sens. Actuators, B* **2016**, *231*, 506.
22. Fong, J. F. Y.; Chin, S. F.; Ng, S. M.; *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *85*, 844.
23. Kumar, A.; Kumar, A.; Sahu, S. K.; Kumar, S.; *Sens. Actuators, B* **2018**, *254*, 197.
24. Zou, Y.; Yan, F.; Dai, L.; Luo, Y.; Fu, Y.; Yang, N.; Wu, J.; Chen, L.; *Carbon* **2014**, *77*, 1148.
25. Gunjal, D. B.; Goe, A. H.; Naik, V. M.; Pawar, S. P.; Anbhule, P. V.; Shejwal, R. V.; Kolekar, G. B.; *Opt. Mater.* **2019**, *88*, 134.
26. Sun, S.; Guan, Q.; Liu, Y.; Wei, B.; Yang, Y.; Yu, Z.; *Chinese Chem. Lett.* **2019**, *30*, 1051.
27. Wang, Y.; Hu, A.; *J. Mater. Chem. C* **2014**, *2*, 6921.
28. Guo, Y.; Wang, Z.; Shao, H.; Jiang, X.; *Carbon* **2013**, *52*, 583.
29. Jaiswal, A.; Ghosh, S. S.; Chatteropadhyay, A.; *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 407.
30. Vaz, R.; Bettini, J.; Júnior, J. G. F.; Lima, E. D. S.; Botero, W. G.; Santos, J. C. C.; Schiavon, M. A.; *J. Photochem. Photobiol., A* **2017**, *346*, 502.
31. Zhao, Y.; Liu, X.; Yang, Y.; Kang, L.; Yang, Z.; Liu, W.; Chen, L.; *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct.* **2015**, *23*, 922.
32. Bourlins, A. B.; Stassinopoulos, A.; Anglos, D.; Zhoril, R.; Karakassides, M.; Giannelis, E. P.; *Small* **2008**, *4*, 455.
33. Yang, Y.; Cui, J.; Zheng, M.; Hu, C.; Tan, S.; Xiao, Y.; Yang, Q.; Liu, Y.; *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 380.
34. Zheng, M.; Xie, Z.; Qu, D.; Li, D.; Du, P.; Jing, X.; Sun, Z.; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *24*, 13242.
35. Yang, H.; Long, Y.; Li, H.; Pan, S.; Liu, H.; Yang, J.; Hu, X.; *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, *516*, 192.
36. Huang, S.; Qiu, H.; Zhu, F.; Lu, S.; Xiao, Q.; *Microchim. Acta* **2015**, *182*, 1723.
37. Lakowicz, J. R.; *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: Baltimore, 2006.
38. Zhao, C.; Jiao, Y.; Hu, F.; Yang, Y.; *Spectrochim. Acta, Part A* **2018**, *190*, 360.
39. Zu, F.; Yan, F.; Bai, Z.; Xu, J.; Wang, Y.; Huang, Y.; Zhou, X.; *Microchim. Acta* **2017**, *184*, 1899.
40. Xiao, D.; Yuan, D.; He, H.; Gao, M.; *J. Lumin.* **2013**, *140*, 120.
41. Chen, C.; Zhou, J.; Ji, C.; *Life Sci.* **2010**, *87*, 333.
42. Cortáez-Ramírez, S.; Segura-Camero, A.; Cruces-Blanco, C.; Romero-Romero, M. L.; Fernández-Gutiérrez, A.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *380*, 831.
43. Siqueira, P. B.; Bolini, H. M. A.; Macedo, G. A.; *Aliment. Nutr.* **2008**, *19*, 491.
44. Jandera, P.; Škeřková, V.; Řehová, L.; Hájek, T.; Baldránová, L.; Škopová, G.; Kellner, V.; Homa, A.; *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 1005.
45. de Souza, G. C. S.; de Santana, E. E. A.; da Silva, P. A. B.; Freitas, D. V.; Navarro, M.; Palm, A. P. S.; Lavorante, A. F.; *Talanta* **2015**, *144*, 986.
46. Keizer, J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 1494.
47. Xu, J.; Zhu, L.; Shen, H.; Zhang, H.; Jia, X.; Yan, R.; Li, S.-L.; Xu, H.-X.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *62*, 210.
48. Betz, J. M.; Brown, P. N.; Roman, M. C.; *Fitoterapia* **2011**, *82*, 44.
49. Rezazadeh, F.; Mohammadi, M.; Afzali, D.; Shamspur, T.; Mostafavi, A.; *Food Compos. Addit.* **2015**, *98*, 1375.
50. Jeszka-skowron, M.; Krawczyk, M.; Zgoła-Grzeskowiak, A.; *J. Food Compos. Anal.* **2015**, *40*, 70.
51. Ziyadinova, G.; Kozkova, E.; Budnikov, H.; *J. Electroanal. Chem.* **2018**, *821*, 73.
52. Hu, Y.; Feng, T.; Li, G.; *Spectrochim. Acta, Part A* **2014**, *118*, 921.
53. Pejic, N.; Kuntic, V.; Vujic, Z.; Micic, S.; *II Farmaco* **2004**, *59*, 21.

Submitted: November 22, 2018

Published online: June 25, 2019