

3 Experimental

3.1.

Reagentes e Materiais

Água ultrapura (resistividade menor que 18,2 MΩ cm) foi obtida de um ultrapurificador de água da marca Millipore (EUA) modelo Milli-Q A10 gradiente). Rutina (RUT), quercetina (QUE), hesperidina (HSPD), hesperitina (HSPT), naringenina (NAR), taxifolin (TAX), morina (MOR), miricetina (MIR), canferol (CAN), catequina (CAT), galangina (GAL), flavona (FLAV), 3-hidroxiflavona (3HF), 5-hidroxiflavona (5HF), 6-hidroxiflavona (6HF), 7-hidroxiflavona (7HF), ácido ascórbico, brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB), Triton X-100, Triton X-114, borohidreto de sódio (98% pureza), ácido 2-mercaptopropiônico (2MPA), ácido 3-mercaptopropiônico (3MPA), cloreto de cádmio pentahidratado ($\text{CdCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), telúrio em pó (200 mesh, 99% pureza), acetato de cádmio dihidratado, Tris(hidroximetil)aminometano e horseradish peroxidase (HRP) foram comprados da Sigma-Aldrich (EUA). Metanol, acetonitrila, hexano, ácido acético, ácido clorídrico e hidróxido de sódio foram de grau espectral analítico da Merck (Alemanha). Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi obtido da Indústria Farmacêutica Bioquímica (Brasil). As cromatoplaças de sílica gel 60 sem indicador e com indicador de fluorescência (F_{254}) 20 x 20 cm foram obtidas da Merck. Acetato de etila, clorofórmio e sulfeto de sódio ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). O medicamento Venocur Triplex (Laboratório Abbot), contendo 300 mg de rutina e o suplemento alimentar quercetina/vitamina C (250/100 mg), foram comprados em farmácias locais. Cebolas vermelhas, amarelas e brancas foram compradas em um mercado de Niterói, Rio de Janeiro. O nitrogênio ultrapuro utilizado na síntese dos pontos quânticos e na evaporação de solventes foi adquirido da AGA (Brasil).

3.2. Instrumentação

Os espectros de fotoluminescência foram obtidos com um espectrômetro de luminescência modelo LS45 da Perkin Elmer (banda espectral passante de 10 nm e velocidade de varredura de 1200 nm min⁻¹). Os espectros de fotoluminescência com variação de temperatura foram obtidos em um LS55 acoplado a um termostato com agitador (PTP-1 Fluorescence Peltier), com um sistema Peltier de água PCB 1500, Perkin Elmer, de modo a manter as soluções da cubeta na temperatura desejada. Os espectros de absorção foram realizados em um espectrofotômetro de feixe duplo modelo Lambda 19 UV/vis/NIR da Perkin Elmer, com banda espectral passante de 10 nm e velocidade de varredura de 240 nm min⁻¹. Todas as medidas foram realizadas usando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A medida do tempo de vida fluorescente do 2MPA-CdS foi realizada usando um espectrômetro de fluorescência com resolução no tempo modelo HJY 5000 M (Horiba, Jobin, Yvon). A fonte de luz usada foi uma NanoLED com comprimento de excitação em 372 nm e duração de pulso de 1 ns. As análises cromatográficas de rotina foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent serie 1200 (Agilent Technologies, Japão), equipado com um detector de arranjo de diodo e coluna Zorbax-Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm, e tamanho da partícula de 5 µM). As análises cromatográficas de quercetina foram realizadas em um cromatógrafo da Shimadzu - série 10 A (Shimadzu, Japão) equipado com detector de arranjo de diodo e coluna Phenomenex C8 (250 x 4 mm, e tamanho da partícula de 5 µM). As pesagens das substâncias sólidas foram feitas em uma balança analítica da marca Shimadzu, modelo AUW220D com precisão de 0,01 mg. Para os ajustes de pH, foi utilizado um pHmetro modelo MPA 210, versão 2.3, da Tecnon. A degaseificação dos solventes requerida para adequada utilização em HPLC foi realizada em um banho ultrassônico modelo USC 1800 (Unique, Brasil).

3.3. Síntese dos QDs de 2MPA-CdS

A síntese de 2MPA-CdS foi feita de acordo com o método descrito na literatura por Acar *et al.* (2009), com pequenas modificações. Em um copo Becker de 100 mL foram adicionados 0,24 mmol de acetato de cádmio dihidratado e 50,0 mL de água ultrapurificada. Após completa solubilização, a solução foi transferida para um balão de fundo redondo de 250 mL equipado com duas saídas (uma central e uma lateral). Em seguida adicionou-se 1,2 mmol de ácido 2-mercaptopropiônico (2MPA) e o pH foi ajustado para 7,5 pela adição de pequenos volumes de uma solução NaOH 0,1 mol L⁻¹. Posteriormente, o balão foi devidamente vedado com septos de borracha. Em uma das saídas foi inserida uma agulha pequena e na outra uma agulha de aço inox de 10 cm, conectada a uma fonte de nitrogênio. O sistema foi purgado por 30 min para que todo oxigênio presente no meio fosse eliminado. Após esta etapa, 1,0 mL de uma solução aquosa de Na₂S 0,10 mol L⁻¹ foi adicionada lentamente ao balão com auxílio de seringa. A solução foi mantida sob agitação por 30 min à temperatura de 25 °C, quando observou-se o aparecimento de uma coloração amarelada que é característica de dispersão aquosa de 2MPA-CdS. A purificação das nanopartículas foi feita através de precipitação pela adição de etanol ao meio, em seguida fez-se a centrifugação a 3000 rpm e o precipitado foi lavado com etanol e por fim os nanocristais foram dispersos em 50,00 mL de água e armazenados sob refrigeração ao abrigo da luz. A Figura 7 ilustra resumidamente o processo de síntese das nanopartículas de 2MPA-CdS.

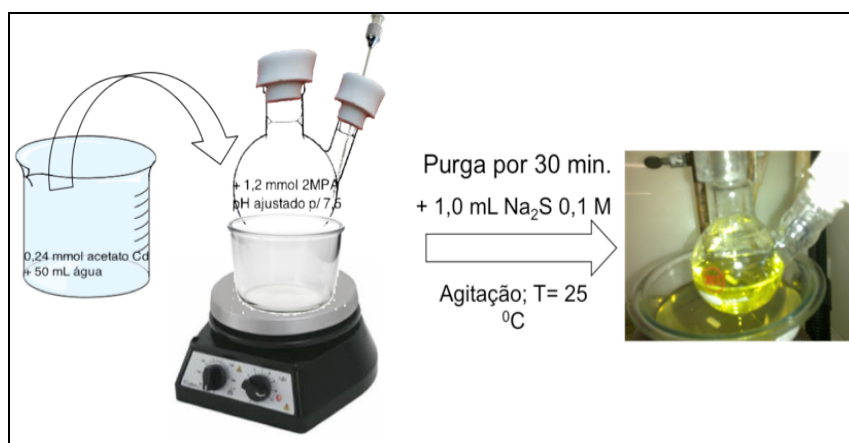


Figura 7 - Processo de síntese dos QDs de 2MPA-CdS.

3.4. Síntese dos QDs de 3MPA-CdTe

A síntese dos QDs de 3MPA-CdTe foi realizada de acordo com o método descrito na literatura por Gu *et al.* (2008), com uma pequena modificação no tempo de reação. Em um copo Becker de 100 mL foram adicionados 40,0 mL de água ultrapura, 0,20 mmol de CdCl₂ e 0,4 mmol de ácido 3-mercaptopropiônico (3MPA), em seguida o pH da solução resultante foi ajustado para 10,0 pela adição de pequenos volumes de NaOH 0,1 mol L⁻¹ sob agitação constante. A solução foi adicionada a um balão de fundo redondo de 125 mL equipado com duas saídas (uma central e outra lateral) e a um condensador de refluxo. Posteriormente uma saída do balão e saída superior do condensador de refluxo foram devidamente vedadas com septos de borracha. Na saída do condensador foi inserida uma agulha pequena e na saída da boca lateral do balão foi inserida uma agulha de aço inox de 10 cm, conectada a uma fonte de nitrogênio para purgar o sistema por 50 min, para que todo oxigênio presente no meio fosse eliminado. Concomitantemente, uma solução do precursor NaHTe foi preparada em balão de fundo redondo de 50 mL pela adição de 0,051 g de telúrio em pó, 37,8 mg de borohidreto de sódio e 10,0 mL de água ultrapura (previamente deixada em atmosfera de nitrogênio para remoção de oxigênio). A solução foi purgada com nitrogênio por 30 min e posteriormente mantida sob aquecimento em banho-Maria até a completa solubilização do telúrio e o aparecimento de uma coloração bordô. Imediatamente, uma alíquota de 2,0 mL dessa solução foi transferida com auxílio de agulha e seringa para o balão de 125 mL, à temperatura ambiente e sob agitação magnética. Desta forma, a razão de Cd:MPA:Te na solução final foi de 1:2:0.2. A mistura foi aquecida à temperatura de 100 °C sob refluxo e atmosfera inerte de oxigênio até atingir o comprimento de onda de emissão desejado (527 nm). O controle do tamanho médio das partículas foi feito por meio do monitoramento da fotoluminescência de alíquotas retiradas periodicamente do reator. A Figura 8 ilustra resumidamente o processo de síntese dos QDs de 3MPA-CdTe.

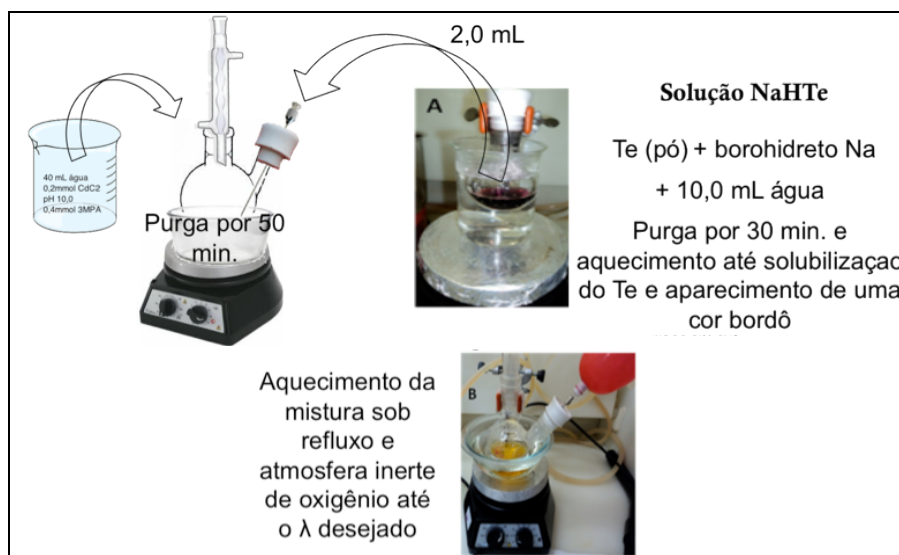


Figura 8 – Processo de síntese dos QDs de 3MPA-CdTe.

3.5.

Medições de fotoluminescência e de absorção no UV-vis

Os comprimentos de onda excitação/emissão ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$) utilizados para as medições de fotoluminescência foram fixadas em 387/498 nm e 415/515 nm para as dispersões dos QDs de 2MPA-CdS; e 460/527 para as dispersões dos QDs de 3MPA- CdTe em meio aquoso, sem a presença de surfactante, e 460/529 nm para as dispersões em meio aquoso contendo CTAB. O tempo de vida da fotoluminescência foi obtido por um processo de deconvolução matemática para resolução do decaimento fotoluminescente a partir de uma fonte pulsada da ordem de ns. Para tal, foram realizadas três medições independentes para a obtenção da média de cada parâmetro analisado. Após o preparo das soluções de trabalho, esperou-se um tempo de 30 min. para a realização das medições de tempo de vida. Os espectros de absorção das soluções dos flavonóides, das dispersões aquosas dos QDs (organizadas com surfactante e sem surfactante) tanto na presença quanto na ausência dos flavonóides foram obtidos, sendo as absorvâncias monitoradas nos comprimentos de ondas de emissão e de excitação dos QDs.

3.6. Determinação do rendimento quântico

O rendimento quântico (ϕ) das dispersões estoque dos QDs de 2MPA-CdS e de 3MPA-CdTe foram estimados na temperatura ambiente, a partir de cálculos comparativos referentes a um fluoróforo padrão, utilizando-se dispersões aquosas dos QDs e soluções padrão de referência de rodamina B.

Para o cálculo do rendimento quântico dos QDs de 2MPA-CdS foram preparadas dispersões aquosas pela adição de alíquotas da dispersão estoque dos QDs (50; 100; 150 e 200 μL) em 10,00 mL de água ultrapura (índice de refração da água de 1,33) e uma solução diluída de rodamina B em etanol ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Alíquotas da solução de rodamina B (50; 60; 80; 100 e 120 μL) foram diluídas em etanol (índice de refração do etanol de 1,36). As soluções de rodamina B e as dispersões dos QDs de 2MPA-CdS foram analisadas nos espectrofotômetros de absorção e de luminescência de modo a se construir um gráfico de intensidade de fotoluminescência integrada versus a absorvância.

Para o cálculo do rendimento quântico dos QDs de 3MPA-CdTe foram preparadas dispersões pela adição de alíquotas da solução estoque dos QDs (60; 80; 100 e 130 μL) em 10,00 mL de água ultrapura. Alíquotas de uma solução etanólica $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de rodamina B (60; 80; 100 e 130 μL) foram diluídas em etanol (índice de refração 1,36). Como descrito, o rendimento quântico foi obtido a partir de um gráfico de intensidade de fotoluminescência integrada em função da absorvância.

As medições da luminescência destas soluções foram realizadas fixando-se o comprimento de onda de excitação em 355 nm. O rendimento quântico foi calculado através da Equação 8 (Horiba)

$$\phi_X = \phi_{ST} (\text{Grad}_X / \text{Grad}_{ST}) (\eta_X^2 / \eta_{ST}^2) \quad (8)$$

Onde ϕ_X (ϕ_{ST}), Grad_X (Grad_{ST}) e η_X (η_{ST}) representam respectivamente o rendimento quântico, a inclinação da curva entre a intensidade da luminescência integrada em função da absorvância e o índice de refração das dispersões dos QDs (representada pelo X) e da solução padrão (representada pelo ST), no caso a rodamina B.

3.7.

Determinação de Rutina

3.7.1.

Preparo das soluções padrão, dispersões de trabalho e amostras

Soluções estoques de padrões de flavonóides nas concentrações $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ e $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foram preparadas pela dissolução de quantidades apropriadas dos flavonoides (RUT, HSPD, HSPT ou QUE) em metanol. Solução estoque de peróxido de hidrogênio $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e enzima horseradish peroxidase (HRP) $5,0 \times 10^{-4}$ g mL⁻¹ foram preparadas em água ultrapura. O tampão Tris ($0,050$ mol L⁻¹) foi preparado em água e o pH foi ajustado pela adição de HCl $1,0$ mol L⁻¹.

As dispersões de trabalho contendo os QDs de 2MPA-CdS foram preparadas em balões volumétricos de 10,00 mL pela adição de 1,0 mL de tampão Tris $0,050$ mol L⁻¹ (pH 7,4), 60 µL da dispersão aquosa de trabalho dos QDs de 2MPA-CdS, 1,0 mL de acetonitrila além de volumes apropriados de solução estoque de rutina $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Volumes complementares de metanol foram adicionados às dispersões, de modo a obter um volume total de metanol em cada dispersão final de trabalho de 2,0 mL (20% em volume) de modo a compensar a carga de metanol das dispersões contendo as amostras. Água ultrapura foi adicionada ao balão volumétrico até completar o volume de 10,00 mL. Após 30 min, foram realizadas as medições de sinal das dispersões de trabalho no espectrômetro de luminescência.

Para os testes com o sistema HRP/H₂O₂, 50 µL de rutina $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foram adicionados num balão volumétrico de 10,00 mL contendo a dispersão aquosa de trabalho (300 µL of 2MPA-CdS), 1,0 mL de tampão Tris ($0,050$ mol L⁻¹ pH 7,4), 75 µL de solução de H₂O₂ ($1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) e 70 µL de solução de HRP ($5,0 \times 10^{-4}$ g mL⁻¹). Volumes complementares de metanol foram adicionados de modo a obter um volume específico deste álcool na dispersão de trabalho (adição de 2,0 mL na dispersão dos QDs de 2MPA-CdS). Posteriormente, o volume do balão foi completado com água ultrapura até a marca. A medição de luminescência foi realizada após um tempo de 30 min para

os QDs de 2MPA-CdS. A medição do branco foi feita com a dispersão de trabalho na ausência de rutina.

Para os testes de interferência, foram preparadas dispersões aquosas dos QDs de 2MPA-CdS contendo $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ rutina e dispersões dos QDs de 2MPA-CdS contendo $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ rutina e interferente (HSPD ou HSPT) em proporções rutina:Interferente de 1:1, 1:5 e 1:10.

Para a análise das amostras, dez comprimidos da formulação farmacêutica Venocur Triplex, contendo 300 mg de rutina por cápsula, foram pesadas e pulverizadas a fim de obter um valor de massa médio de cada comprimido, bem como a quantidade média do princípio ativo. Uma solução da amostra de Venocur Triplex ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina) foi preparada pela adição de uma quantidade apropriada do material, na forma pulverizada, em metanol. A mistura foi colocada em uma seringa e filtrada em um filtro PTFE $0,45 \mu\text{m}$. Em seguida, a solução foi coletada em um balão volumétrico de 10,00 mL e o volume completado com metanol. A dispersão aquosa da amostra foi preparada pela adição de 1,0 mL de tampão Tris ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4), 60 μL da dispersão dos QDs de 2MPA-CdS, 1,0 mL de acetonitrila, 2,0 mL de metanol e volumes apropriados da solução da amostra de modo a obter soluções $1,0 \times 10^{-5}$ e $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ rutina (concentração estimada).

A amostra simulada de RUT $1,0 \times 10^{-5}$ contendo HSPD e HSPT em proporções molares 1:10:10 RUT:HSPD:HSPT foi preparada pela adição de 100 μL de solução RUT ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), 100 μL de solução HSPD ($1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e 100 μL de solução HSPT ($1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), a um balão volumétrico contendo 1,0 mL de tampão Tris ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4), 60 μL da dispersão dos QDs de 2MPA-CdS, 1,0 mL de acetonitrila e 2,0 mL de metanol.

As amostras de saliva humana foram coletadas de um voluntário saudável que não tinha recebido qualquer medicação anterior. O voluntário rinsou a boca por 5 min com água ultrapura e então 1,0 mL da saliva foi imediatamente coletada em um tubo graduado. Às alíquotas da saliva coletada (volumes de 100 μL) foram adicionadas a 100 e 200 μL de solução de rutina ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) sendo então levadas a condição de trabalho da sonda dos QDs de 2MPA-CdS (conforme descrito) em balões volumétricos de 10,00 mL.

3.7.2.

Cromatografia em camada fina para separação e isolamento de rutina em amostras simuladas contendo quercetina

A curva de calibração da rutina foi obtida através da aplicação de diferentes volumes de uma solução padrão de rutina $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (em metanol) em placas de cromatografia em camada fina (TLC) com indicador de fluorescência (5.0 x 8.0 cm). Após a secagem do metanol, as placas foram colocadas em copos Becker (tampado com vidro relógio para que não ocorresse perda de solvente por evaporação), contendo o eluente (acetato de etila/hexano/ácido acético 24/15/1 em volume). Em soluções contendo rutina/quercetina, ao se utilizar esta fase móvel, a rutina permaneceu no ponto de aplicação, enquanto que a quercetina é arrastada pela fase móvel. Após a separação, rutina foi removida das placas (juntamente com a sílica), através da raspagem do local onde foi aplicada, este material foi colocado em copos Becker de 10 mL. A massa total de rutina + sílica foi mantida em 0,05 g. Em seguida 2,0 mL de metanol foram adicionados aos copos Becker, e estes foram colocados em um banho ultrassônico por 5 min. Logo após, passou-se as misturas por filtros (PTFE 0,45 μm) e as soluções de rutina em metanol foram coletadas em balões volumétricos de 10,00 mL. O solvente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e o material contido em cada balão resolubilizado nas condições de trabalho (dispersão coloidal ou em 2,0 mL de metanol) e o volume completado para 10,00 mL com água ultrapura de modo a ser analisado por espectrometria de luminescência pelo método proposto ou por HPLC. A técnica de TLC foi aplicada em amostras simuladas contendo rutina e quercetina em proporções 1:1 e 1:2. A Figura 9 representa o procedimento utilizado para separação e isolamento de rutina. A visualização da eluição e separação dos componentes pela cromatoplaça foi feita em uma câmara de revelação com luz UV no comprimento de onda de 254nm.

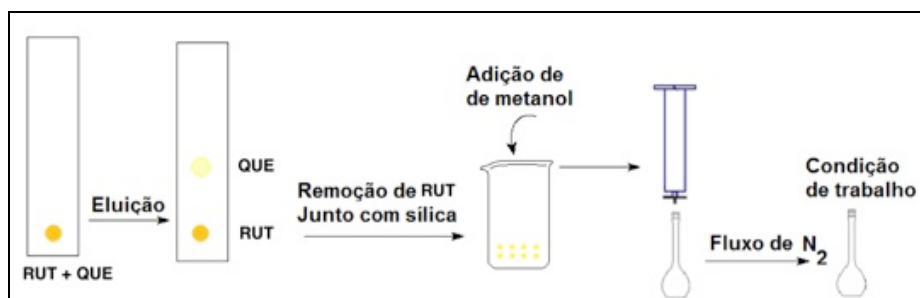


Figura 9 - Procedimento de cromatografia em camada fina para separação e isolamento de rutina (RUT) em amostras simuladas contendo rutina e quercetina (QUE).

3.7.3.

Análises de cromatografia líquida de alta eficiência

Amostras de formulação farmacêutica e amostras de saliva fortificadas com rutina foram também analisadas por HPLC usando método adaptado da literatura de modo a comparar os resultados obtidos com o método proposto. A detecção foi realizada por absorciometria em 254 nm e a eluição foi feita em regime isocrático utilizando-se uma fase móvel constituída de 60% (em volume) de água/ácido acético 99/1% (v/v) e 40% (em volume) de metanol/acetonitrila 90/10% (v/v) com uma taxa de fluxo de 1,0 mL min⁻¹. O tempo de retenção da rutina foi de 4,6 min. As curvas analíticas foram construídas pela injeção de diferentes volumes de uma solução padrão de rutina $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

3.8.

Determinação de Quercetina

3.8.1.

Preparo das soluções padrão, dispersões e amostras

Soluções padrões estoques $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ foram preparadas pela dissolução de quantidades apropriadas dos flavonóides quercetina, rutina, HSPT, NAR, CAT, CANF, MOR, MIR, TAX, GAL e FLAV em metanol. Tampão fosfato (de 0,01 a 0,04 mol L⁻¹) foi preparado pela adição de soluções aquosas de fosfato monossódico (de 0,01 a 0,04 mol L⁻¹) e dissódico (de 0,01 a 0,04 mol L⁻¹).

¹), sendo o pH ajustado pela adição de um ou outro sal. A curva analítica da quercetina foi obtida pela adição de diferentes alíquotas do flavonóide a balões volumétricos de 10,00 mL, contendo 1,0 mL de tampão fosfato (0,01 mol L⁻¹ pH 7,4); 1,0 mL de metanol e 60 µL da dispersão aquosa estoque dos QDs de 3MPA-CdTe. O volume de cada solução presente nos balões foi completado com água ultrapura até o menisco. As dispersões dos brancos foram preparadas conforme descrito, contudo sem adição de quercetina. As medições de luminescência foram realizadas após 45 min ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de 460/527 nm).

As dispersões utilizadas nos testes de interferência foram preparadas em balões volumétricos de 10,00 mL pela adição de 1,0 mL de tampão fosfato (0,01 mol L⁻¹ pH 7,4), 1,0 mL metanol, 60 µL da dispersão aquosa estoque dos QDs de 3MPA-CdTe, alíquotas de soluções padrões 1,0 x 10⁻² mol L⁻¹ de quercetina e interferentes (demais flavonóides) e alíquotas de soluções de ácido ascórbico 7,0 x 10⁻³ mol L⁻¹. As proporções molares quercetina e interferente foram fixadas em 1:1 e 1:2 em três níveis de concentração de quercetina 5,0 x 10⁻⁶, 3,0 x 10⁻⁵, e 6,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹). Os flavonóides potencialmente interferentes foram os indicados mais acima. As proporções molares quercetina:ácido ascórbico foram 1:1; 1:2; 1:5; 1:10 e 1:20 para uma concentração de quercetina de 2,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ (o que inclui a proporção equivalente em massa de componentes declarada pelo fabricante de 250 e 100 mg/cápsula de quercetina e ácido ascórbico). Por fim os balões volumétricos foram avolumados até a marca pela adição de água ultrapura.

Para as análises do suplemento alimentar contendo quercetina e ácido ascórbico, pesou-se, individualmente, o conteúdo interno de dez cápsulas do suplemento. Após ser feita a média destes valores, uma relação entre o valor médio obtido e a quantidade de quercetina declarada pelo fabricante foi obtida. Soluções da amostra de suplemento (estimada em 1,0 x 10⁻² mol L⁻¹ de quercetina) foram preparadas pela adição de quantidades apropriadas do material sólido solubilizadas em metanol. A mistura foi filtrada em um filtro PTFE de 0,45 µm, e as soluções foram coletadas em um balão volumétrico de 10,00 mL (volume completado com metanol). A dispersão aquosa da amostra foi preparada pela adição de 1,0 mL de tampão fosfato (0,01 mol L⁻¹; pH 7,4), 60 µL da dispersão dos QDs de 3MPA-CdTe, 1,0 mL de metanol e volume apropriado da

solução da amostra de modo a obter uma solução $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ quercetina (concentração estimada).

As soluções para a construção da curva analítica usando o HPLC foram obtidas por adições de diferentes volumes da solução estoque de quercetina $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (10 a 60 μL) em balões volumétricos de 10,00 mL e avolumados com metanol. As soluções das amostras do suplemento para as análises por HPLC foram preparadas em dois níveis de concentração ($1,0 \times 10^{-5}$ e $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, concentrações estimadas) em metanol.

3.8.2.

Preparo dos extratos da cebola

A quercetina presente em cascas de cebola foi extraída de acordo com método proposto por Hertog *et al.* (1992) com pequenas modificações. As cascas das cebolas foram lavadas com água ultrapura, em seguida permaceram em temperatura ambiente por 24 h expostas ao ar para que fossem secas. Posteriormente pesou-se 10,0 g de cada tipo de cebola (vermelha, amarela e branca), em seguida as cascas foram cortadas em pedaços pequenos e colocadas em balão de fundo redondo de 250 mL, contendo 80,0 mL metanol e 20,0 mL de HCl $1,2 \text{ mol L}^{-1}$. A mistura permaneceu sob refluxo por 2 h a 90°C . Os extratos foram transferidos para copos Becker, filtrados e concentrados em placa de aquecimento com temperatura ajustada em torno de 60°C para evaporação de solvente. Por fim o volume final de cada extrato foi completado para 10,00 mL pela adição de quantidades apropriadas de metanol. Para cada tipo de cebola foram obtidos três extratos independentes.

3.8.3.

Cromatografia em camada fina para separação e isolamento de quercetina em extratos de cebola

A curva de calibração da quercetina foi obtida através de aplicações de diferentes volumes de uma solução padrão de quercetina $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (em metanol) sob as placas de TLC (sem indicador de fluorescência) com dimensões de 5,0 x 8,0 cm. Após a secagem do metanol, as placas foram colocadas em

copos Becker (estes foram tampados com vidro relógio para que não ocorresse evaporação da fase móvel), contendo o eluente (hexano/acetato de etila/ácido acético 20/19/1, proporção em volume). Após a cromatografia, a quercetina foi removida das placas juntamente com a sílica gel e o sólido resultante (0,05 g) foi colocado em copos Becker de 10 mL. Em seguida, 3,0 mL de metanol foram adicionados em cada copo, e as misturas foram levadas ao banho ultrassônico por 5 min. Em seguida, fez-se a filtração das misturas com auxílio de seringas e filtros de PTFE (0,45 μm) e as soluções foram coletadas em balões volumétricos de 10,00 mL. O solvente foi evaporado sobre fluxo de nitrogênio e o conteúdo de cada balão foi redissolvido nas condições de trabalho.

A abordagem por TLC foi utilizada para separação e isolamento de quercetina dos outros constituintes da matriz, por meio da adição de alíquota de 15 μL do extrato na cromatoplaça (sem indicador de fluorescência). Após a eluição do analito de interesse (quercetina) pela fase móvel, este foi removido das placas por meio da raspagem da fase estacionária na região do R_f característico da quercetina. Após as etapas de filtração e evaporação do solvente, o conteúdo de cada balão foi redissolvido com a dispersão aquosa dos QDs nas condições de trabalho. O preparo das soluções com os extratos que não foram submetidos ao procedimento cromatográfico (TLC) foi feito com a adição de 15 μL de extrato em um balão volumétrico de 10,00 mL contendo 1,0 mL de tampão fosfato (0,01 mol L^{-1} pH 7,4) e 1,0 mL de metanol. O volume final da solução foi ajustado com água ultrapura. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A Figura 10 representa o procedimento de cromatografia em camada fina utilizado para separação e isolamento de quercetina em amostras de extratos de cebola. A visualização da eluição foi feita a olho nú, uma vez que a quercetina e demais componentes do extrato possuem coloração bem definida.

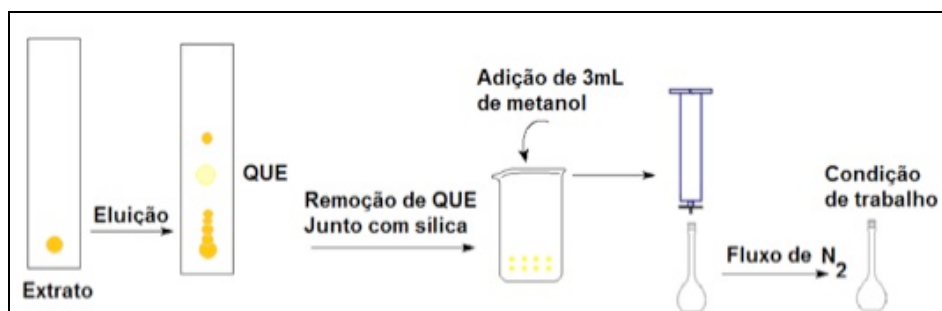


Figura 10 – Procedimento de cromatografia em camada fina para separação e isolamento de quercetina (QUE) em amostras de extratos de cebola.

3.9.

Sonda dos QDs de 3MPA-CdTe em meio organizado com agregados de surfactantes na presença de flavonóides: Preparo das soluções padrão e dispersões

Soluções padrões estoques $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas pela dissolução de quantidades apropriadas dos flavonóides (QUE, RUT, HSPT, NAR, CAT, CANF, MOR, MIR, TAX, FLAV, 3HF, 5HF, 6HF e 7HF) em metanol. O tampão fosfato (de 0,01 a $0,04 \text{ mol L}^{-1}$) foi preparado pela adição de soluções aquosas de fosfato monossódico e dissódico, sendo o pH ajustado pela adição de um sal ou de outro. As soluções do surfactante CTAB (de $5,0 \times 10^{-3}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) foram preparadas pela adição de quantidades apropriadas de CTAB em água ultrapura. As soluções permaneceram por 10 min em um ultrassom para completa solubilização do surfactante em água. As soluções dos surfactantes Triton X-100 e Triton X-114 foram preparadas na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ pela adição de quantidades apropriadas dos surfactantes em água ultrapura.

As dispersões de trabalho foram preparadas em balões volumétricos de 10,00 mL pela adição de 1,0 mL de tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4), 80 μL de dispersão estoque dos QDs de 3MPA-CdTe ($1,54 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$), 8,82 mL de dispersão estoque de CTAB ($1,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) sendo o complemento ajustado pela adição de alíquotas (de 0 a 100 μL) de solução estoque de flavonóides e/ou água ultrapura. Desta maneira todas as dispersões de trabalho tiveram as concentrações fixas de $1,2 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ de QDs de 3MPA-CdTe, $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato e $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de CTAB. As medições

fotoluminescentes foram obtidas após 20 min ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 460/529 nm). As medições dos brancos foram realizadas com as dispersões de trabalho na ausência de flavonóides.