



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

LEILA SANTANA VIANA BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE AMINOÁCIDOS COM PONTOS
QUÂNTICOS DE CdTe RECOBERTOS COM GLUTATIONA PARA ANÁLISE
DE URINA E SUPLEMENTOS ALIMENTARES**

Salvador

2019

LEILA SANTANA VIANA BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE AMINOÁCIDOS COM PONTOS
QUÂNTICOS DE CdTe RECOBERTOS COM GLUTATIONA PARA ANÁLISE
DE URINA E SUPLEMENTOS ALIMENTARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo Melo Magalhães Santana

Salvador

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Santana Viana Barbosa, Leila
Avaliação da Interação de Aminoácidos com Pontos
Quânticos de CdTe Recobertos com Glutathione para
Análise de Urina e Suplementos Alimentares / Leila
Santana Viana Barbosa. -- Salvador, 2019.
76 f. : il

Orientador: Rodolfo Melo Magalhães Santana.
Dissertação (Mestrado - Química) -- Universidade
Federal da Bahia, Instituto de Química, 2019.

1. Métodos Luminescentes. 2. Teste clínico. 3.
Controle qualidade alimentos. 4. L-histidina. I. Melo
Magalhães Santana, Rodolfo. II. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

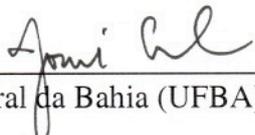
LEILA SANTANA VIANA BARBOSA

“AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE AMINOÁCIDOS COM PONTOS QUÂNTICOS DE CdTe RECOBERTOS COM GLUTATIONA PARA ANÁLISE DE URINA E SUPLEMENTOS ALIMENTARES”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Rodolfo de Melo Magalhães Santana 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Andrade Korn 
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Josué Carinhonha Caldas Santos 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Alagoas

Salvador, 28 de junho de 2019.

Dedico esta dissertação à minha grande avó Raimunda (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

As agências de fomento, CNPq, CAPES e Fapesb, pelo apoio financeiro concedido.

A Deus por ser minha fonte de força e por renovar a minha fé todos os dias.

Aos meus pais, Josimeire e Luiz, pelo amor incondicional, apoio, cumplicidade, carinho e suporte, sem os quais essa caminhada não teria sido tão gratificante.

A Igor, por todo amor, incentivo, companheirismo e paciência ao longo desses anos. Por tudo que conquistamos juntos e pelo que há de vir.

A minha família, tios, tias, primos e primas, pela torcida e boas vibrações.

Aos meus avós por serem fonte de inspiração, em especial ao meu avô José e à minha avó Raimunda, que onde quer que estejam me guiam fielmente.

Aos meus irmãos científicos e companheiros do GPQA, pela convivência, suporte e leveza que trazem ao meu dia-a-dia, contribuindo para o meu crescimento.

Aos meus amigos de infância, pelo que cada um representa. A Luana, Mayane, Juliana H., Carim, Lucas e Guilherme pela grande amizade que construímos e pelos anos bem vividos na escola e na vida.

A Thiago, Juliana T. e Taiana por compartilharem comigo do mesmo sonho e amor pela Química, por tudo somos e construímos.

Ao professor Rodolfo por sua orientação e todo incentivo. Por todos os ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal, por toda paciência e parceria ao longo desses anos.

Aos professores Maria das Graças A. Korn e Josué Carinhanha, por aceitarem o convite, compondo a banca examinadora desse trabalho.

Aos profissionais do Instituto de Química da UFBA, por todo o suporte.

A todos, o meu muito obrigada!

BARBOSA, L. S. V. - Avaliação da interação de aminoácidos com pontos quânticos de CdTe recobertos com glutathiona para análise de urina e suplementos alimentares – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2019.

RESUMO

Os aminoácidos (AA) são os principais constituintes das proteínas, sendo que a sua deficiência ou acúmulo acarreta em danos à saúde. Diferentes métodos foram desenvolvidos com uso de pontos quânticos (QD), como sondas fotoluminescentes para determinação indireta de AA em diferentes matrizes. Esses métodos se basearam na estratégia *on-off-on*, que consiste na remoção dos supressores (usualmente espécies metálicas) da superfície do QD pela interação com os analitos. Assim, o presente trabalho visa a avaliação da interação direta de QD e diferentes AA para o desenvolvimento de métodos analíticos e sua aplicação em amostras de urina e suplementos. Ensaios de sensibilização dos QD de CdTe recoberto com glutathiona (GSH-CdTe) com diferentes tamanhos foram realizados frente a sete aminoácidos isoladamente e divididos de acordo com as propriedades de sua cadeia lateral. Estudos das nanosondas com diferentes temperaturas e força iônica foram realizados para avaliação dos mecanismos preferenciais de supressão do sinal de emissão do QD e tipo de interação AA-QD. Parâmetros químicos do meio, tais como pH (5 a 10), concentração do tampão (0,1 a 0,8 mol L⁻¹), tamanho (2,2 a 3,0 nm) e concentração (2,5 a 35 μmol L⁻¹) do QD foram avaliados para assegurar maior sensibilidade ao método. Foi observado que os AA que possuem carga positiva ou cadeias polares neutras, nomeadamente a L-histidina (His) e L-treonina (Thr), causaram a supressão de até 90% da luminescência dos nanocristais. A avaliação dos parâmetros reacionais demonstra que em tampão amoniacal (0,25 mol L⁻¹) a pH 8,0 o nanocristal de 2,2 nm respondia unicamente a His, indicando alta seletividade da sonda luminescente ao analito. Estudos acerca do mecanismo de supressão da emissão do QD e interação His-QD indicaram a ocorrência de *quenching* estático com variação da constante de associação do complexo (K_{sv}) variando de 2,8x10 a 0,94x10 L mol⁻¹ nas temperaturas de 20 a 35°C. Foram determinados os parâmetros termodinâmicos da interação His-QD por meio das equações de Van' Hoff, obtendo valores de ΔH= -76,5 kJ mol⁻¹, ΔS= -227,4 J K⁻¹ mol⁻¹ e ΔG de -9,8 a -6,4 kJ mol⁻¹ (T= 20 a 35°C). Adicionalmente, não foi observada variação do K_{sv} (ΔK_{sv}<11%) devido a alteração da força iônica do meio indicando preferencialmente interações por força de Van der Waals e/ou ligação de hidrogênio. Foi constatado ocorrência de paralelismo entre as curvas analíticas em meio aquoso e amostra indicando a ausência de efeito de matriz. Nas condições ótimas o método desenvolvido apresentou faixa linear de trabalho de 2,5 a 35 mmol L⁻¹ (r = 0,9970, n = 7). O limite de detecção igual a 1,6x10⁻⁴ mol L⁻¹ (0,025 mg mL⁻¹), apresentando boa precisão com RSD<2,5% (para 2,5 e 20 mmol L⁻¹; n= 6). A exatidão do método foi avaliada por meio dos ensaios de adição e recuperação para dois a três níveis de concentração em triplicata real em amostras de urina e suplemento, apresentando valores de recuperação adequados para ambas as amostras dentro da faixa de 80 a 120% demonstrando boa exatidão. O método foi aplicado em amostras de urina e suplemento de cloridrato de L-histidina. Não foi detectado histidina nas amostras de urina analisada, por outro lado, nas amostras de suplemento foi determinado His em quantidades iguais a 134,5 ± 5,0 e 417,2 ± 0,2 mg por tablete.

Palavras-chave: . Métodos Luminescentes. Teste clínico. Controle qualidade alimentos. L-histidina.

ABSTRACT

Amino acids (AA) are the main constituents of proteins, and their deficiency or accumulation leads to health damage. Different methods were developed with the use of quantum dots (QD), as photoluminescent probes for indirect AA determination in different matrices. These methods were based on the on-off-on strategy, which consists in removing the suppressors (usually metal species) from the QD surface by interaction with the analytes. Thus, the present work aims to evaluate the direct interaction of QD and different AA for the development of analytical methods and its application in urine samples and supplements. Sensitization assays of glutathione-coated CdTe QD (GSH-CdTe) with different sizes were performed against seven amino acids alone and they were divided according to the properties of their side chain. Studies on nanoprobe with different temperatures and ionic strength were performed to evaluate the suppression mechanisms of QD emissions and type of AA-QD interaction. Chemical parameters of the medium, such as pH (5 to 10), buffer concentration (0.1 to 0.8 mol L⁻¹), size (2.2 to 3.0 nm) and concentration (2.5 to 35 μmol L⁻¹) of the QD were evaluated to ensure greater sensitivity to the method. It was observed that AAs that have a positive charge or neutral polar chains, namely L-histidine (His) and L-threonine (Thr), have caused the suppression of up to 90% of the luminescence of nanocrystals. The evaluation of the reaction parameters shows that in ammoniacal buffer (0.25 mol L⁻¹) at pH 8.0 the nanocrystal of 2.2 nm responded solely to His, indicating high selectivity of the luminescent probe to the analyte. Studies on the His-QD mechanism suppression of QD emission and interaction indicated the occurrence of static quenching with variation of the complex association constant (K_{sv}) ranging from 28.1x10 to 0.94x10 L mol⁻¹ at temperatures of 20 to 35° C. The thermodynamic parameters of the His-QD interaction were determined using the Van 'Hoff equations, obtaining values $\Delta H = -76.5$ kJ mol⁻¹, $\Delta S = -227.4$ J K⁻¹ mol⁻¹ and ΔG de -9.8 a -6.4 kJ mol⁻¹ (T= 20 a 35°C) In addition, no variation of K_{sv} ($\Delta K_{sv} < 11\%$) was observed due to the change in the medium ionic strength indicating preferentially interactions by Van der Waals force and/or hydrogen bonding. Parallelism was observed between the analytical curves in aqueous medium and sample indicating the absence of matrix effect. Under optimal conditions the developed method presented a linear range of 2.5 to 35 mmol L⁻¹ ($r = 0.9970$, $n = 7$). The detection limit was 1.6x10⁻⁴ mol L⁻¹ (0,025 mg mL⁻¹), showing good precision with RSD <2.5% (for 2.5 and 20 mmol L⁻¹; $n = 6$). The accuracy method was evaluated by addition and recovery assays for two to three concentration levels in real triplicate in urine and supplement samples, presenting adequate recovery values for both samples, in the range 80 to 120%, demonstrating good accuracy. The method was applied to urine samples and L-histidine hydrochloride supplement. Histidine was not detected in urine samples. On the other hand, in supplement samples, His was determined in amounts equal to 134.5 ± 5.0 and 417.2 ± 0.2 mg per tablet.

Keywords: Luminescent methods. Clinical assay. Food quality control. L-histidine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aminoácidos
QD	Pontos quânticos, do inglês <i>Quantum dots</i>
MPA	Ácido mercaptopropiónico
TGA	Ácido tioglicólico
GSH	Glutathiona
GSH-CdTe	Ponto quântico de telureto de cádmio revestido com glutathiona
AA-QD	Interação entre aminoácido e ponto quântico
GSH-CdTe-His	Interação entre histidina e ponto quântico de telureto de cádmio revestido com glutathiona
UPLC	Cromatografia líquida de ultra performance, do inglês <i>Ultra performance liquid chromatography</i>
LC	Cromatografia líquida, do inglês <i>Liquid chromatography</i>
GC	Cromatografia gasosa, do inglês <i>Gas chromatography</i>
MS	Espectrometria de massas, do inglês <i>Mass spectrometry</i>
MIP	Polímero molecularmente impresso, do inglês <i>Molecularly Imprinted Polymer</i>
LOD	Limite de detecção, do inglês <i>Limit of detection</i>
LOQ	Limite de quantificação, do inglês <i>Limit of quantification</i>
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês <i>relative standard deviation</i>
CLOA	Combinação linear dos orbitais atômicos
ET	Transferência de elétron, do inglês <i>electron transfer</i>
RET	Transferência de energia por ressonância, do inglês <i>resonance energy transfer</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos analíticos para determinação de AA utilizando QD como sondas fotoluminescentes.....	24
Tabela 2. Ensaio para as análises dos diferentes aminoácidos frente aos QD.	34
Tabela 3. Ensaio para a avaliação da influência da acidez do meio reacional na interação AA/QD.	35
Tabela 4. Caracterização das propriedades óticas dos QD sintetizados.	40
Tabela 5. Parâmetros de Stern-Volmer para o sistema GSH-CdTe-his em diferentes temperaturas (Dados: $C_{QD} = 20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; $C_{His} = 0$ a $0,035 \text{ mol L}^{-1}$; pH 8,0).....	49
Tabela 6. Constante de associação (K_a) e parâmetros termodinâmicos para o sistema GSH-CdTe-His (Dados: $C_{QD} = 20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; $C_{His} = 0$ a $0,035 \text{ mol L}^{-1}$; pH 8,0).....	50
Tabela 7. Parâmetros de ligação para o sistema GSH-CdTe-His.....	52
Tabela 8. Avaliação do efeito matriz: parâmetros estatísticos	57
Tabela 9. Comparação das características do método proposto com outros métodos reportados na literatura para determinação de His com QD.....	58
Tabela 10. Variação do sinal de fluorescência do sistema GSH-CdTe-his na presença de interferentes. Dados: $C_{his} = 20 \text{ mmol L}^{-1}$	61
Tabela 11. Valores de recuperação para as amostras de Urina e Suplemento.	62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura genérica do aminoácido 14
- Figura 2.** Espectros de absorção para os QD de GSH-CdTe de (A) 2,2 nm, 2,8 nm e 3,0 nm. (B) Espectros de emissão para os respectivos tamanhos de Qd de GSH-CdTe sintetizados..... 40
- Figura 3.** Avaliação da interação de pontos quânticos de GSH-CdTe de diferentes tamanhos (2,2; 2,8 e 3,0 nm) com os aminoácidos Iso, Leu, Val, Trp, Tre, His e Arg na concentração de 80,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em meio aquoso (Dados: $\lambda_{\text{excitação}} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emissão}} = 528,95 \text{ nm}$; 552,05 nm e 567,05 nm, respectivamente)..... 42
- Figura 4.** Avaliação da interação do QD de GSH-CdTe de 2,8 nm com o aminoácido L-treonina na faixa de concentração de 1,6 a 333 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em meio aquoso. (Dados: $\lambda_{\text{excitação}} = 400 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 552,05 \text{ nm}$) 43
- Figura 5.** Avaliação da interação do QD de GSH-CdTe de 2,2 nm com o aminoácido L-histidina na faixa de concentração de 1,6 a 333 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em meio aquoso. (Dados: $\lambda_{\text{excitação}} = 400 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 528,95 \text{ nm}$) 44
- Figura 6.** Avaliação da influência do pH na interação entre os aminoácidos apolares e o QD de GSH-CdTe de 2,2 nm. (Dados: $\lambda_{\text{excitação}} = 400 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emissão}} = 528,95$; $C_{\text{AA}} = 80,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; $C_{\text{QD}} = 50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$). 46
- Figura 7.** Gráfico de Stern-Volmer para o sistema GSH-CdTe-His. (Dados: $C_{\text{His}} = 0$ a 0,035 mol L^{-1} , $C_{\text{QD}} = 20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, pH 8,0. 47
- Figura 8.** Curvas de Stern–Volmer para o sistema QD de GSH-CdTe–his em três temperaturas diferentes. Dados: $C_{\text{QD}} = 20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; $C_{\text{His}} = 0$ a 0,035 mol L^{-1} ; pH 8,0. 48

Figura 9. Gráfico de Van't Hoff	50
Figura 10. Estrutura da glutatona reduzida (GSH) e L-histidina (His).....	52
Figura 11. Avaliação do efeito do pH no sistema GSH-CdTe-His (Dados: $C_{\text{His}}=20 \text{ mmol L}^{-1}$, $C_{\text{QD}}=50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$)	54
Figura 12. Avaliação da concentração da solução tampão amoniacal na faixa 0,1 a $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ ($C_{\text{His}}=20 \text{ mmol L}^{-1}$)	54
Figura 13. Avaliação da concentração do QD na faixa 2,5 a $30 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ($C_{\text{His}}=20 \text{ mmol L}^{-1}$).	55
Figura 14. Avaliação do efeito matriz: comparação entre curvas analíticas em água, urina artificial e urina) para avaliar o paralelismo.	57
Figura 15. Estudo de interferentes. Dados: $C_{\text{QD}}=20 \text{ mol L}^{-1}$; $C_{\text{His}}=20 \text{ mmol L}^{-1}$, $C_{\text{Tampão}}=0,25 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0).	60

SUMÁRIO

<i>CAPÍTULO 1</i> -----	13
1. Introdução -----	14
1.1 Métodos analíticos para determinação de aminoácidos. -----	17
1.2 Fluorescência molecular -----	19
1.2.1 Pontos quânticos: fluoróforos não orgânicos-----	19
1.2.2 Fenômenos de superfície: interação entre os QD e os analitos-----	20
1.2.3 Uso dos QD como sondas fotoluminescentes -----	23
<i>CAPÍTULO 2</i> -----	28
2. Objetivos -----	29
2.1 Objetivo Geral -----	29
2.2 Objetivos específicos -----	29
<i>CAPÍTULO 3</i> -----	30
3. Experimental -----	31
3.1 Reagentes e soluções -----	31
3.2 Instrumentação -----	31
3.3 Síntese dos pontos quânticos e caracterização ótica -----	32
3.4 Procedimentos -----	33
3.4.1 Avaliação da interação dos QD com aminoácidos-----	33
Fonte: Autoria própria, 2019-----	34
3.4.2 Influência da acidez no meio reacional-----	35
3.4.3 Avaliação do mecanismo de supressão-----	35
3.4.4 Otimização do método-----	36
3.4.5 Validação do Método-----	37
<i>CAPÍTULO 4</i> -----	39
4. Resultados e discussão -----	40
4.1 Caracterização das propriedades óticas QD -----	40
4.2 Avaliação da interação dos QD com aminoácidos -----	41
4.3 Mecanismo de quenching para o sistema GSH-CdTe-his -----	47

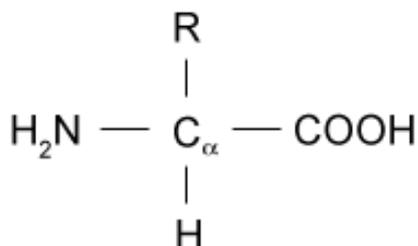
4.4 Otimização e validação do método	53
4.5 Análises das amostras	61
<i>CAPÍTULO 5</i>	63
<i>5. Conclusões e perspectivas futuras</i>	64
<i>CAPÍTULO 6</i>	65
<i>6. Referências</i>	66

CAPÍTULO 1

1. Introdução

Os aminoácidos (AA) são compostos quaternários de carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio, possuindo em sua estrutura os grupos amino e carboxílico ambos ligados a um carbono α , o qual tem sua valência completada por uma cadeia lateral (-R) (Figura 1). Os AA podem ser classificados no tocante a sua cadeia lateral R como: apolares, polares neutros, básicos e ácidos. Esses compostos são os principais constituintes das proteínas, sendo, portanto, responsáveis pela construção e reparação dos músculos, tendões, pele, ligamentos, glândulas, unhas e cabelos. São responsáveis pela produção de enzimas que coordenam algumas funções orgânicas no metabolismo, ajudando também na produção de hormônios e neurotransmissores (NELSON; COX, 2014).

Figura 1. Estrutura genérica do aminoácido



Fonte: <https://www.bioinformatics.org/tutorial/1-3.html>

Existem mais de 500 aminoácidos na natureza, mas o código genético humano só consegue codificar 20, sendo os enantiômeros levogiro encontrados em maior abundância quando comparados aos dextrogiros. O corpo humano é capaz de sintetizar dez desses aminoácidos, os ditos não-essenciais, sendo eles: L-alanina, L-cisteína, L-serina, L-tirosina, L-arginina, L-asparagina, L-glutamina, L-prolina, L-glicina, ácido aspártico e ácido glutâmico. Já os aminoácidos essenciais, que não são sintetizados pelo organismo humano, são: L-isoleucina, L-valina, L-leucina, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-triptofano, L-metionina e L-treonina. Os aminoácidos essenciais podem ser providos por meio de uma dieta adequada, sendo encontrados principalmente na carne bovina, suína, aves, derivados lácteos e ovos. Para aqueles que não consomem

esses tipos de alimentos, outra fonte de ingestão desses aminoácidos pode ser feita por meio de uma combinação de grãos, leguminosas, folhas verdes e vegetais amiláceos, tais como: feijão, ervilha, lentilha, amendoim, espinafre, couve, brócolis, batata doce, batata inglesa, entre outros. Por meio dessa combinação é possível obter fontes completas de proteínas (VANNUCCHI et al., 2016).

Em alguns casos, a ingestão desses aminoácidos deve ser feita de forma controlada, pois a falta ou o acúmulo de destes está associada à algumas doenças.

A carência de alguns aminoácidos, essenciais e não essenciais, pode acarretar em sérios danos à saúde, como distúrbios no crescimento e desenvolvimento do indivíduo. A exemplo, a falta de L-serina pode causar distúrbios neurometabólicos, agravando quadros de microcefalia congênita, retardo psicomotor severo e convulsões (DE KONING, 2006).

Algumas condições neuropsiquiátricas estão associadas à falta de aminoácidos aromáticos, como o triptofano e a fenilalanina, estes desempenham papel fundamental na produção de hormônios como a serotonina, a qual se converte em melatonina (hormônio do sono), noradrenalina, adrenalina e dopamina. A perturbação na biossíntese desses neurotransmissores é capaz de levar o indivíduo a quadros de depressão, bem como, a diminuição da qualidade de vida (STRASSER et al., 2016).

Aminoácidos não essenciais podem se tornar essenciais sob condições de estado de estresse, podendo chegar a estados catabólicos quando a capacidade de síntese de aminoácidos endógenos é excedida. A exemplo desses aminoácidos semi-essenciais têm-se a arginina e a glutamina. A baixa biodisponibilidade de arginina e glutamina pode causar doenças variadas como doença falciforme, talassemia, malária, asma aguda, fibrose cística, hipertensão, doença cardiovascular, certos tipos de câncer e trauma, entre outros (MORRIS et al., 2017).

A anemia é um dos principais quadros de saúde associado à doença renal crônica (DRC). Dietas deficientes em histidina predis põem indivíduos saudáveis à este quadro, acentuando-o em indivíduos que possuem uremia crônica. A histidina aumenta a absorção de ferro e exibe alta capacidade antioxidante

eliminando os radicais (espécies reativas de oxigênio) responsáveis por disfunção endotelial e doenças cardiovasculares (VERA-AVILES et al., 2018).

Para tratamento desses casos de deficiência desses AA, além de uma dieta adequada, faz-se necessário o uso de alguns suplementos alimentares, os quais estão associados a efeitos nutricionais, metabólicos e/ou fisiológicos que se destinam a complementar a alimentação normal (PIRES, 2016). Entretanto, devido a ampla oferta desses suplementos, bem como o consumo sem orientação médica ou nutricional, torna-se importante avaliar o teor desses aminoácidos nesse tipo de amostra, visando a confiabilidade e qualidade desses produtos frente à legislação vigente para trazer benefícios ao consumidor.

As aminoacidopatias são doenças causadas devido a erros inatos no metabolismo, isto é, mutações nos genes que codificam proteínas específicas, resultando em uma má formação da estrutura primária dessas proteínas ou na quantidade de proteínas sintetizadas. Essas doenças são classificadas como distúrbios que dão origem à intoxicação aguda ou progressiva da acumulação de compostos tóxicos ao metabolismo, neste caso, o acúmulo de aminoácidos (WAJNER et al., 2019).

O acúmulo de aminoácidos não é associado apenas aos erros inatos do metabolismo, mas também podem servir com marcadores sensíveis do estado nutricional e da função de diversos órgãos como fígado, rins, intestino e músculos, de modo, que a mudanças nas concentrações desses aminoácidos devem ser monitoradas de forma exata (BLAU; DURAN; GIBSON, 2008)..

Algumas das aminoacidopatias mais comuns são a fenilcetanúria, que é um distúrbio do metabolismo associado ao acúmulo de fenilalanina no organismo devido à uma falha na conversão da fenilalanina à tirosina pela enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), levando ao comprometimento do desenvolvimento cognitivo e neurológico (CAMPISTOL et al., 2017). Tem-se também, a doença da urina do xarope de bordo que é um erro inato no metabolismo de aminoácidos de cadeias ramificadas (leucina, valina e isoleucina), a qual acarreta danos cerebrais podendo levar a morte. O acúmulo desses AA acarretam em cetoácidos que geram um odor característico de xarope de bordo à urina (BLACKBURN et al., 2017). Assim como, a argininemia que é uma desordem hereditária que leva ao acúmulo de arginina, que acarreta

em quadros de atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual, convulsões, tremor e dificuldade de equilíbrio e coordenação (WASIM et al., 2018).

Por outro lado, hipermetioninemia é uma aminoacidopatia assintomática, causada por uma deficiência no metabolismo de conversão da metionina em homocisteína (TALLAN; SCHAFFNER; D, 1981). Outra importante aminoacidopatia é histidinemia, que é autossômica recessiva provocada pela deficiência da enzima histidase, a qual catalisa a conversão da histidina em ácido urucânico. Em alguns casos esses distúrbios podem acarretar em deficiência mental e dificuldade na fala (LEVY, 2002).

Essas desordens podem ser tratadas por meio da remoção das toxinas por dietas especiais ou medicamentos, podendo ser diagnosticadas e monitoradas pela análise quantitativa de aminoácidos no plasma e na urina dos indivíduos portadores das aminoacidopatias com base, usualmente, em técnicas de separação, destacando as técnicas cromatográficas e eletroforese capilar (SHARMA et al., 2014).

1.1 Métodos analíticos para determinação de aminoácidos.

Diferentes métodos analíticos foram desenvolvidos para determinação de aminoácidos em diversos tipos de amostras, sendo os métodos baseados em cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) os mais utilizados (BILUCA et al., 2019; ÇEVIKKALP et al., 2016; SONG et al., 2018; ZHU et al., 2016b). Muitos estudos têm sido desenvolvidos visando melhorias aos métodos já estabelecidos, tanto no pré-tratamento das amostras, quanto na diversificação da aplicação das técnicas analíticas na determinação de aminoácidos em fluídos biológicos e amostras alimentares.

A exemplo desses métodos pode-se destacar a cromatografia líquida de ultra performance acoplada ao espectrômetro de massas (UPLC-MS), em que Fingerhut e colaboradores (2016) o utilizaram com a finalidade de determinar aminoácidos em plasma de pacientes que possuem a doença de urina de xarope de bordo (leucinose), tirosinemia e fenilcetanúria (FINGERHUT; RÖSCHINGER; HECK, 2016; FREETO et al., 2007). Já Szkudzinska e colaboradores (2017) empregaram a mesma técnica para a determinação de aminoácidos em misturas de rações e amostras de centeio (SZKUDZIŃSKA et al., 2017).

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) foi utilizada por Held e colaboradores (2011) no campo da medicina veterinária para determinação de aminoácidos livres em plasma canino, visto que o índice dos mesmos em plasma pode ser utilizado para diagnóstico de câncer (AZUMA et al., 2016). Adicionalmente, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) também foi utilizada para a determinação de aminoácidos em urina de pacientes que possuem aminoacidopatias como uma alternativa a cromatografia de troca iônica, visando uma diminuição do tempo de análise (HELD; WHITE; PASQUALI, 2011).

Um método empregando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) foi desenvolvido para determinar aminoácidos em amostras de urina de modo a estudar a diabetes mellitus em período gestacional (LORENZO et al., 2015), bem como, para quantificar aminoácidos livres em amostras de carne (PÉREZ-PALACIOS et al., 2015).

Os aminoácidos também foram quantificados por outra técnica de separação como a eletroforese capilar em diversos tipos de amostras alimentares (LUO et al., 2017; OMAR; ELBASHIR; SCHMITZ, 2017; PÉREZ-MÍGUEZ; MARINA; CASTRO-PUYANA, 2016).

Recentemente, o uso de sensores eletroquímicos e de nanopartículas como sonda vêm ganhando destaque no âmbito da química analítica. Yola e colaboradores (2015) desenvolveram um sensor eletroquímico baseados em nanopartículas de ouro com MIP (polímero molecularmente impresso, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*) para a determinação de tirosina em amostras de leite. Os mesmos pesquisadores desenvolveram um sensor voltamétrico para a determinação simultânea de tirosina e triptofano em amostras de soro sanguíneo (YOKUS et al., 2016; YOLA; EREN; ATAR, 2015).

Os métodos baseados em separação cromatográficos embora sejam altamente sensíveis, seletivos e exatos, com limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) usuais mais baixos do que os obtidos por métodos óticos baseados em absorção e emissão molecular, são métodos que apresentam alto custo de aquisição, operação e manutenção. Adicionalmente, são comuns etapas laboriosas de pré-tratamento da amostra, etapas de derivatização dos analitos e menor frequência analítica (SHARMA et al., 2014). Visando a diminuição de custos e tempo, sem grande prejuízo à sensibilidade analítica,

destacam-se os métodos baseados na fluorescência molecular para a determinação de aminoácidos. Dentro deste panorama emerge o uso de pontos quânticos como sondas fotoluminescentes.

1.2 Fluorescência molecular

1.2.1 Pontos quânticos: fluoróforos não orgânicos

Os pontos quânticos (QD do inglês, *Quantum Dots*) são nanopartículas cristalinas semicondutoras que têm sido objeto de muitos estudos científicos devido ao fato de serem, fluoróforos altamente eficientes e pelas suas propriedades óticas, destacando-se entre elas a fotosensibilidade, fotoestabilidade e luminescência. Esta última é uma propriedade muito importante desses nanocristais, pois ela permite que eles possam ser usados como fotosensores e no desenvolvimento de métodos analíticos (CUI; HE; CHEN, 2015; FRIGERIO; ABREU; SANTOS, 2012).

Os semicondutores coloidais, pontos quânticos, são cristais simples de diâmetro na escala do nanômetro, que podem emitir em diferentes comprimentos de onda, com um mesmo tipo de material, modificando-se apenas o tamanho dos cristais, tornando está uma particularidade que distingue com grande vantagem os QD dos outros tipos de fluoróforos (ROGACH, 2008).

Os QD podem ser considerados partículas intermediárias entre átomos e moléculas, que por vezes são denominados *quasi-átomos*. Uma molécula simples tem sua energia calculada por meio da combinação linear dos orbitais atômicos (CLOA), enquanto que os QD têm sua energia calculada pela equação de Schrödinger. Os orbitais externos dos átomos do nanocristal se combinam aos novos orbitais moleculares ligantes (baixa energia) e antiligantes (alta energia) levando a formação de bandas, em que os orbitais ligantes formam a banda de valência e os orbitais antiligantes formam a banda de condução. O intervalo entre essas bandas, chamado de “*gap*” diminui com o aumento de átomos adicionados ao nanocristal, isto é, diminui com o aumento do tamanho do nanocristal (MENDONÇA, 2008).

O efeito do tamanho sobre a luminescência é muito significativo para esses nanocristais, sendo compreendido devido ao confinamento do éxciton de Bohr, isto é, do par elétron-buraco. O efeito de confinamento quântico ocorre a

partir do momento em que o tamanho da nanopartícula é menor ou igual ao raio do éxciton de Bohr do respectivo semicondutor macroscópico. O fenômeno de fluorescência nos QD por sua vez é observado pela recombinação radiativa do par elétron-buraco após um elétron ser excitado da banda de condução para a banda de valência. Do ponto de vista estrutural, possíveis defeitos na superfície dessas estruturas cristalinas atuam como armadilhas (*trap*) para o par elétron-buraco impedindo a sua recombinação radiativa, gerando emissão de radiação eletromagnética intermitente, com um rendimento quântico muito baixo (BOERO et al., 1997).

O processo de funcionalização consiste em recobrir a superfície dos QD com moléculas que são capazes de estabelecer uma ligação forte com a superfície dos QD, em uma das extremidades, deixando a outra extremidade livre para interagir com o meio. Os ligantes de superfície têm a vantagem de diminuir os defeitos na superfície dos nanocristais, estabilizando quimicamente os QD em solução, além de aumentar a sua estabilidade luminescente. Comumente tióis de cadeia curta são empregados como modificadores de superfície, o que permite que haja a ligação com o núcleo do QD, além de possuir grupos carboxílicos e/ou grupos hidroxil, os quais os tornam hidrofílicos permitindo que os QD revestidos com esses ligantes possam ser utilizados como fotossensores em soluções aquosas (RODRIGUES et al., 2017).

Atualmente os pontos quânticos vêm sendo utilizados em dispositivos optoeletrônicos, fotovoltaicos, biomédicos, dentre outros (CHANIOTAKIS; BUICULESCU, 2014). Há uma tendência por parte da química analítica em utilizá-los ao invés dos fluoróforos orgânicos, pois a modificação da sua superfície com ligantes hidrofílicos que possuem diversos grupos funcionais, permite que a nanopartícula funcionalizada seja aplicada no desenvolvimento de métodos mais seletivos.

1.2.2 Fenômenos de superfície: interação entre os QD e os analitos

A sensibilização dos QD por espécies de interesse são fenômenos dependentes da superfície, isto é, dependem dos defeitos do nanocristal e do tipo de ligante de superfície. Por meio dessas interações é possível observar os fenômenos de amplificação ou supressão do sinal de emissão, sendo este último o mais comumente observado e utilizado como resposta para o desenvolvimento

de métodos analíticos. Na literatura há poucos casos em que se utiliza os QD de CdTe como sonda fotoluminescente para determinação de íons e compostos orgânicos em que o analito em questão atua como uma espécie capaz de passivar a superfície dos QD levando à amplificação (do inglês, *enhancement*) do sinal de emissão. Os mecanismos de *enhancement*, comumente são descritos como a formação de um complexo supramolecular em que o analito atua como uma espécie convidada a qual é incorporada à uma molécula hospedeira, e então, o complexo supramolecular formado é absorvido na superfície do QD de modo a apassivá-la. Ainda podem se dar por mecanismos que envolvem a interação dos QD com substâncias que contém grupos funcionais como tióis e aminas. Nesses casos, os íons de superfície que possuem orbitais incompletos aceitam pares de elétrons dos átomos doadores do analito, como nitrogênio e enxofre (RODRIGUES et al., 2017).

O fenômeno de supressão de emissão dos QD, conhecido como *quenching*, é amplamente utilizado pela química analítica no tocante desenvolvimento de métodos. Esse fenômeno depende do tipo de interação entre o QD e a espécie supressora, que por sua vez depende da temperatura e da viscosidade do meio (ZHAO et al., 2012). Esse fenômeno pode ser caracterizado como *quenching* dinâmico (do inglês, *dynamic quenching*), estático (do inglês, *static quenching*) ou uma combinação dos dois tipos.

A maneira mais eficiente para distinguir esses tipos de *quenching* é medir o tempo de meia vida. Para uma supressão dinâmica é observado a diminuição da intensidade de fluorescência e do tempo de vida à medida que a concentração do analito aumenta. Isso ocorre devido as colisões entre a superfície dos QD e as moléculas ou átomos do analito, para os quais há uma transferência de energia que favorece os processos não-radiativos (conversão interna, conversão intersistemas, conversão externa e relaxação vibracional), diminuindo o rendimento quântico do QD. Esse mecanismo é controlado pela velocidade de difusão dessas espécies em solução, dependendo também da temperatura e viscosidade do solvente (LAKOWICZ, 1999).

A supressão estática ocorre quando a extremidade do ligante de superfície do QD forma um complexo com um centro metálico ou com uma outra molécula no estado fundamental, antes do QD ser excitado, impedindo que haja uma recombinação radiativa que é responsável pela sua emissão de

fluorescência. Ou seja, os fluoróforos não complexados terão estados normais de excitação, havendo a conservação do seu tempo de meia-vida sendo a emissão reduzida pela redução da população de fluoróforos capazes de emitir após excitação (KHAN et al., 2017).

Stern-Volmer definiu o processo de supressão do sinal de emissão do fluoróforo como uma interação bimolecular que compete com todos os processos moleculares radiativos e não-radiativos (BOAZ, 1950). As curvas de Stern-Volmer são caracterizadas por uma relação não-linear entre intensidade de emissão do fluoróforo e a concentração do *quencher*. Quando ocorre a combinação do *quenching* dinâmico e estático o perfil de variação do sinal luminescente é caracterizado pelo polinômio abaixo (Equação 1):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + (K_D + k_s)[Q] + K_D k_s [Q]^2 \quad (\text{Equação 1})$$

em que F_0 e F são as intensidades de fluorescência do QD na ausência e na presença do quencher, K_D e K_S são as constantes de *quenching* dinâmico e estático, respectivamente e $[Q]$ é a concentração molar do *quencher* (CHEN; ZHANG; TIAN, 2015).

Os mecanismos de interações entre os QD e os analitos que levam a esse fenômeno de *quenching* podem ser caracterizados por transferência de elétron (ET do inglês *electron transfer*), transferência de energia por ressonância de fluorescência (RET do inglês *resonance energy transfer*) ou por mudanças na carga superficial do QD ou ligantes.

A ET consiste em um processo de fotoexcitação e posterior relaxação gerando um par elétron-buraco (éxciton de Bohr) que podem atuar como doadores ou aceptores de elétrons. Na presença de espécies oxidantes ou redutoras, o par doador-aceptor gerado leva a uma competição pela transferência eletrônica de modo a impedir a recombinação radiativa do par elétron-buraco diminuindo a intensidade de emissão do QD, enquanto que o mecanismo de RET envolve as interações dipolo-dipolo entre um doador e um acceptor (QD ou analito), em que a probabilidade de RET, depende da distância entre os dipolos (FREEMAN; WILLNER, 2012).

Os tóios de cadeia carbônica curta desempenham um papel fundamental nas propriedades físico-químicas dos QD, uma vez que, determinam a funcionalidade química e a carga superficial da nanopartícula, a qual surge por meio da ionização dos grupos funcionais dos ligantes de superfície dependendo diretamente do pH do meio e de sua natureza química. A recombinação radiativa do par elétron-buraco pode ser afetada devido à mudança nessa carga superficial ou devido a presença de ligantes, os quais dificultam a difusão de analitos com mesma carga na superfície dos QD. Os QD recobertos com ligantes tiólicos que conferem uma carga global negativa à nanopartícula são capazes de estabelecer interações com analitos que possuem cargas positivas (íons metálicos ou moléculas orgânicas) do tipo eletrostática ou ligação de hidrogênio (DONEGAN; RAKOVICH, 2013).

1.2.3 Uso dos QD como sondas fotoluminescentes

Métodos analíticos foram desenvolvidos baseados nos fenômenos de interação entre os QD e diversos tipos de analitos, como, íons metálicos, moléculas orgânicas (biomoléculas), ácidos nucleicos (RNA e DNA), vitaminas, antibióticos, dentre outros, bem como, o uso dos mesmos no desenvolvimento de sensores químicos e eletroquímicos (Tabela 1). A exemplo deste último, Hasanzadeh e colaboradores (2016) desenvolveram um sensor eletroquímico de QD de grafeno (GQD) recoberto com partículas magnéticas de Fe_3O_4 (Fe_3O_4 MNP-GQDs), o qual foi projetado para especificamente para melhorar e capturar de forma efetiva os sinais eletroquímicos de aminoácidos em pH fisiológico (HASANZADEH et al., 2016).

Tabela 1. Métodos analíticos para determinação de AA utilizando QD como sondas fotoluminescentes.

Aminoácido	Interação	Metal	Amostra	Referência
Glutamato	Direta (<i>enhancement</i>)		Amostra sintética	(HOSSEINI et al., 2015a)
His	Indireta	Ni ²⁺	Fluídos biológicos	(WU; YAN, 2010)
His	Indireta	Mn ²⁺	Amostra sintética	(YANG et al., 2015)
His	Indireta	Cu ²⁺	Imagem em células vivas	(ZHU et al., 2016a)
Arg	Indireta	AuNPs	Plasma	(LIU et al., 2017)
His	Direta		Fluídos biológicos	(CHE et al., 2019)
His e Tre	Indireta	Cu ²⁺	Soro sanguíneo	(LIU et al., 2013)

Fonte: Autoria própria, 2019

Pontos quânticos de grafeno foram utilizados como sensor para determinação de glutamato (Glu) em uma amostra sintética de aminoácidos, demonstrando alta seletividade frente a outros aminoácidos, sendo observado um *enhancement* no sinal de emissão do GQD à medida que a concentração do Glu aumentava (HOSSEINI et al., 2015a). O efeito de *enhancement* também foi observado por Hosseini e colaboradores (2014) no sistema QD de CdSe-H₂O₂ na presença histidina e triptofano. Essa reação está baseada no efeito catalítico desses aminoácidos na reação dos QD com o peróxido de hidrogênio, de modo a gerar um aumento significativo na emissão de fluorescência desse sistema (HOSSEINI et al., 2014).

Os métodos analíticos que utilizam QD como sondas fotoluminescente, em sua grande maioria são baseados em mecanismos de *quenching*, os quais a

dependem da sensibilização do QD com o sistema químico, pode ser uma desvantagem para aplicações práticas devido ao fato do QD interagir com outras espécies presentes no meio além do analito, promovendo supressões indesejadas. Então, estratégias de detecção indireta da fotoluminescência, vem sendo exaustivamente empregadas para determinação das espécies de interesse.

Essas estratégias baseiam-se em uma primeira etapa em que se verifica uma extinção da fluorescência do QD (*turn-off*) por espécies selecionadas (usualmente íons metálicos), para posterior reestabelecimento da fluorescência (*turn-on*) a partir do reconhecimento da espécie alvo. Métodos baseados nessas estratégias *turn-off-turn-on* foram amplamente empregados para determinação de aminoácidos.

A exemplo desses métodos, tem-se a determinação de histidina em fluídos biológicos utilizando QD de CdTe recobertos com homocisteína (Hyc) modulado com Ni^{2+} . A fotoluminescência do QD de Hyc-CdTe é facilmente extinta na presença do Ni^{2+} devido à ligação do Ni^{2+} com a Hyc na superfície do QD gerando uma transferência de elétrons do QD para o íon metálico. A alta afinidade da histidina ao Ni^{2+} permite que o mesmo se dissocie da superfície do QD para formar um complexo estável com a His em solução de modo a recuperar a fotoluminescência do QD de Hyc-CdTe. Esse método demonstrou alta seletividade diante de outros aminoácidos estudados (WU; YAN, 2010).

Da mesma forma outros trabalhos foram reportados na literatura utilizando a mesma estratégia, como Yang e colaboradores (2015) desenvolveram um sensor para monitoramento de histidina em solução aquosa empregando QD de GSH-CdTe em que a espécie supressora, isto é, a espécie responsável pelo *turn-off* foi o íon metálico Mn^{2+} (YANG et al., 2015), bem como, o uso de nanopartículas de carbono dopados com nitrogênio (N-CQD) para quantificação rápida e seletiva de histidina, utilizando como supressor o íon metálico Cu^{2+} , o qual forma um complexo mais estável com a histidina do que com a superfície do QD (ZHU et al., 2016a).

A arginina foi quantificada baseada no efeito de filtro interno (EFI) de nanopartículas de ouro (AuNPs) na fluorescência de QD de TGA-CdTe. As AuNPs ao serem estabilizadas com citrato na presença dos QD extinguiu a fluorescência dos mesmos pelo EFI. Essa fluorescência era reestabelecida à

medida que a concentração de arginina aumentava, pois esta era capaz de induzir a agregação das AuNPs, diminuindo o EFI, pela formação de um complexo (LIU et al., 2017).

Um biossensor foi desenvolvido por Liang e colaboradores (2017) visando a determinação de DNA de fita dupla (dsDNA) com emprego de QD de carbono (CQD) e MPA-CdTe. A fluorescência do MPA-CdTe era extinta por mitoxantrona e era restaurada na presença do DNA, enquanto a fluorescência do CQD permanecia constante para permitir a detecção do DNA. A resposta analítica era baseada na razão entre as intensidades dos QD. Essa metodologia foi aplicada para a quantificação de dsDNA do vírus HIV (LIANG et al., 2017).

A estratégia de detecção indireta da fotoluminescência foi desenvolvida para aumentar a sensibilidade e seletividade da metodologia analítica, porém, a detecção direta da fotoluminescência baseada no fenômeno de *quenching* é uma alternativa mais rápida, eficaz e simples para o desenvolvimento de métodos analíticos, visto que, não se baseia em etapas de extinção e reestabelecimento da fluorescência.

Dentre esses métodos pode-se destacar o uso de nanopartículas de GSH-CdTe/CdS para determinação de sanguinarina (SA), um fármaco que possui atividade antimicrobiana e potencial atividade anticâncer, baseada no mecanismo de interação direta entre o QD e o analito, o qual levou ao *quenching* da emissão do QD (SHEN; LIU; HE, 2014).

De mesmo modo íons metálicos e moléculas orgânicas foram determinados baseados em mecanismos de interação direta. Elmizadeh e colaboradores (2018) desenvolveram uma metodologia altamente seletiva, sensível, rápida e simples para determinação de Cr^{3+} em amostras de água utilizando nanopartículas de CdTe-L (ELMIZADEH et al., 2018). Os QD de TGA-CdTe foram empregados como sondas fotoluminescentes na determinação de Ni^{2+} em amostras de água de torneira e água residuais de uma planta de galvanoplastia (ZARE et al., 2017), bem como, para a determinação de histamina em amostras de atum (KHAN et al., 2017). QD de TGA-CdTe conjugados com Concavalina A (Con A) foram utilizados na determinação direta de lipopolissacarídeo para posterior reconhecimento da bactéria *Serratia marcescens* (EBRAHIM et al., 2015).

Mais recentemente, Che e colaboradores (2019) desenvolveram uma nova rota de síntese para pontos quânticos de carbono dopados com Cu^{2+} com o intuito de quantificar histidina em amostras biológicas por meio da interação direta His-Cu-CQD, visto que, His e Cu^{2+} formam complexos bastantes estáveis, de modo que a metodologia analítica se tornou mais seletiva (CHE et al., 2019).

Muitos métodos foram desenvolvidos visando a determinação de uma gama de analitos, dentre eles, a determinação de aminoácidos em sua maioria por detecção indireta. Ressalta-se que, apenas dois trabalhos com determinação direta de AA foram relatados na literatura, contudo um deles se baseou na estratégia de formação de complexo AA-metal. Portanto, para o desenvolvimento de métodos diretos, rápidos e simples, faz-se necessário a compreensão acerca dos mecanismos de interação entre os QD e os AA, bem como a avaliação dessa estratégia sobre os parâmetros de desempenho analítico.

CAPÍTULO 2

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliação sistemática da interação direta de pontos quânticos de CdTe e aminoácidos em função da cadeia lateral dos mesmos para o desenvolvimento de método analítico para análise de suplementos e/ou urina.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a interação direta dos QD de GSH-CdTe de diferentes tamanhos com sete aminoácidos essenciais de acordo com as características das suas cadeias laterais;
- Estudar o fenômeno de supressão do QD de GSH-CdTe por parte do analito, avaliando o tipo de interação e os parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG);
- Otimizar e validar o método proposto pelo estabelecimento das melhores condições de análise e dos parâmetros de desempenho analíticos (precisão, exatidão, faixa linear de trabalho, limites de quantificação e determinação) e aplicá-lo em amostras reais de urina e suplemento

CAPÍTULO 3

3. Experimental

3.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes empregados foram com grau analítico e suas soluções foram preparadas com água ultrapura (Milli-Q, Elga, Purelab Option-Q, United Kingdom) com resistividade específica $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$. Para síntese dos pontos quânticos foram utilizados NaBH_4 (98%), $\text{CdCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (79-81%), Na_2TeO_3 (99%), citrato de sódio e glutatona, todos adquiridos da Sigma Aldrich (EUA) e NaOH (98%, Moderna, Brasil). Para o preparo da urina artificial foram utilizados $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl , Na_2SO_4 , KH_2PO_4 , KCl , NH_4Cl , Ureia e creatinina, todos adquiridos da Merck (Alemanha).. Todos os aminoácidos empregados L-alanina (Ala), L-asparagina (Asn), L-glicina (Gly), L-isoleucina (Ile), L-leucina (Leu), L-valina (Val), L-fenilalanina (Phe), L-histidina (His), L-arginina (Arg), L-lisina (Lys), L-treonina (Thr), L-triptofano (Trp), L-metionina (Met), L-ácido aspártico (Asp), L-ácido glutâmico (Glu) foram da Merck (Alemanha). Foram preparados tampões a partir do acetato de sódio ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4-6), NH_4Cl ($0,1$ a $0,8 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8-10) e TRIS ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7) todos da Merck (Alemanha)). As soluções de trabalho dos QD foram preparadas diariamente na faixa de concentração $7,4$ a $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. As soluções de referência dos aminoácidos que foram avaliados também foram preparadas diariamente na concentração de 1 mmol L^{-1} , a partir das quais foram tomadas alíquotas adequadas para a obtenção da faixa de concentração de $1,6$ a $333 \mu\text{mol L}^{-1}$. Para avaliação dos interferentes foram utilizadas soluções padrão dos metais Zn(II) e Co(II) (1000 mg L^{-1}) (Specsol, Brasil), e soluções dos aminoácidos supracitados de concentração 1 mmol L^{-1} .

3.2 Instrumentação

Todos os reagentes foram pesados em uma balança analítica (Toledo, AR2140) e as medidas de pH foram realizadas com o auxílio do pHmetro (OHAUS, ST3100-F) com eletrodo combinado de vidro. Para a purificação e separação do QD, bem como o preparo das amostras, foi utilizada uma centrífuga (Marconi, MA-1810, São Paulo, Brasil) a 4000 rpm por 10 minutos. Para as análises ópticas foram utilizados um espectrofluorímetro ($\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 420$ a 720 nm) (VARIAN, Cary Eclipse, Austrália) e um espectrofotômetro

de absorção molecular no UV/Vis (VARIAN, Cary 50 eclipse, Austrália) com varredura de 200 a 800 nm.

3.3 Síntese dos pontos quânticos e caracterização ótica

A síntese dos pontos quânticos é baseada em uma única etapa por via hidrotérmica, que consiste na injeção do precursor calcogeneto em solução aquosa contendo um precursor metálico, seguida por um período de refluxo na temperatura de ebulição da água. Nesse procedimento, o grupo tiólico GSH foi utilizado como ligante de superfície, de modo a diminuir os defeitos da mesma.

A rota de síntese hidrotérmica adotada seguiu o procedimento previamente adotado por Rogach e colaboradores com pequenas modificações (ROGACH et al., 1996). Resumidamente, os nanocristais de GSH-CdTe foram obtidos a partir de 200 mg de NaBH₄, 55,4 mg de Na₂TeO₃, 460 mg de Glutathione e 310 mg de citrato de sódio, aos quais foi adicionada uma solução de 120 mL de CdCl₂ (concentração igual a 1,9 g L⁻¹), sob agitação magnética e ajuste de pH com solução de NaOH (0,1 mol L⁻¹) para pH 10,2, mantendo a relação molar entre Cd:Te:GSH em 1:5:6. O frasco reacional foi colocado em refluxo sobre um banho de sílica com agitação magnética e controle de temperatura. O controle de tamanho dos QD foi feito de acordo com o ajuste de tempo da síntese. As soluções de nanocristais de GSH-CdTe foram purificadas por meio da precipitação com etanol. Então, o precipitado foi centrifugado (4000 rpm) por 10 min e seco à vácuo em dessecador empregando sílica como agente dessecante.

A caracterização das propriedades óticas dos QD de GSH-CdTe foi feita a partir da obtenção dos espectros de absorção (200 a 800 nm) e emissão (450 a 600 nm, $\lambda_{exc}= 400$ nm). A estimativa de tamanho médio dos QD sintetizados foi realizada empregando-se o modelo matemático proposto por Yu e colaboradores (2003) (equação 2):

$$D = (9,8127 \times 10^{-7})\lambda^3 - (1,74147 \times 10^{-3})\lambda^2 + (1,0064)\lambda - (194,84) \quad (\text{Equação 2})$$

em que λ é o comprimento de onda de absorção máxima do primeiro pico excitônico e D o diâmetro médio das partículas.

Para a determinação da concentração das dispersões dos QD foi utilizada a lei de Beer-Lambert (equação 3):

$$A = \epsilon CL \quad (\text{Equação 3})$$

em que A é absorvância máxima da dispersão do QD, C é a concentração dos nanocristais (mol L^{-1}), L é o caminho ótico percorrido pelo feixe de radiação, o qual foi fixado em 1 cm, e ϵ é o coeficiente de extinção molar que pode ser calculado segundo a equação 4:

$$\epsilon = 3450 \times \Delta E \times (D)^{2,4} \quad (\text{Equação 4})$$

em que ΔE é a energia de transição correspondente ao primeiro pico de absorção e D é o diâmetro das nanopartículas. Desconsiderando o valor da energia de transição do primeiro pico de absorção chega-se a equação 5:

$$\epsilon = 10043(D)^{2,12} \quad (\text{Equação 5})$$

por meio da qual foi possível obter os valores de ϵ para cada tamanho do nanocristal sintetizado. A concentração das dispersões dos QD foi determinada substituindo os valores de ϵ na equação 3.

3.4 Procedimentos

3.4.1 Avaliação da interação dos QD com aminoácidos

A interação dos QD de GSH-CdTe com aminoácidos essenciais foi avaliada dividindo os aminoácidos em três grupos de acordo com as características de suas cadeias laterais: L-isoleucina, D-leucina e L-valina (apolares), L-histidina e L-arginina (básicos) e L-treonina e L-triptofano (polares neutros). Os ensaios foram realizados pela adição de alíquotas que variaram de 0,05 a 2,0 mL das soluções testes de aminoácidos de 0,1; 0,2 e 0,5 mmol L^{-1} (as quais foram preparadas a partir de soluções estoques individuais dos mesmos de concentração 1 mmol L^{-1}) na sonda luminescente composta de 1,0 mL de QD. O volume final foi completado até 3,0 mL e homogeneizado. Uma alíquota teste foi transferida para um cubeta de quartzo e o espectro de emissão foi registrado de 450 a 600 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$).

Para a avaliação da interação AA-QD foram preparadas diariamente soluções estoque dos QD de concentração de 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 7,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 8,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para os QD de 2,2 nm (verde); 2,8 nm (amarelo) e 3,0 nm (laranja), respectivamente, baseadas na intensidade de emissão de cada QD. Resumidamente, todos os ensaios fluorimétricos realizados são apresentados na Tabela 2 com destaque as alíquotas tomadas das referidas soluções estoque. Adicionalmente, todos os testes foram realizados em duplicata para cada aminoácido testado tomando como sinal de referência o registrado pela leitura da solução de GSH-CdTe na ausência do analito (ensaio 1).

Tabela 2. Ensaios para as análises dos diferentes aminoácidos frente aos QD.

Ensaio	Alíquota do QD (mL)	Alíquota da solução estoque de aminoácido (mL)	Concentração final do aminoácido (mmol L^{-1})
1	1	0	0
2	1	0,05	0,0016
3	1	0,15	0,005
4	1	0,25	0,0083
5	1	0,75	0,025
6	1	1	0,033
7	1	1,5	0,050
8	1	2,0	0,066
9	1	1,2	0,080
10	1	1,5	0,100
11	1	2,0	0,130
12	1	1,2	0,200
13	1	1,5	0,250
14	1	2,0	0,333

Fonte: Autoria própria, 2019

3.4.2 Influência da acidez no meio reacional

A influência da acidez do meio na interação AA-QD foi avaliada para os aminoácidos de cadeia lateral apolar. Os ensaios foram realizados por meio da adição de uma alíquota de 2,0 mL do AA na sonda luminescente composta por 1,0 mL de QD (2,2 nm, 0,05 mmol L⁻¹) e 1,0 mL do tampão com pH final igual a 4,5; 5,0 e 6,0 empregando soluções tampão de acetato de sódio/ácido acético (HAc/Ac⁻). Para tanto, foram preparadas soluções individuais dos aminoácidos L-isoleucina, L-valina e D-leucina com concentração de 1,0 mmol. L⁻¹. As análises foram feitas conforme mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Ensaios para a avaliação da influência da acidez do meio reacional na interação AA/QD.

Aminoácido	Alíquota do QD (mL)	Alíquota do aminoácido (mL)	Solução do tampão de acetato de sódio (mL)
L-Isoleucina	1	2	2
L-Valina	1	2	2
D-Leucina	1	2	2

Fonte: Autoria própria, 2019

3.4.3 Avaliação do mecanismo de supressão

O mecanismo de supressão foi investigado mediante avaliação do efeito da temperatura. Para os ensaios foi preparada uma solução estoque de His (129,0 mmol L⁻¹) para tomada de alíquotas de 38 a 271 µL de modo a obter uma faixa de concentração entre 5,0 e 35 mmol L⁻¹. A alíquota da solução de His foi adicionada à sonda composta por 0,25 mL do QD (2,2 nm, 20,0 µmol L⁻¹) e 0,25 mL do tampão amoniacal (0,25 mol L⁻¹, pH 8), para volume final de 1,0 mL. Os ensaios foram acondicionados nas temperaturas de 20°C (banho de gelo 27°C (temperatura ambiente) e 35°C (banho aquoso). As análises foram feitas mediante a adição da alíquota teste à cubeta de quartzo e o espectro de emissão foi registrado de 450 a 600 nm ($\lambda_{exc}= 400$ nm) nas temperaturas supracitadas.

O efeito da força iônica foi avaliado por meio da adição de NaCl (0,1 a 0,3 mol L⁻¹) à sonda composta por 0,25 mL de QD (20,0 µmol L⁻¹, 2,2 nm) e 0,25 mL

de tampão amoniacal ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8) na presença da histidina na faixa de concentração de $5,0$ a $35,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

3.4.4 Otimização do método

O método foi otimizado segundo um modelo univariado, em que parâmetros como tamanho do QD e sua concentração, pH e concentração do tampão foram otimizados. A variação da intensidade do sinal fluorescente foi tomada como resposta analítica para determinação das condições ótimas de análise.

Os tamanhos de QD foram avaliados individualmente frente ao aminoácido. Foram preparadas soluções estoques dos QD de $2,2 \text{ nm}$ ($50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), $2,8 \text{ nm}$ ($7,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e $3,0 \text{ nm}$ ($8,6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). À sonda composta por 1 mL do QD foi adicionada alíquotas do aminoácido que variaram de $0,05$ a $2,0 \text{ mL}$, as quais foram tomadas de soluções estoques individuais dos mesmos de concentração 1 mmol L^{-1} , para volume final igual a $3,0 \text{ mL}$.

A concentração hidrogeniônica, tendo como resposta o valor de pH, foi otimizada utilizando-se diferentes tipos de tampões. Para pH 5 foi utilizado o tampão HAc/Ac^- ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7 tampão TRIS/HCl ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$) e para pH 8 e 10 foi utilizado o tampão amoniacal ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$). Uma alíquota de $1,0 \text{ mL}$ do tampão foi adicionada à sonda composta por $1,0 \text{ mL}$ do QD na presença do analito (5 e 20 mmol L^{-1}) para volume final de $3,0 \text{ mL}$. Diante do valor de pH otimizado, a concentração do tampão foi então investigada na faixa de $0,1$ a $0,8 \text{ mol L}^{-1}$.

Para a avaliação da concentração do QD foram preparadas soluções estoques de concentrações entre $2,5$ e $30 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, em que a alíquota de $1,0 \text{ mL}$ do QD foi avaliada na presença de $1,0 \text{ mL}$ do tampão e do analito (20 mmol L^{-1}).

O estudo de interferentes foi feito por meio da adição de alíquotas adequadas de soluções de referência de aminoácidos e metais, de modo a obter os valores máximos de tolerância para o método estipulados a partir da variação da resposta analítica de 5% para mais ou para menos. Para ambos procedimentos uma alíquota do analito (20 mmol L^{-1}) foi adicionada à sonda composta por $0,25 \text{ mL}$ do QD e $0,25 \text{ mL}$ do tampão na presença dos interferentes separadamente ($V_f = 1,0 \text{ mL}$).

3.4.5 Validação do Método

O método otimizado foi validado por meio de uma curva analítica, a qual foi construída em meio aquoso com 6 níveis de concentração em triplicata, a partir da diluição adequada da solução estoque de His de modo a obter a faixa de concentração de 2,5 a 35 mmol L⁻¹. De acordo com a resolução 166 da ANVISA (BRASIL, 2017) foram determinados os parâmetros como LOD e LOQ, os quais foram calculados de acordo com as equações 6 e 7, respectivamente:

$$LOD = \frac{3,3s}{IC} \quad (\text{Equação 6})$$

$$LOQ = \frac{10s}{IC} \quad (\text{Equação 7})$$

em que s é o desvio padrão residual da linha de regressão e IC é o coeficiente angular da curva analítica. A precisão do método foi determinada por meio da avaliação do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *relative standard deviation*) para dois níveis de concentração da faixa linear de trabalho (2,5 e 20 mmol L⁻¹, $n = 6$) de acordo com a equação 8:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

onde \bar{x} é a média das réplicas de soluções padrão e s é seu desvio padrão.

A exatidão do método foi avaliada por meio de ensaios de adição e recuperação em amostra real de urina em três níveis de concentração (5,0; 10,0 e 20,0 mmol L⁻¹), as quais foram coletadas de voluntários adultos saudáveis. Essas amostras foram congeladas a temperatura de -4°C desde o momento da coleta até as análises. A etapa de pré-tratamento das amostras consistiu em centrifugá-las em 4000 rpm por 10 minutos antes das análises. De modo a avaliar o efeito matriz, conforme descrito na norma 166 da ANVISA (BRASIL, 2017), o critério adotado para a investigação do mesmo foi a avaliação do paralelismo entre as curvas relativas ao analito em solvente e amostra fortificada. Desse modo, foi preparada uma curva analítica em meio de urina e uma curva analítica em meio de urina artificial, segundo o procedimento de Laube e colaboradores

(LAUBE; MOHR; HESSE, 2001), a fim de compará-las com uma curva analítica em meio aquoso.

As amostras de suplementos de cloridrato de L-histidina (L-histidina.HCl) foram obtidas de farmácias locais de manipulação em forma de cápsulas com teores de 150 mg e 500 mg de His por cápsula. Para as análises, 10 cápsulas foram homogeneizadas e então foi pesada uma massa equivalente a massa de uma cápsula a L-histidina, sendo os ensaios realizados em triplicata independentes. Essas amostras foram solubilizadas em 2,0 mL de água deionizada e depois filtradas (papel de filtro qualitativo) por gravidade.

Para ambas as amostras (urina e suplemento) as análises foram feitas mediante a tomada de uma alíquota de 0,250 mL das soluções das amostras, a qual foi adicionada a sonda composta por 0,250 mL de tampão amoniacal (0,25 mol L⁻¹, pH 8,0) e 0,250 mL da dispersão do QD (20,0 μmol L⁻¹), para um volume final de 1,0 mL.

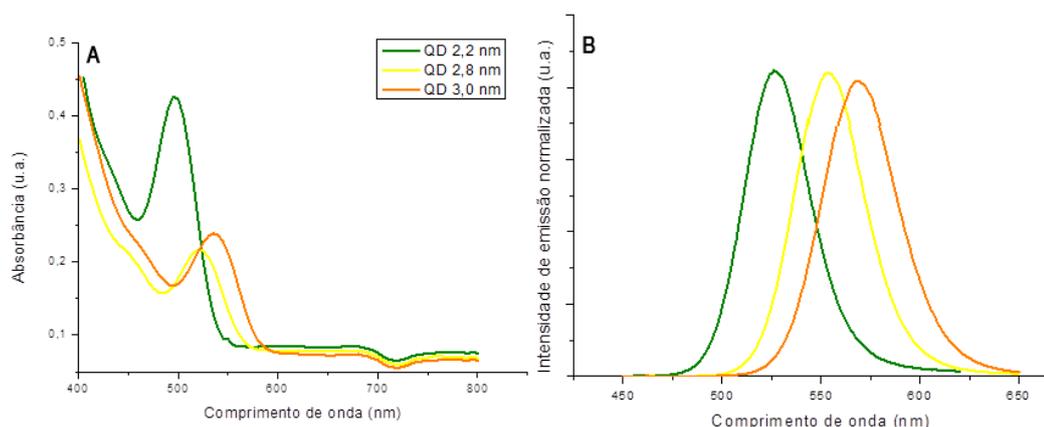
CAPÍTULO 4

4. Resultados e discussão

4.1 Caracterização das propriedades óticas QD

Após a realização das sínteses foram obtidos QD de GSH-CdTe de diferentes tamanhos. A glutiona (GSH) foi escolhida como ligante de superfície tendo em vista a sua compatibilidade em meios biológicos devido à suas funções bioquímicas no metabolismo humano, bem como, a sua possível interação com biomoléculas (aminoácidos). A caracterização das propriedades óticas dos QD foi feita mediante obtenção dos espectros de absorção e emissão que são mostrados na Figura 2.

Figura 2. Espectros de absorção para os QD de GSH-CdTe de (A) 2,2 nm, 2,8 nm e 3,0 nm. (B) Espectros de emissão para os respectivos tamanhos de Qd de GSH-CdTe sintetizados.



Os espectros de emissão para os QD sintetizados apresentaram uma banda de emissão estreita, sugerindo que os QD sintetizados têm distribuição de tamanho homogênea, o que pode ser comprovado pelos valores da largura de banda à meio pico (FWHM, do inglês “*Full Width Half Maximum*”) calculados (Tabela 4) (SANTANA, et al., 2015).

Tabela 4. Caracterização das propriedades óticas dos QD sintetizados.

Tamanho do QD (nm)	FWHM (nm)	$\lambda_{\text{emissão}}$ (nm)	$\lambda_{\text{absorção}}$ (nm)	Tempo de síntese (min)	Concentração do QD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Cor de emissão
2,2	36	528,95	496,98	15	8,8	Verde
2,8	42	552,05	521,21	40	3,8	Amarelo
3,0	56	567,05	537,03	60	3,0	Laranja

Fonte: autoria própria, 2019

Após a caracterização óptica foi possível obter QD de GSH-CdTe com estimativa de tamanho médio que variou de 2,2 a 3,0 nm, com comprimentos de emissão na faixa de 528,97 a 537,03 nm com as respectivas cores de emissão de verde à laranja.

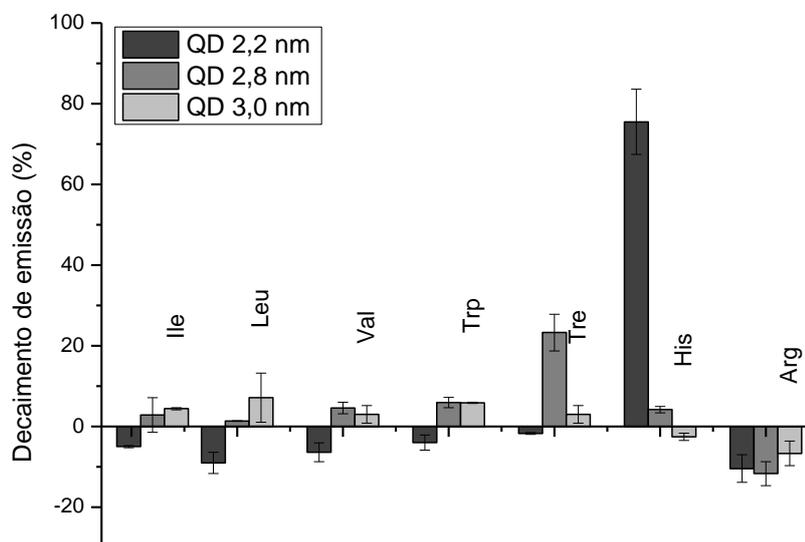
4.2 Avaliação da interação dos QD com aminoácidos

O desenvolvimento de métodos fluorescentes empregando nanocristais de CdTe para determinação de aminoácidos essenciais majoritariamente foram baseados na estratégia *turn-off-turn-on*. A formação de complexos estáveis entre aminoácidos e íons metálicos pode ser adotada para sensibilização indireta dos QD, tendo sido, portanto, foco de atenção a já bem conhecida interação íon-AA e/ou íon-QD. Dessa forma, para os estudos de sensibilização direta de QD de GSH-CdTe por AA foi avaliada a forma de interação entre essas espécies com base na característica das suas cadeias laterais.

Os AA em meios aquosos podem se apresentar de três formas diferentes: catiônica ($\text{pH} < \text{pI}$ (ponto isoeletrônico)), *zwitterion* ($\text{pH} = \text{pI}$, carregados positiva e negativamente, a carga total é nula) e aniônica ($\text{pH} > \text{pI}$). Os ensaios iniciais para a avaliação da interação AA-QD foram realizados em meio aquoso. Para tanto, os AA foram divididos em três grupos distintos: Ile, Val e Leu (apolares), His e Arg (básicos) e Trp e Tre (polares neutros), e foram avaliados individualmente frente aos distintos tamanhos de QD sintetizados (2,2; 2,8 e 3,0 nm).

Para o QD de 3,0 nm foi possível observar que os aminoácidos de cadeia lateral apolar (Ile, Val e Leu, pI 6,0) não apresentaram variação significativa no sinal de emissão do QD ($\Delta F \leq 5\%$). O mesmo comportamento foi observado para os aminoácidos de cadeias laterais polares neutras, Tre (pI 5,6) e Trp (pI 5,9) e para os aminoácidos de cadeia lateral básicas, His (pI 7,6) e Arg (pI 10,8), em meio aquoso, como mostrado na Figura 3.

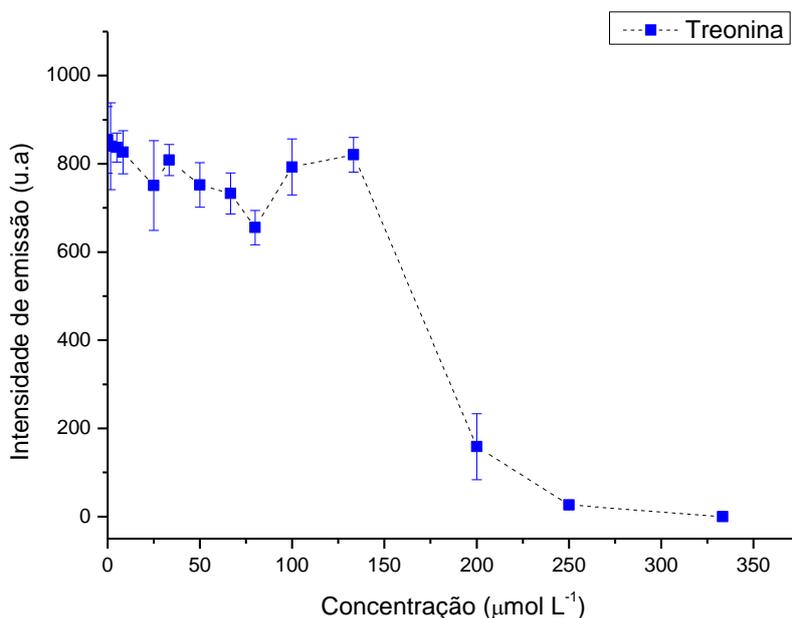
Figura 3. Avaliação da interação de pontos quânticos de GSH-CdTe de diferentes tamanhos (2,2; 2,8 e 3,0 nm) com os aminoácidos Iso, Leu, Val, Trp, Tre, His e Arg na concentração de 80,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em meio aquoso (Dados: $\lambda_{\text{excitação}} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emissão}} = 528,95 \text{ nm}$; 552,05 nm e 567,05 nm, respectivamente).



Fonte: Autoria própria, 2019

Os aminoácidos de cadeia lateral apolar apresentaram um comportamento semelhante ao observado para os QD de 3,0 nm para os QD de 2,8 nm, não apresentando uma variação significativa na emissão dos QD ($\Delta F \leq 5\%$). O Trp também não apresentou interação com o QD de 2,8 nm, contudo a Tre propiciou um decaimento no sinal de emissão do QD de 2,8 nm para concentrações de 80,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($\Delta F = 23\%$) em meio aquoso (Figura 3) chegando a supressão total do sinal de emissão do QD para concentrações acima de 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 4).

Figura 4. Avaliação da interação do QD de GSH-CdTe de 2,8 nm com o aminoácido L-treonina na faixa de concentração de 1,6 a 333 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em meio aquoso. (Dados: $\lambda_{\text{excitação}} = 400 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 552,05 \text{ nm}$)



Fonte: Autoria própria, 2019.

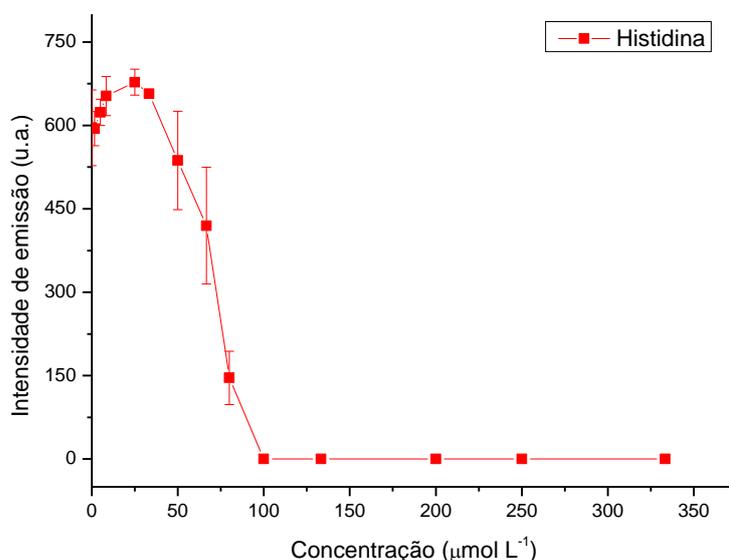
Esse comportamento ainda é passível de investigação devido à escassez de trabalhos na literatura que apresentem a determinação da Tre mediante interação direta com o QD, visto que, a interação indireta ainda é a mais comumente usada, como no trabalho desenvolvido por Liu e colaboradores que visou a determinação desse AA por meio da interação QD-íon/íon-AA (LIU et al., 2013).

Os QD de 2,2 nm também foram avaliados frente aos aminoácidos em meio aquoso. Os aminoácidos de cadeia lateral apolar e polar neutra não apresentaram variação significativa no perfil de emissão desse nanocristal ($\Delta F \leq 5\%$) (Figura 3). No tocante aos AA de cadeia lateral básica era esperado que a presença de carga positiva em suas estruturas promovesse uma interação do tipo eletrostática com a carga negativa do ligante tiólico, porém a disponibilidade de sua carga depende do seu pI (ponto isoelétrico) e do pH do meio.

A Arg (pI 10,8) não apresentou interação significativa com nenhum tamanho de QD sintetizado ($\Delta F = -9\%$), embora se encontre majoritariamente em sua forma catiônica em meio aquoso. A His (pI 7,6) por sua vez não apresentou variação no perfil de emissão dos QD de 2,8 nm e 3,0 nm, porém

para o QD de 2,2 nm, foi possível observar uma variação significativa na intensidade de emissão do QD para concentrações acima de 80,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($\Delta F=75\%$) sendo observada uma atenuação brusca do sinal, chegando a supressão da emissão da sonda empregada para concentrações a partir de 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 5).

Figura 5. Avaliação da interação do QD de GSH-CdTe de 2,2 nm com o aminoácido L-histidina na faixa de concentração de 1,6 a 333 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em meio aquoso. (Dados: $\lambda_{\text{excitação}}=400\text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}}=528,95\text{ nm}$)



Fonte: autoria própria, 2019.

Essa interação efetiva da L-histidina com o QD 2,2 nm se deu devido a presença do grupo imidazol na sua cadeia lateral. Destaca-se que investigações anteriores comprovaram a interação direta entre compostos imidazólicos e QD (DONG et al., 2009) Além do que, como o meio reacional apresentava $\text{pH} \cong \text{pI}$ da His, a sua carga total é nula, pois ela se encontra na forma de *zwitterion*, isto é, o grupo amina se encontra carregado positivamente e o grupo carboxílico se encontra carregado negativamente possibilitando uma interação do tipo ligação de hidrogênio ou forças de Van der Waals com o ligante de superfície do QD (glutaciona) (RAMÍREZ-HERRERA et al., 2017; RAWAT; KAILASA, 2014).

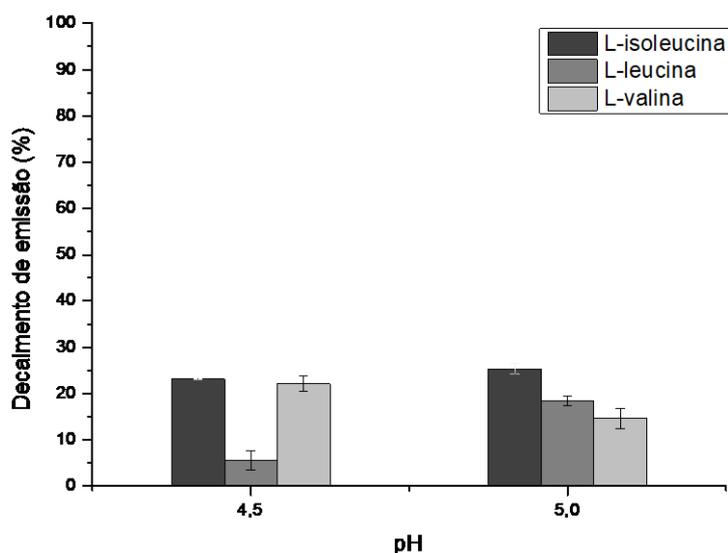
O decaimento do sinal de emissão dos QD foi apenas observado para o menor tamanho sintetizado frente a His na faixa de concentração avaliada (1,6 a 333 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Esse comportamento pode estar relacionado ao fato que para tamanhos menores do QD (2,2 nm) os supressores podem atingir o *core* do QD

e/ou interagir com os *caps*. Neste caso, as concentrações de L-histidina avaliadas foram suficientemente elevadas de modo a aumentar as interações efetivas entre esta e a superfície dos QD (*core* e *cap*) durante o seu tempo de vida excitado, levando assim a uma supressão do sinal de emissão da sonda. Esse fenômeno não foi observado para os tamanhos maiores de QD (2,8 e 3,0 nm), pois quanto maior o tamanho da nanopartícula, maior é a superfície, e então maior a quantidade de moléculas de glutatona a interagir com o analito, bem como, há também o aumento das forças de atração e repulsão entre os ligantes de superfície e o analito impedindo a aproximação do mesmo com o núcleo do QD (ZHONG et al., 2012).

De modo a avaliar o modelo de interação, foram feitos ensaios em meio ácido visando propiciar a protonação dos sítios básicos de aminoácidos de cadeia lateral apolar (Iso, Leu e Val, ambos possuem pI 6,0) os quais previamente não interagiram com os QD avaliados.

A faixa de pH avaliada foi escolhida baseada no fato que em meios ácidos os QD têm a sua eficiência quântica diminuída, devido a protonação dos grupos carboxílicos, fato este que ocasionaria na obtenção de sinais de referência (QD na ausência de aminoácido) baixos, ou até mesmo a supressão total, inviabilizando o emprego da sonda. Foi possível perceber que em pH 4,5 os aminoácidos de cadeia apolar apresentaram um decaimento significativo no sinal de emissão do QD na faixa de 5 a 23%, esse mesmo comportamento foi observado em pH 5,0 como uma faixa de decaimento de 14 a 25%, não apresentando interação significativa em pH 6,0 (Figura 6).

Figura 6. Avaliação da influência do pH na interação entre os aminoácidos apolares e o QD de GSH-CdTe de 2,2 nm. (Dados: $\lambda_{excitação} = 400$ nm; $\lambda_{emissão} = 528,95$; $C_{AA} = 80,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; $C_{QD} = 50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$).



Fonte: autoria própria, 2019

Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que em pH menores do que o pI dos AA, a forma catiônica do aminoácido prevalece, de modo que, pode-se presumir que quando o grupo amino do aminoácido está protonado (forma catiônica) as interações entre esses e os ligantes de superfície será do tipo eletrostática, (carga positiva do grupo amino com a carga negativa do grupo carboxílico).

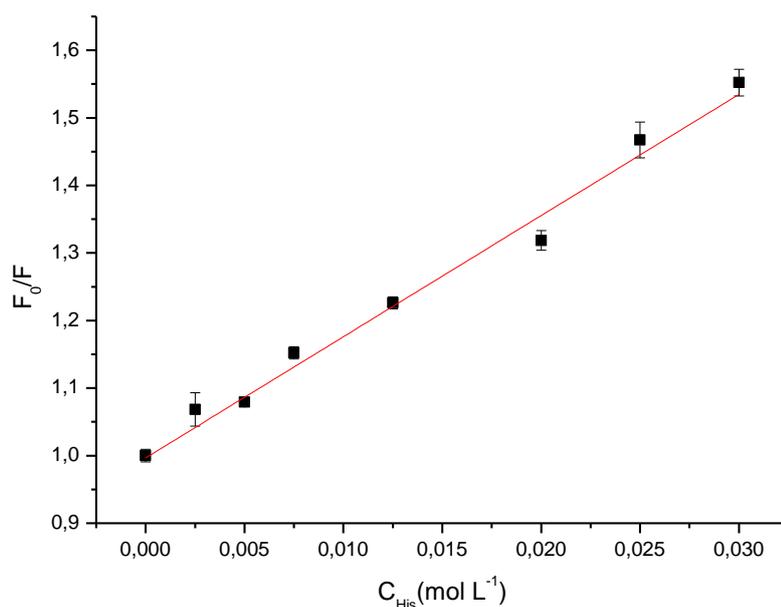
Os aminoácidos Tre e His apresentaram uma interação significativa frente aos QD de 2,8 nm e 2,2 nm, respectivamente. Tendo em vista que ambas foram avaliadas nas mesmas condições analíticas e mesma faixa de concentração (1,6 a $333 \mu\text{mol L}^{-1}$), a His interferiu no perfil de emissão do QD mais significativamente do que a Tre (maior percentual de decaimento para concentração de $80,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), sugerindo uma interação com o QD mais eficiente, sendo, portanto, escolhida como espécie alvo.

4.3 Mecanismo de quenching para o sistema GSH-CdTe-his

Os fenômenos de superfície que podem levar à supressão do sinal de emissão do QD podem ser caracterizados como dinâmico, estático ou uma combinação dos dois, nesse caso o modelo de Stern-Volmer é caracterizado por uma relação não-linear e representado pelo polinômio da equação 1.

De acordo com a Figura 7, o gráfico de Stern-Volmer apresentou um comportamento linear para a faixa de concentração avaliada (5 a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$), mostrando que o mecanismo de *quenching* entre o GSH-CdTe e a histidina não é uma combinação do *quenching* dinâmico e estático (SHEN et al., 2013). A equação de Stern-Volmer determinada para a interação His-QD foi igual a $F_0/F = (0,99669 \pm 0,00859) + (17,93434 \pm 0,86803)[\text{His}]$ ($r = 0,99305$).

Figura 7. Gráfico de Stern-Volmer para o sistema GSH-CdTe-His. (Dados: $C_{\text{His}} = 0$ a $0,035 \text{ mol L}^{-1}$, $C_{\text{QD}} = 20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, pH 8,0).



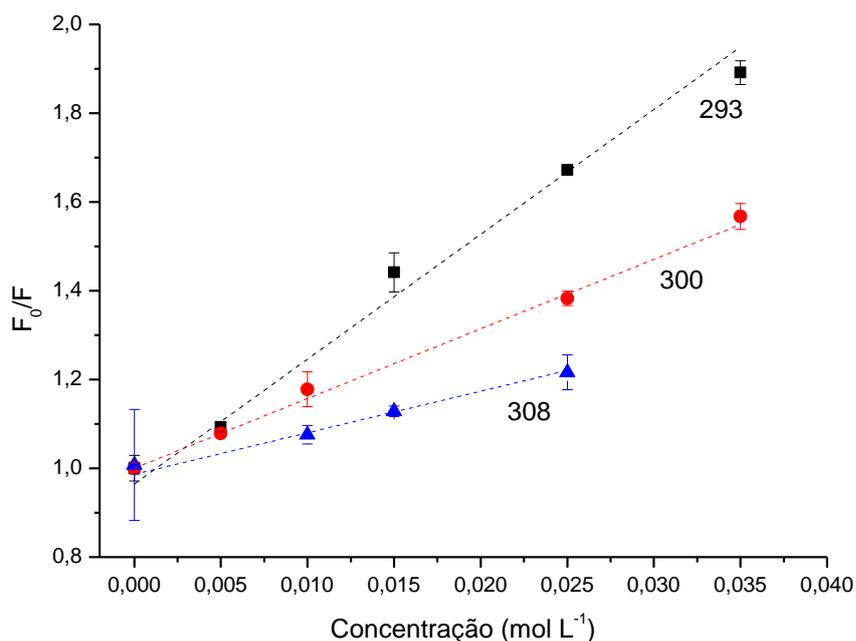
Fonte: Autoria própria, 2019.

O estudo do mecanismo para o sistema GSH-CdTe-His foi baseado no modelo de Stern-Volmer, sendo observado por meio das curvas analíticas apresentadas na Figura 8 em três temperaturas diferentes. As constantes de *quenching* (K_{sv}) a qual define a eficiência do supressor [Q], foi estipulada de acordo com a equação 9.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] \quad (\text{Equação 9})$$

Como é possível perceber as constantes de *quenching* são os coeficientes angulares do modelo matemático de Stern-Volmer. Os seus valores diminuem à medida que a temperatura aumenta e esse comportamento indica que o tipo de *quenching* para o sistema GSH-CdTe-His é estático. O *quenching* do tipo dinâmico ocorre mediante colisões entre as moléculas do analito e os fluoróforos, o qual seria favorecido pelo aumento da temperatura haja vista que este fator aumentaria significativamente a cinética das moléculas, logo, aumentaria o número de colisões, aumentando por sua vez os valores das constantes de *quenching* (SHEN; LIU; HE, 2014; YANG et al., 2015).

Figura 8. Curvas de Stern–Volmer para o sistema QD de GSH-CdTe–his em três temperaturas diferentes. Dados: $C_{QD} = 20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; $C_{His} = 0$ a $0,035 \text{ mol L}^{-1}$; pH 8,0.



Fonte: Autoria própria, 2019.

A Tabela 5 apresenta os parâmetros de Stern-Volmer, como, as equações lineares para cada temperatura bem como os seus coeficientes de correlação (r).

Tabela 5. Parâmetros de Stern-Volmer para o sistema GSH-CdTe-his em diferentes temperaturas (Dados: $C_{QD} = 20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; $C_{His} = 0$ a $0,035 \text{ mol L}^{-1}$; pH 8,0)

Temperatura (K)	Parâmetros de Stern-Volmer		
	Equação linear de Stern-Volmer	K_{sv} (10 L mol^{-1})	r
293	$F_0/F = 0,96456 + 28,1 [Q]$	2,81	0,99825
300	$F_0/F = 1,0002 + 15,7 [Q]$	1,57	0,99922
308	$F_0/F = 0,98644 + 0,0097 [Q]$	0,94	0,99572

O quenching de fluorescência do QD de GSH-CdTe pela His pode ser analisado por uma equação de Stern-Volmer modificada (equação 10):

$$\frac{F_0}{(F_0 - F)} = \frac{1}{f_a K_a} \frac{1}{[Q]} + \frac{1}{f_a} \quad (\text{Equação 10})$$

em que K_a é a constante de quenching efetiva para os fluóforos acessíveis ou constante de associação e f_a é a fração de fluoróforos acessíveis. A tendência decrescente dos valores de K_a com o aumento da temperatura, como observado na Tabela 6, corrobora com o comportamento observado para os valores de K_{sv} , sendo um indicativo de que a ligação His-QD foi moderada e esse complexo formado é reversível (SHUAI et al., 2014).

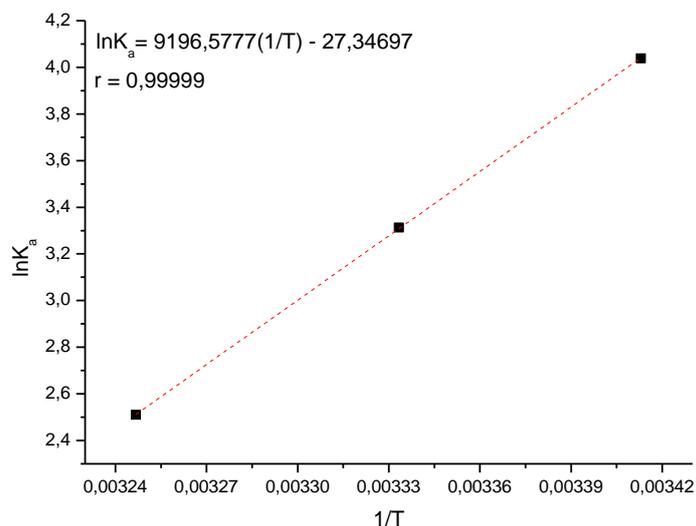
Geralmente, as ligações de hidrogênio, as forças de Van der Waals, as forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas, são consideradas como as principais forças que atuam entre ligantes pequenos (QD) e biomoléculas (His) (HOU et al., 2019). O tipo de força preponderante da complexação His-QD pode ser obtida por meio do cálculo dos parâmetros termodinâmicos ΔH e ΔS (Tabela 6) os quais foram obtidos por meio da equação de van't Hoff (equação 11), sendo utilizados para obter a energia livre de Gibbs (equação 12):

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \quad (\text{Equação 11})$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Equação 12})$$

em que K_a é a constante de associação para cada temperatura e R é a constante universal dos gases. O gráfico de Van't Hoff é apresentado na Figura 10.

Figura 9. Gráfico de Van't Hoff



Fonte: autoria própria, 2019

Por meio da sua equação linear foi possível obter os valores de $\Delta H = -76,5 \text{ KJ mol}^{-1}$ e $\Delta S = -227,4 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Os valores de $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$ indicaram que a formação do complexo His-QD se deu por um processo exotérmico estando associados a interações do tipo força de Van der Waals e ponte de hidrogênio. Os valores de $\Delta G < 0$ demonstraram a que a complexação His-QD ocorre por meio de um processo espontâneo (HUANG et al., 2015; KACHOOEI et al., 2016) (Tabela 6).

Tabela 6. Constante de associação (K_a) e parâmetros termodinâmicos para o sistema GSH-CdTe-His (Dados: $C_{\text{QD}} = 20,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$; $C_{\text{His}} = 0 \text{ a } 0,035 \text{ mol L}^{-1}$; pH 8,0)

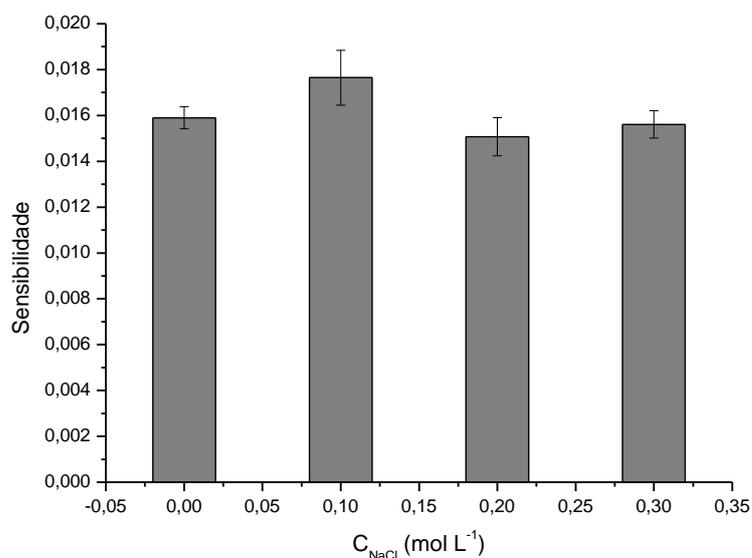
Temperatura (K)	K_a (10 L mol^{-1})	ΔG (KJ mol^{-1})	ΔH (KJ mol^{-1})	ΔS ($\text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
293	5,7	-9,8		
300	2,5	-8,3	-76,5	-227,4
308	1,3	-6,4		

Fonte: autoria própria, 2019.

De modo a ratificar o tipo de interação observada entre a histidina e o QD, foi realizado um estudo referente a influência da força iônica do meio. Esse

estudo avaliou a sensibilidade das curvas analíticas na presença de NaCl na faixa de concentração de 0,1 a 0,3 mol L⁻¹ sendo possível perceber que a sensibilidade analítica não apresentou diferença significativa na ausência e na presença do sal (Figura 10). Esse comportamento está relacionado ao fato de que a interação entre o QD e a His tem como preferência as forças de Van der Waals e pontes de hidrogênio do que as interações eletrostáticas. Isso porque, caso as interações eletrostáticas fossem o tipo de interação preferencial entre a His e o QD, seria observado um decaimento na sensibilidade analítica das curvas com o aumento da concentração do NaCl, pois este promoveria aumento da força iônica do meio levando a uma diminuição na interação His-QD (VAZ et al., 2017).

Figura 10. Avaliação da influência da força iônica no sistema QD-His. (Dados: C_{QD}= 20,0 μmol L⁻¹; C_{His}= 20,0 mmol L⁻¹).

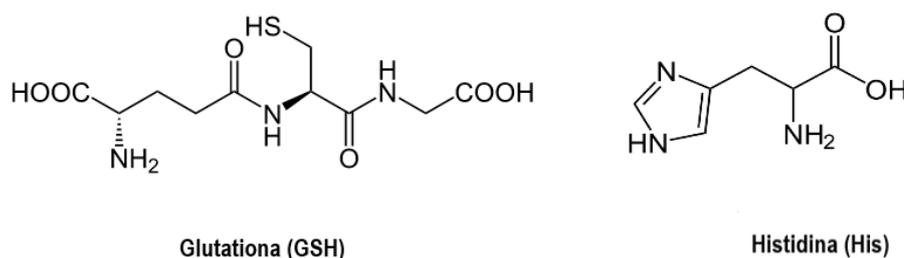


De modo a identificar o sítio de interação entre His e QD, a constante de ligação K_b e o n, número de sítios de interação, foram obtidos para as três temperaturas por meio da equação 13:

$$\log \left[\frac{F_0 - F}{F_0} \right] = \log K_b + n \log [Q] \quad (\text{Equação 13})$$

em que [Q] é a concentração molar da histidina.

Figura 10. Estrutura da glutationa reduzida (GSH) e L-histidina (His)



Fonte: Autoria própria, 2019.

De acordo com o apresentado na Tabela 7 a K_b apresentou o mesmo comportamento da K_{sv} , isto é, diminuiu com o aumento da temperatura. Esse resultado é um indicativo de que o complexo formado His-QD é instável de modo que, o aumento da temperatura favorece a não formação desse complexo levando a uma diminuição nos valores das constantes (DANTAS et al., 2017).

De acordo com a Figura 11 é possível perceber que o ligante de superfície, GSH, possui nove sítios de interação e o analito, His, apresenta seis sítios de interação. A Tabela 7 apresenta os valores de n em cada temperatura para a formação do complexo His-QD, sendo seus valores próximos a um, implicando na existência de apenas um sítio de interação entre His e QD, o qual pode estar relacionado ao impedimento estérico devido ao grande volume das moléculas envolvidas na formação do complexo, bem como, a disponibilidade dos seus sítios para interação.

Tabela 7. Parâmetros de ligação para o sistema GSH-CdTe-His

Temperatura (K)	K_b (L mol ⁻¹)	n	r
293	$4,23 \times 10^{-2} \pm 0,18$	$0,86 \pm 0,12$	0,96888
300	$2,10 \times 10^{-2} \pm 0,17$	$0,90 \pm 0,12$	0,98216
308	$1,50 \times 10^{-2} \pm 0,19$	$1,01 \pm 0,15$	0,9761

4.4 Otimização e validação do método

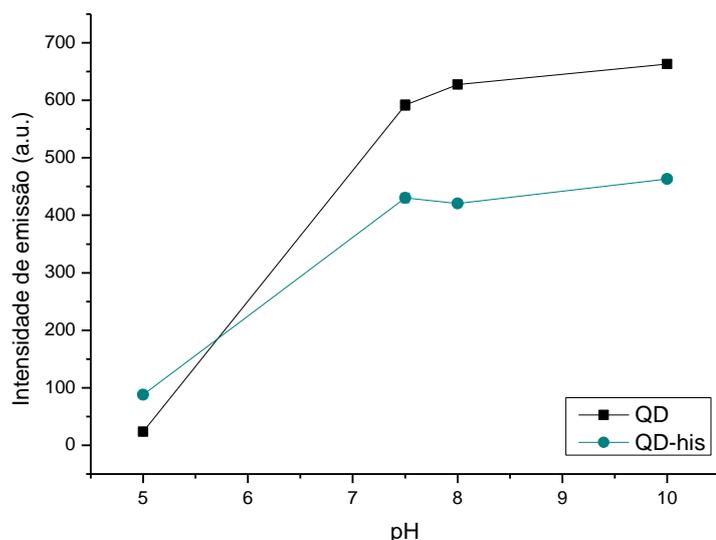
Haja visto, a redução pronunciada da emissão do QD, bem como as constantes adequadas determinada para a interação GSH-CdTe-His foi proposto um método visando a determinação direta de L-histidina, um α aminoácido de cadeia imidazólica, por meio da fluorescência molecular utilizando os QD de GSH-CdTe de 2,2 nm. Para tanto as condições do meio de interação da sonda foram avaliadas para assegurar maior sensibilidade e seletividade.

O pH foi avaliado na faixa de 5,0 a 10,0. Tampões de Ac⁻/HAc (0,25 mol L⁻¹) foram utilizados para pH 5,0 e 6,0, enquanto que tampão TRIS-HCl (0,25 mol L⁻¹) foi utilizado para pH 7,0 e tampão amoniacoal (0,25 mol L⁻¹) foi utilizado para pH 8,0 e 10,0.

Para valores de pH próximos a 5 foi observado a diminuição da eficiência quântica do QD, visto que, em meios ácidos os QD têm seus sítios de interação protonados, de modo que a ligação entre o core (CdTe) e o cap (GSH) é rompida levando a supressão da emissão(H. R; SCHIFFMAN; BALAKRISHNA, 2018). Entretanto, na presença da His foi observado uma amplificação no sinal de emissão ao invés do decaimento de emissão, isto se deve ao fato da histidina competir com os QD pelos prótons do meio.

Para valores de pH acima de 7,5 não foi observado uma variação significativa no sinal de emissão do sistema QD-His, pois, nestes valores de pH há a predominância de espécies OH⁻, as quais não alteram a carga superficial da nanopartícula e, portanto, não interferem no comportamento das mesmas. Esse comportamento do efeito de meios alcalinos sobre QD CdTe recobertos por tióis pode ser ratificado por estudos prévios que indicaram maior interação dessas nanopartículas com aminoácidos e antioxidantes assegurando um aumento da sensibilidade analítica(SHENG; CHEN, 2017). Foi observado um decaimento de emissão máximo a pH 8 ($\Delta F= 42\%$), sendo este escolhido como ótimo (Figura 12).

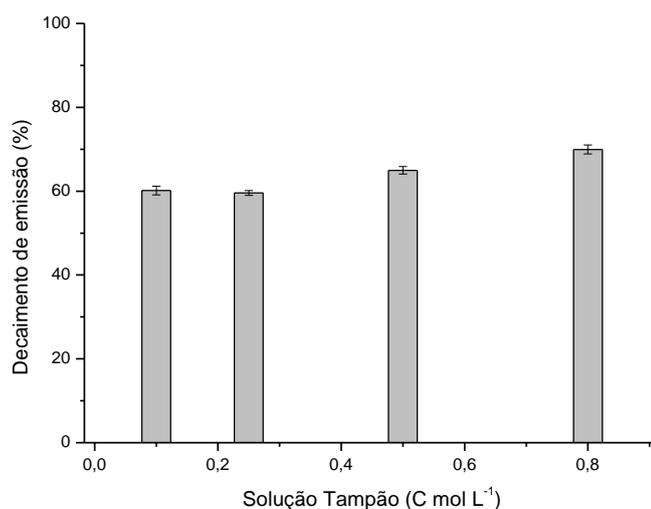
Figura 11. Avaliação do efeito do pH no sistema GSH-CdTe-His (Dados: $C_{\text{His}} = 20 \text{ mmol L}^{-1}$, $C_{\text{QD}} = 50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$)



Fonte: Autoria própria, 2019.

Adicionalmente, a concentração do tampão amoniacal ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) foi avaliada na faixa de $0,1$ a $0,8 \text{ mol L}^{-1}$, não apresentando diferença significativa no sinal de emissão do QD na presença e na ausência da histidina (20 mmol L^{-1}). Sendo a concentração de $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ escolhida como ótima por apresentar uma menor concentração, logo menor consumo de reagentes, mas que apresenta capacidade tamponante adequada para a manutenção do pH da sonda luminescente para análise de amostras de urina e suplementos (Figura 13).

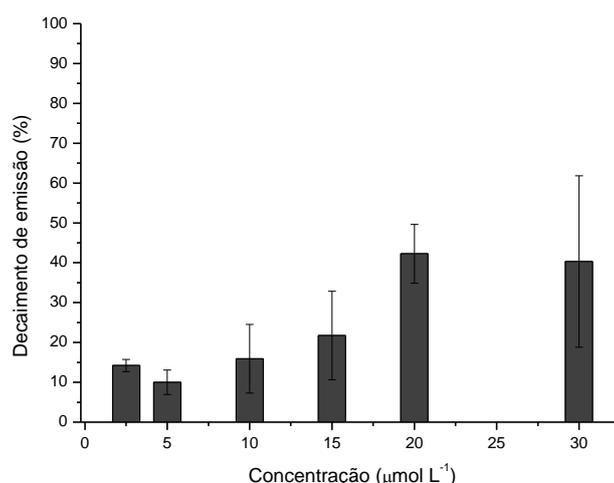
Figura 12. Avaliação da concentração da solução tampão amoniacal na faixa $0,1$ a $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ ($C_{\text{His}} = 20 \text{ mmol L}^{-1}$)



A concentração da dispersão do QD também foi avaliada. A faixa de concentração foi de $2,5$ a $30,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, sendo observado um percentual de

decaimento $\Delta F = 42\%$ para a concentração de $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ na presença da histidina, embora a concentração de $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ tenha apresentado um $\Delta F = 40\%$, a concentração de $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi escolhida como ótima por apresentar uma melhor precisão, sendo então fixada para realização dos ensaios posteriores (Figura 14).

Figura 13. Avaliação da concentração do QD na faixa 2,5 a $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($C_{\text{his}} = 20 \text{ mmol L}^{-1}$).



Fonte: Autoria própria, 2019

Após o estabelecimento das condições ótimas de análise foram estimadas as figuras de desempenho analítico para validação do método proposto.

Primeiramente, foi realizada a avaliação do efeito matriz segundo a norma RDC 166 da ANVISA, que preconiza a comparação da curva em solvente e a curva em amostra fortificada, para avaliação do efeito da matriz amostral sobre a resposta analítica. De acordo com a referida norma, a avaliação do efeito de matriz deve ser realizada por meio do teste de paralelismo, caso as curvas sejam paralelas pode-se inferir que não há impacto da matriz sobre o método, ou seja, a calibração do método pode ser realizada em solvente (ANVISA, 2012).

O paralelismo das retas pode ser testado por dois tipos de métodos estatísticos, Método I, quando se utiliza ajustes separados para comparar duas retas e Método II, quando se usa uma simples equação de regressão (GUEDES et al., 2001). Para ambos os métodos as variáveis preditoras são ditas contínuas, podendo ser baseada no uso de variáveis *dummy*, as quais são utilizadas para

comparar duas ou mais retas de regressão. A partir da variável *dummy* o modelo de regressão linear completo dá-se por:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_2 X_{i2} + \beta_3 X_{i1} * X_{i2} + \varepsilon_i \quad i = 1, \dots, n \quad (\text{Equação 10})$$

em que:

Y_i : variável resposta (Sinal Analítico), que se relaciona com $p=3$ variáveis explicativas;

β_0 : intercepto do modelo;

β_1 : coeficiente de regressão correspondente a variável explicativa Concentração;

X_{i1} : variável explicativa Concentração;

β_2 : coeficiente de regressão correspondente a diferença no intercepto;

X_{i2} : variável *dummy* (Efeito Matriz);

β_3 : coeficiente de regressão correspondente a diferença no coeficiente angular (paralelismo);

ε_i : erro experimental.

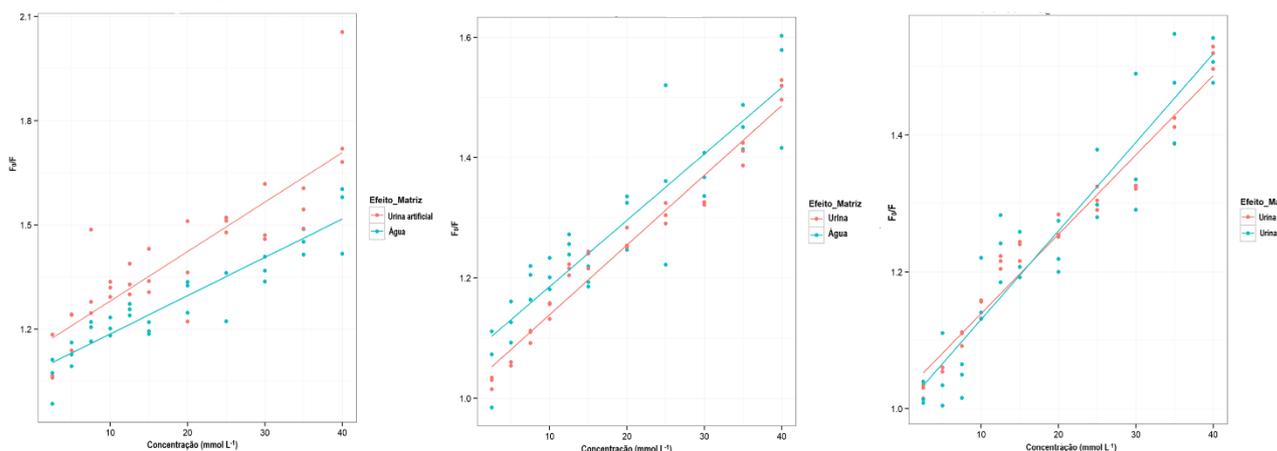
Nesse estudo, o teste do paralelismo foi avaliado segundo o Método II e a hipótese nula de que as duas curvas analíticas são paralelas é $H_0: \beta_3=0$. O teste F foi o teste utilizado para testar a hipótese nula, como mostrado na Equação 11:

$$F_0 = \frac{SQR(\beta|\beta_R)/1}{QME} \sim F_{1,(n-4)} \quad (\text{Equação 11})$$

em que SQR é a soma dos quadrados e QME é o quadrado médio (Tabela 8), então, se $F_0 > F_{\alpha,1,(n-4)}$ a hipótese nula é rejeitada, isto é, $\beta_3 \neq 0$, em que $\alpha=0,05$ de acordo com a norma RDC 166. O p-valor que é dado por $P[F_{1,(n-4)} > F_0]$ quando maior que α , a hipótese nula é verdadeira, logo, não há efeito matriz.

Para a avaliação do paralelismo foram feitas três comparações: uma curva analítica em água e a outra curva analítica em urina artificial, uma curva analítica em água e a outra curva analítica em urina e por fim a comparação entre uma curva analítica em urina e a outra curva analítica em urina artificial (Figura 15).

Figura 14. Avaliação do efeito matriz: comparação entre curvas analíticas em água, urina artificial e urina) para avaliar o paralelismo.



Fonte: Action Stat, 2019.

Os valores de P-valor encontrados após a análise das curvas (Tabela 8), mostraram que estes foram maiores do que $\alpha=0,05$, então, a hipótese nula foi aceita não havendo efeito matriz sobre a metodologia (ANVISA, 2003).

Tabela 8. Avaliação do efeito matriz: parâmetros estatísticos

Comparação entre curvas	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Estatística F	P-valor
Urina artificial x Água	1	0,02	3,34	0,07
Urina x Água	1	0,0008	0,31	0,58
Urina artificial x Urina	1	0,004	2,06	0,16

Fonte: Autoria própria, 2019.

As amostras de urina foram analisadas mediante a curva analítica feita em urina artificial de modo a garantir que a composição química da matriz estivesse presente em todos os pontos analisados, tendo como resposta analítica a razão entre o sinal do branco e o sinal da amostra fortificada (F_0/F). De acordo com as características das amostras de suplemento de cloridrato de L-histidina (HCl.L-histidina), isto é, o analito presente na amostra é solúvel em água e o excipiente que seria um potencial interferente para a metodologia é pouco solúvel em meio aquoso, a avaliação do efeito matriz não foi realizada

para as amostras de suplemento, as quais foram analisadas em água, tendo como resposta analítica o sinal de fluorescência (F).

A faixa linear de trabalho obtida foi de 2,5 a 35 mmol L⁻¹ com boa linearidade ($r = 0,9970$ para $n = 7$). O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) do método foi igual a $1,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e $4,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, respectivamente. O método apresentou boa precisão com RSD menor que 2,5% (para 2,5 e 20 mmol L⁻¹; $n = 6$). A comparação dos valores de LOD e faixa linear de trabalho com outros trabalhos que utilizaram QD como sondas estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Comparação das características do método proposto com outros métodos reportados na literatura para determinação de His com QD.

Método	Faixa Linear	LOD (mol L ⁻¹)	Ref
Cu-CQD	$0,1-15 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹	$0,3 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹	(CHE et al., 2019)
GSH-CdTe-Mn(II)	$3,8 \times 10^{-8} - 3,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹	$1,17 \times 10^{-11}$ mol L ⁻¹	(YANG et al., 2015)
CQD-Hg(II)	$0,50 - 60 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹	$0,15 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹	(HOU et al., 2015)
ZnSe-H ₂ O ₂	$0,5 - 50 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹	$0,1 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹	(HOSSEINI et al., 2015b)
DNA- Ag NCs	$0,20 - 80 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹	$4,3 \times 10^{-9}$ mol L ⁻¹	(ZHENG et al., 2015)
Ni(II)-Hcy-CdTe	$461- 940 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹	$0,3 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹	(WU; YAN, 2010)
GSH-CdTe	$2,5 - 30 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹	$1,6 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹	Presente trabalho

Fonte: Autoria própria, 2019.

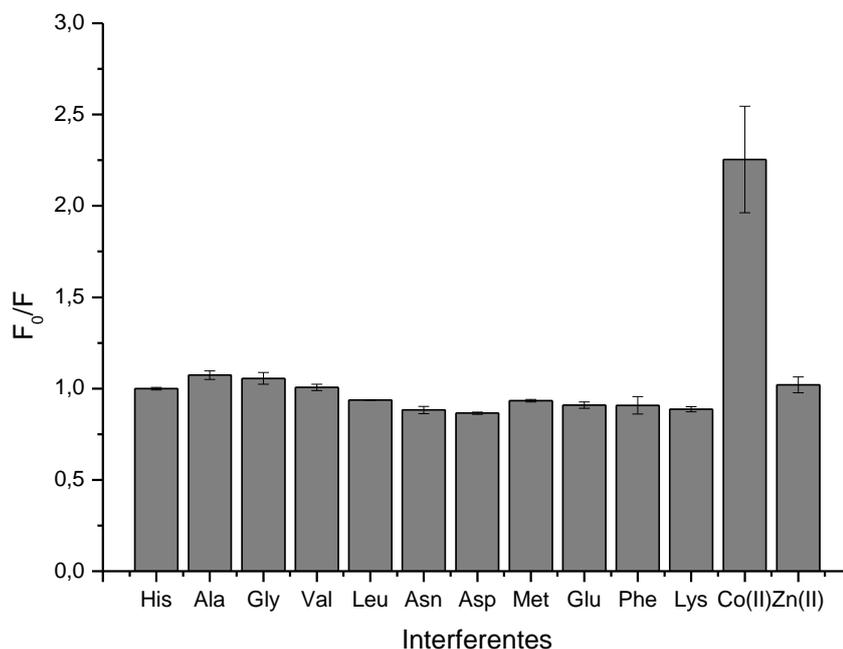
Pode-se constatar que o presente estudo apresentou um LOD de maior magnitude frente a métodos anteriormente reportados na literatura. Acredita-se que tal comportamento possa estar relacionado ao fato que ao utilizar metais como intermediários, visto que, a maioria dos metais bivalentes são capazes de formar complexos com a histidina com constantes de formação (β_n) com magnitude muito maiores do que a magnitude das constantes de ligação (k_b) para interação His-QD, permitindo que a interação His-Metal seja mais eficaz do que a interação His-QD, os métodos que utilizam a estratégia de detecção indireta da fluorescência acabam se tornando mais sensíveis, pois, uma quantidade adequada de histidina adicionada à sonda é capaz de retirar os

metais ligados aos QD por meio da formação de um complexo, reestabelecendo a emissão de fluorescência (RABIN; LEBERMAN, 1959).

Contudo, há uma grande vantagem em determinar as espécies alvo por meio da interação direta deste com o QD, pois não é necessário o uso da espécie intermediária, o que aumenta frequência analítica, e reduza a geração de efluentes e o uso de reagentes, tornando o método mais simples e atendendo à princípios da química verde. Além do que, possibilita o emprego de QD de CdTe-GSH como sondas fotoluminescentes em meios biológicos, nos quais evita-se a utilização de íons metálicos, como Pb(II), Ni(II), Zn(II) e Hg(II) devido à sua toxicidade (MISHRA et al., 2019), embora o Cd(II) também seja considerado um metal tóxico e o responsável pela citotoxicidade dos QD baseados no mesmo, os QD de CdTe revestidos com ligantes tiólicos e os sistemas casca-carçoço como ZnSe/CdSe/CdTe, apresentam baixa toxicidade devido a estabilização do Cd(II), isto é, diminuem a liberação de Cd²⁺ no meio reacional, o que permite a aplicação do mesmo em meios biológicos (LIU; YU, 2010; SU et al., 2010).

Para o estudo de interferentes, foram avaliados os aminoácidos e os metais listados na Tabela 10. Ressalta-se que essas espécies foram avaliadas como possíveis interferentes devido a composição típica das matrizes de urina e suplementos. Nesse contexto, destaca-se que os aminoácidos são comumente encontrados em amostras de urina na faixa de 0 e 586 mmol/mol de creatina e os metais variam entre 4 e 585 mmol/mol de creatina. Para as cápsulas de suplemento que possuem amido como excipiente o valor máximo encontrado de metais é 5 ppm. Todas as espécies investigadas como interferentes não apresentaram interferência significativa no sinal de emissão do sistema GSH-CdTe-his ($\Delta F \pm 5\%$), exceto o Co (II) que apresentou um $\Delta F = 58\%$ (Figura 15).

Figura 15. Estudo de interferentes. Dados: $C_{QD}=20 \text{ mol L}^{-1}$; $C_{His}= 20 \text{ mmol L}^{-1}$, $C_{\text{Tampão}}= 0,25 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0).



Fonte: Autoria própria, 2019.

Entretanto, o teor de Co(II) presente nas amostras analisadas (aproximadamente $7,4 \text{ nmol L}^{-1}$) está usualmente em teores muito inferiores ao limite de tolerância (aproximadamente 30 vezes menor), de modo que não interferiria significativamente na determinação de His nessas amostras. Os teores de Zn(II) que usualmente são encontrados em amostras de urina ($8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) também são menores que o limite de tolerância para o método (aproximadamente 1,5 vezes menor)(CALDWELL et al., 1998; ZHANG et al., 2019). Os teores de aminoácidos usualmente encontrados em urina também se encontram abaixo do limite de tolerância para o método, não interferindo significativamente na determinação de His. A Tabela 7 apresenta as concentrações limites das espécies avaliadas como interferentes para o sistema GSH-CdTe-His.

Tabela 10. Variação do sinal de fluorescência do sistema GSH-CdTe-his na presença de interferentes. Dados: $C_{his} = 20 \text{ mmol L}^{-1}$

Interferentes	Tolerância (mmol L ⁻¹)	Razão analito/interferente	ΔF (%)
Alanina	0,185	108	+4,3
Glicina	0,104	192	+2,7
Valina	0,023	870	-1,4
Leucina	0,045	444	-3,9
Asparagina	0,040	500	+4,0
Ácido Aspártico	0,007	2857	-4,5
Ácido Glutâmico	0,009	2222	-7,7
Metionina	0,012	1666	-8,5
Fenilalanina	0,0165	1212	-6,4
Lisina	0,0020	10000	-7,7
Co (II)	0,00023	86956	+3,7
Zn (II)	0,012	1666	-2,4

Fonte: Autoria própria, 2019.

A exatidão do método foi avaliada por meio dos ensaios de adição para três níveis de concentração em triplicata independentes em amostras de urina apresentando uma recuperação entre 69 e 117% (ANVISA, 2003, 2012; CASSIANO et al., 2009; FDA, 2018).

Os valores de recuperação de 69,2% encontrado para uma das amostras de urina para o nível de adição de 20 mmol L^{-1} pode estar relacionado à complexidade da amostra, como já previstos em estudos anteriores que visaram a determinação de aminoácidos em amostras biológicas, como Wada (2014) que obteve valores de 74% para metionina e Febriani (2004) que obteve o valor de 69% para cisteína (RAMA DEVI; NAUSHAD; PRASAD, 2006; WADA et al., 2014).

4.5 Análises das amostras

Não foi possível detectar histidina nas amostras de urina, visto que, os valores comumente encontrados para histidina nesse tipo de amostra se encontra abaixo do LOD do método. Contudo, os limites de quantificação e detecção seriam adequados para a determinação de histidina em amostras de urina de pacientes com histidinemia, que apresentam teores desse aminoácido

na faixa de 0,017 a 4,2 mmol L⁻¹. Os valores de histidina encontrados nas amostras fortificadas de urina estão apresentados na Tabela 8, bem como, os teores de His determinados nas amostras de suplemento que foram de 134,5 ± 5 mg/cápsula para cápsulas com teor de 150 mg e 417,2 ± 0,2 mg/cápsula para cápsulas com teor de 500 mg, estando de acordo com o apresentado no rótulo do fabricante para 95% de confiança.

Tabela 11. Valores de recuperação para as amostras de Urina e Suplemento

Amostra	Adicionado (g L ⁻¹)	Determinado (g L ⁻¹)	Recuperação (%)	
Urina	0,0 ± 0,0	<LOQ		
	3,15 ± 0,1	3,5 ± 1,2	88,4	
	Amostra 1	6,6 ± 0,1	7,0 ± 1,1	105,8
	12,5 ± 0,1	11,2 ± 1,6	111,1	
	0,0 ± 0,0	<LOQ		
	3,0 ± 0,0	2,5 ± 0,1	117,7	
	Amostra 2	6,1 ± 0,01	5,3 ± 0,7	115
	12,5 ± 0,1	10,6 ± 0,9	111,1	
	0,0 ± 0,0	<LOQ		
	3,3 ± 0,4	3,5 ± 1,1	101,7	
	Amostra 3	6,4 ± 0,1	5,2 ± 1,1	80
	12,5 ± 0,3	8,7 ± 2,0	69,2	
Suplemento	Amostra 1	134,5 ± 5,0	Valor declarado (mg/cápsula) 150	
	Amostra 2	417,2 ± 0,2	500	

CAPÍTULO 5

5. Conclusões e perspectivas futuras

O estudo acerca das interações entre QD e aminoácidos de acordo com as características de suas cadeias laterais (apolar, polar neutra e básica), possibilitou o desenvolvimento de um método analítico seletivo, sensível, rápido, fácil e versátil, para a determinação de L-histidina utilizando QD de GSH-CdTe como sonda fotoluminescente em amostras de urina e suplemento.

Os valores de K_a e K_{sv} para interação His-QD, bem como os valores dos parâmetros termodinâmicos ΔH , ΔS e ΔG encontram-se de acordo com valores já reportados na literatura.

Diante das condições otimizadas do método este apresentou boa linearidade, precisão, exatidão e sensibilidade, com LOD e LOQ adequados para o monitoramento de histidina em urina de pacientes portadores de histidinemia, bem como, para o controle de qualidade de suplementos de histidina.

O comportamento da Treonina frente ao QD de 2,8 nm será investigado no mesmo âmbito que a interação His-QD, de modo a obter parâmetros termodinâmicos, bem como as constantes de ligação K_a e *quenching* (K_{sv}), de modo a ratificar a interação His-QD ou avaliar de que modo os aminoácidos interagem diretamente com os QD de GSH-CdTe. A obtenção dessas informações possibilita o desenvolvimento de novos métodos analíticos, que visam o monitoramento dessas espécies em diferentes matrizes.

O presente trabalho constatou a interação His-QD ocorre entre o grupo imidazol pertencente à cadeia lateral da His e o ligante de superfície do QD, glutationa, por meio de força de Van der Waals e ligação de hidrogênio. Essa informação permite que novos métodos analíticos sejam desenvolvidos baseados na interação de QD de GSH-CdTe e compostos imidazólicos, para monitoramento dessas espécies em diferentes tipos de matrizes, como, a determinação de imidazol e benzoimidazol em fármacos baseados nesses compostos que têm sido amplamente utilizados para tratar diversos tipos de doenças devido ao seu amplo espectro de bioatividades (GABA; MOHAN, 2016).

CAPÍTULO 6

6. Referências

ANVISA. RE Nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, v. 2003, n. Dispõe sobre o regulamento de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem, 2003.

ANVISA. Ministério da Saúde - MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Ministério da Saúde**, v. 2012, 2012.

AZUMA, K. et al. Application of pre-column labeling liquid chromatography for canine plasma-free amino acid analysis. **Metabolites**, v. 6, n. 1, 2016.

BILUCA, F. C. et al. Determination of Free Amino Acids in Stingless Bee (Meliponinae) Honey. **Food Analytical Methods**, p. 902–907, 2019.

BLACKBURN, P. R. et al. Maple syrup urine disease: mechanisms and management. p. 57–66, 2017.

BLAU, N.; DURAN, M.; GIBSON, M. K. **Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics**.

BOAZ, H. The Quenching of Fluorescence . Deviations from the Stern-Volmer Law. n. 1, 1950.

BOERO, M. et al. A detailed theory of excitons in quantum dots. v. 379, p. 371–375, 1997.

BRASIL. RDC N. 166, de 25 de Julho de 2017,. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, v. 2017, p. 1–21, 2017.

CALDWELL, K. L. et al. Trace metals in urine of United States residents: reference range concentrations. **Environmental Research**, v. 76, n. 1, p. 53–59, 1998.

CAMPISTOL, J. et al. Key European guidelines for the diagnosis and management of patients with phenylketonuria. v. 8587, n. 16, p. 1–14, 2017.

CASSIANO, N. M. et al. Chromatographic Methods Validation for Analysis of Small Molecules in Biological Matrices. **Quimica Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009.

ÇEVIKKALP, S. A. et al. A simplified HPLC method for determination of tryptophan in some cereals and legumes. **Food chemistry**, v. 193, p. 26–9, 2016.

CHANIOTAKIS, N.; BUICULESCU, R. Semiconductor quantum dots in chemical sensors and biosensors. **Nanosensors for Chemical and Biological Applications: Sensing with Nanotubes, Nanowires and Nanoparticles**, n. Figure 1, p. 267–294, 2014.

CHE, Y. et al. Microwave-assisted fabrication of copper-functionalized carbon quantum dots for sensitive detection of histidine. **Talanta**, v. 196, n. August 2018, p. 442–448, 2019.

CHEN, Y. H.; ZHANG, Y. N.; TIAN, F. S. Determination of selenium via the fluorescence quenching effect of selenium on hemoglobin-catalyzed peroxidative reaction. **Luminescence**, v. 30, n. 3, p. 263–268, 2015.

CUI, L.; HE, X. P.; CHEN, G. R. Recent progress in quantum dot based sensors. **RSC Advances**, v. 5, n. 34, p. 26644–26653, 2015.

DANTAS, M. et al. Interactions of tetracyclines with ovalbumin , the main allergen protein from egg white : Spectroscopic and electrophoretic studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 505–514, 2017.

DE KONING, T. J. Treatment with amino acids in serine deficiency disorders. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 29, n. 2–3, p. 347–351, 2006.

DONEGAN, J.; RAKOVICH, Y. **Cadmium Telluride Quantum Dots: Advances and Applications**. [s.l: s.n.].

DONG, F. et al. A novel method for methimazole determination using CdSe quantum dots as fluorescence probes. p. 195–201, 2009.

EBRAHIM, S. et al. CdTe quantum dots as a novel biosensor for *Serratia marcescens* and Lipopolysaccharide. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 150, p. 212–219, 2015.

ELMIZADEH, H. et al. A sensitive nano-sensor based on synthetic ligand-coated CdTe quantum dots for rapid detection of Cr (III) ions in water and wastewater samples. p. 1581–1590, 2018.

FDA. **Bioanalytical Method Validation Guidance** Cder, 2018.

FINGERHUT, R.; RÖSCHINGER, W.; HECK, M. A Rapid and Sensitive UPLC-MS/MS-Method for the Separation and Quantification of Branched-Chain Amino Acids from Dried Blood Samples of Patients with Maple Syrup Urine Disease (MSUD). **International Journal of Neonatal Screening**, v. 2, n. 2, p. 2, 2016.

FREEMAN, R.; WILLNER, I. Chem Soc Rev Optical molecular sensing with semiconductor quantum dots (QDs). p. 4067–4085, 2012.

FREETO, S. et al. A rapid ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for measuring amino acids associated with maple syrup urine disease, tyrosinaemia and phenylketonuria. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 44, n. 5, p. 474–481, 2007.

FRIGERIO, C.; ABREU, V. L. R. G.; SANTOS, J. L. M. Talanta Evaluation of acetylcysteine promoting effect on CdTe nanocrystals photoluminescence by using a multipumping flow system. **Talanta**, v. 96, p. 55–61, 2012.

GABA, M.; MOHAN, C. **CHEMISTRY Development of drugs based on imidazole and benzimidazole bioactive heterocycles : recent advances and future directions.** [s.l.] Springer US, 2016. v. 25

GUEDES, T. A. et al. Comparando equações de regressão em dados de saúde. p. 1531–1535, 2001.

H. R, C.; SCHIFFMAN, J. D.; BALAKRISHNA, R. G. Quantum dots as fluorescent probes: Synthesis, surface chemistry, energy transfer mechanisms, and applications. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 258, p. 1191–1214, 2018.

HASANZADEH, M. et al. Graphene quantum dots decorated with magnetic nanoparticles: Synthesis, electrodeposition, characterization and application as an electrochemical sensor towards determination of some amino acids at physiological pH. **Materials Science and Engineering C**, v. 68, p. 814–830, 2016.

HELD, P. K.; WHITE, L.; PASQUALI, M. Quantitative urine amino acid analysis using liquid chromatography tandem mass spectrometry and aTRAQ® reagents. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 26, p. 2695–2703, 2011.

HOSSEINI, M. et al. Enhanced chemiluminescence CdSe quantum dots by histidine and tryptophan. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 132, p. 629–633, 2014.

HOSSEINI, M. et al. Selective recognition of Glutamate based on fluorescence enhancement of graphene quantum dot. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 136, p. 1962–1966, 2015a.

HOSSEINI, M. et al. Selective recognition histidine and tryptophan by enhanced chemiluminescence ZnSe quantum dots. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 210, p. 349–354, 2015b.

HOU, J. et al. Sensitive detection of biothiols and histidine based on the recovered fluorescence of the carbon quantum dots-Hg(II) system. **Analytica Chimica Acta**, v. 859, p. 72–78, 2015.

HOU, Y.-X. et al. An Improved Method for the Synthesis of Butein Using SOCl₂/EtOH as Catalyst and Deciphering Its Inhibition Mechanism on Xanthine Oxidase. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1948, 2019.

HUANG, S. et al. Study on the molecular interaction of graphene quantum dots with human serum albumin: Combined spectroscopic and electrochemical approaches. **Journal of Hazardous Materials**, v. 285, p. 18–26, 2015.

KACHOOEI, E. et al. Thermodynamic and conformational changes of protein toward interaction with nanoparticles: a spectroscopic overview. **RSC Advances**, v. 6, n. 107, p. 105903–105919, 2016.

KHAN, S. et al. Determination of histamine in tuna fish by photoluminescence sensing using thioglycolic acid modified CdTe quantum dots and cationic solid phase extraction. **Journal of Luminescence**, v. 182, p. 71–78, 2017.

LAUBE, N.; MOHR, B.; HESSE, A. Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines. **Journal of Crystal Growth**, v. 233, n. 1–2, p. 367–374, 2001.

LEVY, H. **Histidinemia**, 2002.

LIANG, S. S. et al. Ratiometric fluorescence biosensor based on CdTe quantum and carbon dots for double strand DNA detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 244, p. 585–590, 2017.

LIU, H. et al. Sensitive arginine sensing based on inner filter effect of Au nanoparticles on the fluorescence of CdTe quantum dots. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 173, p. 105–113, 2017.

LIU, S. et al. Tyrosine-functionalized CuInS₂ quantum dots as a fluorescence probe for the determination of biothiols, histidine and threonine. **Analyst**, v. 138, n. 19, p. 5819–5825, 2013.

LIU, Y. F.; YU, J. S. In situ synthesis of highly luminescent glutathione-capped CdTe/ZnS quantum dots with biocompatibility. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 351, n. 1, p. 1–9, 2010.

LORENZO, M. P. et al. Optimization and validation of a chiral GC-MS method for the determination of free d-amino acids ratio in human urine: Application to a Gestational Diabetes Mellitus study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 107, p. 480–487, 2015.

LUO, T. et al. Determination of underivatized amino acids to evaluate quality of beer by capillary electrophoresis with online sweeping technique. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 4, p. 789–797, 2017.

MENDONÇA, M. M. DA C. M. P. **Síntese e Caracterização de Quantum Dots de CdTe.**

MISHRA, S. et al. Heavy Metal Contamination: An Alarming Threat to Environment and Human Health. **Environmental Biotechnology: For Sustainable Future**, p. 103–125, 2019.

MORRIS, C. R. et al. Acquired Amino Acid Deficiencies: A Focus on Arginine and Glutamine. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 32, n. 1_suppl, p. 30S-47S, 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª Edição ed.

OMAR, M. M. A.; ELBASHIR, A. A.; SCHMITZ, O. J. Capillary electrophoresis method with UV-detection for analysis of free amino acids concentrations in food. **Food Chemistry**, v. 214, p. 300–307, 2017.

PÉREZ-MÍGUEZ, R.; MARINA, M. L.; CASTRO-PUYANA, M. Capillary electrophoresis determination of non-protein amino acids as quality markers in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1428, p. 97–114, 2016.

PÉREZ-PALACIOS, T. et al. A rapid and accurate extraction procedure for analysing free amino acids in meat samples by GC-MS. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2015, 2015.

RABIN, B. R.; LEBERMAN, R. Metal Complexes of histidine. 1959.

RAMA DEVI, R. A.; NAUSHAD, S. M.; PRASAD, K. C. Evaluation of total plasma homocysteine in Indian newborns using heel-prick samples. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 73, n. 6, p. 503–508, 2006.

RAMÍREZ-HERRERA, D. E. et al. Ratiometric arginine assay based on FRET between CdTe quantum dots and Cresyl violet. **Microchimica Acta**, v. 184, n. 7, p. 1997–2005, 2017.

RAWAT, K. A.; KAILASA, S. K. Visual detection of arginine, histidine and lysine using quercetin-functionalized gold nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 181, n. 15–16, p. 1917–1929, 2014.

RODRIGUES, S. S. M. et al. Application of nanocrystalline CdTe quantum dots in chemical analysis: Implementation of chemo-sensing schemes based on analyte-triggered photoluminescence modulation. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 330, p. 127–143, 2017.

ROGACH, A. L. et al. Synthesis and characterization of thiol-stabilized CdTe nanocrystals. **Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie**, v. 100, n. 11, p. 1772–1778, 1996.

ROGACH, A. L. **Semiconductor Nanocrystal Quantum Dots: Synthesis, Assembly, Spectroscopy and Applications.**

SHARMA, G. et al. Analysis of 26 amino acids in human plasma by HPLC using AQC as derivatizing agent and its application in metabolic laboratory. **Amino Acids**, v. 46, n. 5, p. 1253–1263, 2014.

SHEN, Y. et al. Determination of ellagic acid by fluorescence quenching method with glutathione capped CdTe quantum dots as the probe. **Analytical Methods**, v. 5, n. 13, p. 3228–3234, 2013.

SHEN, Y.; LIU, S.; HE, Y. Fluorescence quenching investigation on the interaction of glutathione-CdTe/CdS quantum dots with sanguinarine and its analytical application. **Luminescence**, v. 29, n. 2, p. 176–182, 2014.

SHENG, Z.; CHEN, L. Switch-on fluorescent strategy based on crystal violet-functionalized CdTe quantum dots for detecting L-cysteine and glutathione in water and urine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 26, p. 6081–6090, 2017.

SHUAI, L. et al. Spectroscopic analysis on the interaction of ferulic acid and tetramethylpyrazine with trypsin. **Luminescence**, v. 29, n. 1, p. 79–86, 2014.

SONG, Y. et al. Recent trends in analytical methods for the determination of amino acids in biological samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 35–49, 2018.

STRASSER, B. et al. Mechanisms of Inflammation-Associated Depression: Immune Influences on Tryptophan and Phenylalanine Metabolisms. **Current topics in behavioral neurosciences**, v. 15, n. November 2011, p. 189–210, 2016.

SU, Y. et al. The cytotoxicity of CdTe quantum dots and the relative contributions from released cadmium ions and nanoparticle properties. **Biomaterials**, v. 31, n. 18, p. 4829–4834, 2010.

SZKUDZIŃSKA, K. et al. Method validation for determination of amino acids in feed by UPLC. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 22, n. 5, p. 247–252, 2017.

TALLAN, H. H.; SCHAFFNER, F.; D, M. Methioninemia and Myopathy : A New Disorder. n. May 1980, p. 423–432, 1981.

VANNUCCHI, H. et al. **AMINOÁCIDOS**. ILSI Brasi ed. São Paulo.

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 & Photobiology, A: Chemistry**, v. 346, p. 502–511, 2017.

VERA-AVILES, M. et al. Protective Role of Histidine Supplementation Against Oxidative Stress Damage in the Management of Anemia of Chronic Kidney Disease. 2018.

WADA, M. et al. Quantitation of sulfur-containing amino acids, homocysteine, methionine and cysteine in dried blood spot from newborn baby by HPLC-fluorescence detection. **Biomedical Chromatography**, v. 28, n. 6, p. 810–814, 2014.

WAJNER, M. et al. Screening for organic acidurias and aminoacidopathies in high-risk Brazilian patients: Eleven-year experience of a reference center. **Genetics and Molecular Biology**, 2019.

WASIM, M. et al. Aminoacidopathies: Prevalence, Etiology, Screening, and Treatment Options. **Biochemical Genetics**, v. 56, n. 1, p. 7–21, 2018.

WU, P.; YAN, X. P. Ni²⁺-modulated homocysteine-capped CdTe quantum dots as a turn-on photoluminescent sensor for detecting histidine in biological fluids. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 2, p. 485–490, 2010.

YANG, J. et al. Novel glutathione-capped cadmium telluride quantum dots-based off-on fluorescence sensor for highly sensitive and selective monitoring of histidine. **Spectroscopy Letters**, v. 48, n. 5, p. 351–358, 2015.

YOKUS, O. et al. Sensors and Actuators B: Chemical Sensitive voltammetric sensor based on polyoxometalate / reduced graphene oxide nanomaterial: Application to the simultaneous determination of l-tyrosine and l-tryptophan. v. 233, p. 47–54, 2016.

YOLA, M. L.; EREN, T.; ATAR, N. A sensitive molecular imprinted electrochemical sensor based on gold nanoparticles decorated graphene oxide: Application to selective determination of tyrosine in milk. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 210, p. 149–157, 2015.

YU, W. et al. Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals. **Chem. Mater.**, v. 15, p. 2854–2860, 2003.

ZARE, H. et al. Highly sensitive selective sensing of nickel ions using repeatable fluorescence quenching-emerging of the CdTe quantum dots. **Materials Research Bulletin**, v. 95, p. 532–538, 2017.

ZHANG, T. et al. Heavy metals in human urine, foods and drinking water from an e-waste dismantling area: Identification of exposure sources and metal-induced health risk. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, n. October 2018, p. 707–713, 2019.

ZHAO, Y. et al. High-temperature luminescence quenching of colloidal quantum dots. **ACS Nano**, v. 6, n. 10, p. 9058–9067, 2012.

ZHENG, X. et al. Cu²⁺ modulated silver nanoclusters as an on-off-on fluorescence probe for the selective detection of l-histidine. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 66, p. 103–108, 2015.

ZHONG, W. et al. Highly sensitive detection of lead(II) ion using multicolor CdTe quantum dots. **Microchimica Acta**, v. 176, n. 1–2, p. 101–107, 2012.

ZHU, X. et al. Nitrogen-doped carbon nanoparticle modulated turn-on fluorescent probes for histidine detection and its imaging in living cells. **Nanoscale**, v. 8, n. 4, p. 2205–2211, 2016a.

ZHU, Y. et al. Simultaneous determination of free amino acids in Pu-erh tea and their changes during fermentation. **Food Chemistry**, v. 194, p. 643–649, 2016b.