



Universidade Federal de Uberlândia
Faculdade de Engenharia Elétrica
Graduação em Engenharia Biomédica

KELLEN DUARTE LANA

**CARACTERIZAÇÕES ESPECTROSCÓPICAS E DE TEMPO DE VIDA
EM SOLUÇÕES FLUORESCENTES INSERIDAS EM SALIVA
ARTIFICIAL EM FUNÇÃO DO pH**

Uberlândia
2021

KELLEN DUARTE LANA

**CARACTERIZAÇÕES ESPECTROSCÓPICAS E DE TEMPO DE VIDA
EM SOLUÇÕES FLUORESCENTES INSERIDAS EM SALIVA
ARTIFICIAL EM FUNÇÃO DO pH**

Trabalho apresentado como requisito parcial de avaliação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Viviane Pilla



Assinatura do Orientador

Uberlândia
2021

Dedico este trabalho a Deus, à minha família, e a todos que de uma forma direta ou indireta foram importantes para minha formação.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão em primeiro lugar à Deus, pois somente ele é digno de toda honra pois sei que só cheguei até aqui porque a sua mão me sustentou.

Jamais poderia deixar de expressar minha gratidão a minha família, que me apoiou e deu força em todos os momentos. Por tudo o que fizeram e fazem por mim, sei que não foi fácil, mas não mediram esforços para que eu pudesse realizar meus estudos e conseguisse concluí-los.

Aos colegas da turma de Engenharia Biomédica e de outras turmas, e cursos que conheci durante a graduação, os quais pude compartilhar algum momento junto e que de alguma maneira me ajudou direta ou indiretamente.

A Camila Rossignatti, pelo incentivo, momentos de descontração e apoio a qual foi muito importante principalmente no início de minha graduação.

A Ariana Moura, por sua amizade, ajuda, companheirismo e momentos de descontração.

A Letícia Batista, por sua amizade e momentos de descontração na UFU e por compartilhar o fone de ouvido sempre para uma boa música.

Aos amigos que conheci em Uberlândia em especial a Malena Rufino, Calila Nascimento, Mariana Bomfim e Kepler os quais me trouxeram palavras de motivação e apoio e que foram importantes em minha caminhada.

A Profa. Dra. Viviane Pilla a qual foi minha orientadora de iniciação científica praticamente durante toda a minha graduação e minha orientadora de trabalho de conclusão de curso, agradeço por todos os ensinamentos.

Agradeço ao laboratório do grupo de Propriedades Ópticas e Térmicas de Materiais (GPOTM) do Infis-UFU pela oportunidade de integração ao grupo e por todos os aprendizados. Agradecimentos em especial ao Sthanley Lima, José Carlos, Tácio Thiers e Nilmar Camilo.

Agradeço a todos os funcionários da Bioengenharia, em especial a todos os técnicos do setor da elétrica. Apreendi muito com vocês, e sou grata por tudo o que fizeram e por todo conhecimento adquirido com vocês e por todos os momentos em que estive como estagiária naquele local.

“Tudo quanto te vier à mão para fazer, faze-o conforme as tuas forças, porque na sepultura para onde tu vais, não há obra, nem indústria, nem ciência, nem sabedoria alguma.”

(Eclesiastes 9:10)

RESUMO

O presente trabalho apresenta as caracterizações espectroscópicas e o tempo de vida de soluções fluorescentes inseridas em salivas artificiais. Os pigmentos de fluoresceína e de corante natural, extraído das folhas de *Tradescantia pallida purpúrea*, foram preparados inseridos em salivas com diferentes valores de potencial de hidrogênio (pH ~3.5-11,9). Medidas espectroscópicas de absorção, fluorescência e fluorescência resolvida no tempo foram realizadas nas amostras investigadas em função do pH. Nas salivas artificiais puras foram determinados os coeficientes termo-ópticos (dn/dT) utilizando um interferômetro em função do pH. A saliva foi escolhida para investigação devido a sua importância em uma variedade de funções corpóreas, como lubrificação, mastigação, deglutição e digestão. Existem muitas vantagens em usar a saliva como um biofluido. Porque sua coleta é rápida, fácil, econômica e não invasiva. Além disso, a saliva, pode refletir o estado fisiológico e patológico do corpo e o pH da saliva é um indicador para algumas doenças. O objetivo do trabalho é avaliar os corantes fluorescentes, fluoresceína e corante natural, como possíveis biossensores dependentes do pH, para diagnóstico de doenças, visto que o pH da saliva humana pode variar em caso de patologias.

Palavras-chave: Saliva Artificial. Potencial Hidrogeniônico. Fluoresceína. Antocianina. Tempo de Vida de Fluorescência. Absorbância. Fluorescência. Coeficiente Termo-Óptico.

ABSTRACT

The present work presents the spectroscopic and lifetime characterizations of fluorescent solutions inserted in artificial saliva. Fluorescein and natural dyes, extracted from the leaves of *Tradescantia pallida purpurea*, were prepared and inserted in artificial saliva at the different potential of hydrogen (pH ~3.5-11,9) values. Spectroscopic measurements of absorption, fluorescence, and time-resolved fluorescence were performed in the investigated samples as a function of pH. In pure artificial saliva, the thermo-optic coefficient (dn/dT) was determined using an interferometer as a function of pH. Saliva was chosen for lubrication, chewing, swallowing, and digestion. There are many advantages to using saliva as a biofluid. Because its collection is quick, easy, inexpensive, and non-invasive. Furthermore, saliva may reflect the physiological and pathological state of the body and the pH of saliva is an indicator for some diseases. This work aims to evaluate fluorescent dyes, fluorescein, and natural dye, as possible pH-dependent biosensors for disease diagnosis, since the pH of human saliva can vary in case of pathologies.

Keywords: Artificial Saliva. The potential of Hydrogen. Fluorescein. Anthocyanin. Fluorescence Lifetime. Absorbance. Fluorescence. Thermo-Optical Coefficient.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Saliva artificial pura no qual o frasco (A), (B), (C), (D), (E), (F) e (G) correspondem aos valores de pH nominal 3, 5, 6, 7, 8, 10 e 12 respectivamente. ...	17
Figura 2. Escala de pH.....	19
Figura 3. Fórmula estrutural do corante fluoresceína (a) e da fluoresceína sódica (b)	20
Figura 4. Síntese de Fluoresceína	20
Figura 5. Estrutura química das antocianinas e algumas fontes naturais das mesmas.....	22
Figura 6. Cubeta óptica com amostra de antocianina em saliva, a esquerda pH 3,05 e a direita pH 11,46.....	22
Figura 7. Tradescantia pallida cv. purpúrea	23
Figura 8. Etapas para a extração da Antocianina.....	24
Figura 9. Atenuação de um feixe de radiação por uma solução absorvente.....	26
Figura 10. Perdas por reflexão e espalhamento.....	27
Figura 11. Representação da absorção de luz por uma amostra em função da distância percorrido por um feixe de luz no interior da amostra.	28
Figura 12. Diagrama de Jablonski.....	30
Figura 13. Esquema do Interferômetro de feixe duplo de braço único.....	31
Figura 14. Seta vermelha informando o local onde é colocado a cubeta no interferômetro de feixe duplo.....	32
Figura 15. Padrão de franjas de interferência para amostra de água destilada.	33
Figura 16. Coeficiente termo-óptico da água destilada.	34
Figura 17. Representação de como o histograma é formado após vários ciclos de captura de fótons.....	35
Figura 18. Configuração do sistema TCSPC.....	36
Figura 19. Diagrama de blocos do sistema TCSPC	38
Figura 20. Perfil de decaimento de ciclo único a partir de eventos de fóton único coletados em muitos ciclos.....	39
Figura 21. Parâmetros e curvas obtidas da análise.	40
Figura 22. Medidas de dn/dT para saliva artificial com diferentes valores de pH.....	43
Figura 23. Medidas de dn/dT em função do pH em temperatura de 24°C.	43
Figura 24. Espectro de absorbância para a saliva artificial pura (pH 3,74) e antocianina concentração de 0,66 g/ml diluída em 4 mL de água destilada.	44
Figura 25. Espectro de fluorescência para a saliva artificial pura (pH 3,74) e antocianina concentração de 0,66 g/mL diluída em 4 mL de água destilada.	45
Figura 26. Espectro de absorção e fluorescência em 300 μ L de antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial (50 mg/mL; pH = 5,81; laser 532 nm e potência 44 mW)	46
Figura 27. Amostra com 300 μ L Antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial (concentração de 50 mg/mL) (A) pH 3,79; (B) pH 5,81; (C) pH 6,14; (D) pH 6,68; (E) 7,15; (F); 7,79; (G) 9,69.....	46
Figura 28. Espectros de absorção 300 μ L de antocianina concentrada diluída em 4 mL de saliva artificial com concentração de 50 mg/mL.....	47
Figura 29. Espectro de absorção para 300 μ L de antocianina concentrada diluída em 4 mL de saliva artificial de pH 5,81 com concentração de 50 mg/mL.....	48
Figura 30. Relação entre os picos em função do pH para 300 μ L antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial (concentração de 50 mg/mL).	49

Figura 31. Espectro de fluorescência para 300 µL antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial (concentração de 50 mg/mL).	49
Figura 32. Espectro de fluorescência normalizada da antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial (concentração de 50 mg/mL).	50
Figura 33. Amostras com 130 µL de fluoresceína diluída em 10 mL de saliva artificial com concentração de $3,9 \times 10^{-3}$ mg/mL. (A) pH 3,57; (B) pH 5,64; (C) pH 6,43; (D) pH 7,94; (E) 8,30; (F) 8,96; (G) 11,88.	50
Figura 34. Espectro de absorção para 130 µL de fluoresceína inserida em 10 mL de saliva artificial (concentração $3,9 \times 10^{-3}$ mg/mL).	51
Figura 35. Espectro de fluorescência para 130 µL de fluoresceína inserida em 10 mL de saliva artificial (concentração $3,9 \times 10^{-3}$ mg/mL).	52
Figura 36. Fluorescência resolvida no tempo para a saliva artificial pura	53
Figura 37. Fluorescência resolvida no tempo para 300 µL antocianina em 4 mL de saliva artificial em função do pH (concentração 50 mg/mL).	54
Figura 38. Fluorescência resolvida no tempo para 130 µL de fluoresceína inserida em 10 mL de saliva artificial (concentração $3,9 \times 10^{-3}$ mg/mL).	55
Figura 39. Medida de absorção para a antocianina diluída em água destilada para as três concentrações.	65
Figura 40. Fluorescência da antocianina diluída em água destilada para as três concentrações.	66
Figura 41. Amostra com 150 µL de antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial com concentração de 25 mg/mL.	67
Figura 42. Amostra de 300 µL de antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial com concentração de 50 mg/mL.	68
Figura 43. Amostra de 600 µL de antocianina diluída em 6 mL de saliva artificial com concentração de 83 mg/mL.	69
Figura 44. Absorbância para a amostra de 150 µL de antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial com concentração de 25 mg/mL.	70
Figura 45. Fluorescência para a amostra de 150 µL de antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial com concentração de 25 mg/mL.	71
Figura 46. Fluorescência normalizada para a amostra de 150 µL de antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial com concentração de 25 mg/mL.	71
Figura 47. Área da fluorescência normalizada (u.a.) em função do pH para 150 µL antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial em diferentes pHs com concentração de 25 mg/mL.	72
Figura 48. Absorbância da amostra de 600 µL de Antocianina diluída em 6 mL de saliva artificial com concentração de 83 mg/mL.	73
Figura 49. Fluorescência para a amostra de 600 µL de antocianina diluída em 6 mL de saliva artificial com concentração de 83 mg/mL.	74
Figura 50. Fluorescência normalizada para a amostra de 600 µL de antocianina diluída em 6 mL de saliva artificial com concentração de 83 mg/mL.	74
Figura 51. Área da fluorescência normalizada (u.a.) em função do pH para 600 µL antocianina diluída em 6 mL de saliva artificial.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da saliva artificial.....	18
Tabela 2. Potencial hidrogeniônico das salivas artificiais	41
Tabela 3. Medidas de pH para a água destilada e para a 300 µL antocianina diluída em 4 mL de água destilada.....	42
Tabela 4. Valor de dn/dT para água destilada e valor encontrado na literatura.	42
Tabela 5. Valor de dn/dT para saliva artificial pura.....	44
Tabela 6. Concentração e propriedades ópticas de 300 µL antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial em diferentes pHs (concentração 50 mg/mL, $\lambda = 532 \text{ nm}$).....	48
Tabela 7. Valores de pH, pico de absorção e $\langle \lambda_{em} \rangle$ para fluoresceína inseridas em salivas (concentração de $3,9 \times 10^{-3} \text{ mg/mL}$).	52
Tabela 8. Tabela com os respectivos parâmetros de ajustes para a saliva artificial..	53
Tabela 9. Tabela com os respectivos parâmetros de ajustes para 300 µL antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial em diferentes pHs (concentração 50 mg/mL).....	54
Tabela 10. Tabela com os respectivos parâmetros de ajustes 130 µL de fluoresceína inserida em 10 mL de saliva artificial (concentração $3,9 \times 10^{-3} \text{ mg/mL}$).....	55
Tabela 11. Valor do pH da saliva artificial pura para medidas de dn/dT.	64
Tabela 12. Medida de pH para as salivas artificiais que foram usadas nas amostras de fluoresceína.....	64
Tabela 13. Medida de pH para as salivas artificiais usadas com o corante natural (antocianina).....	64
Tabela 14. Medida de pH para as diferentes amostras de Antocianina diluída em água destilada. Em que M1 é amostra de 150 µL (concentração de 25 mg/mL); M2 é a amostra de 300 µL (concentração de 50 mg/mL) e M3 referente a amostra de 600 µL (concentração de 83 mg/mL).	65
Tabela 15. Medida de pH para a amostra de 150 µL de antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial com concentração de 25 mg/mL.	67
Tabela 16. Medida de pH para amostra de 300 µL de antocianina diluída em 4mL de saliva artificial com concentração de 50 mg/mL.....	68
Tabela 17. Medidas de pH para 600 µL de antocianina diluída em 6 mL de saliva artificial com concentração de 83 mg/mL.	69
Tabela 18. Concentração e propriedades ópticas de 150 µL antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial em diferentes pHs com concentração de 25 mg/mL.	70
Tabela 19. Comprimento de onda de emissão média de 150 µL antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial em diferentes pHs com concentração de 25 mg/mL.	72
Tabela 20. Concentração e propriedades ópticas das soluções de 600 µL antocianina diluída em 6 mL de saliva artificial.	73
Tabela 21. Comprimento de onda de emissão média de 600 µL antocianina diluída em 6 mL de saliva artificial em diferentes pHs com concentração de 83 mg/mL.	75

LISTA DE ABREVIACÕES

FH ⁻	Derivado de fluoresceína na forma monoaniônica
FH ²⁻	Derivado de fluoresceína na forma dianiônica
FH ₂	Derivado de fluoresceína na forma neutra
FH ₃ ⁺	Derivado de fluoresceína na forma catiônica
H ⁻	íons de hidróxidos
H ⁺	íons de hidrogênio
H ₂ O	Fórmula molecular da água
ADC	Conversor analógico-digital
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>
CFD	Discriminador de fração constante
CMC	Carboximetilcelulose
DAQ	Módulo de aquisição de dados
DF1 e DF2	Divisor de feixe
DN	Detector de normalização
FDMZ	Fotodetector Mach-Zehnder
GPOTM	Grupo de propriedades ópticas e térmicas de materiais
IRF	Função de resposta do instrumento
ISFET	<i>Ion sensitive field effect transistor</i>
LED	Diodos emissores de Luz
MCS	Escala multicanal
MHz	Mega Hertz
PCIe	<i>Peripheral Component Interconnect Express</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMT	Tubo fotomultiplicador
POC	Ponto de atendimento
SCMC	Carboximetilcelulose de sódio
SPAD	Diodo de avalanche de fóton único
TAC	Conversor tempo-amplitude
TCSPC	Contagem de fóton único com correlação de tempo
TDC	Conversor de tempo para digital
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

LISTA DE SÍMBOLOS

ΔT_{MZ}	Diferença de temperatura entre os máximos e mínimos de temperatura
L_0	Espessura da cubeta na temperatura inicial
L	Espessura da cubeta
L_{eff}	Espessura efetiva da amostra
$\langle \lambda_{em} \rangle$	Comprimento de onda médio de emissão
T	Transmitância
Abs	Absorbância
α	Coefficiente de absorção da amostra
ε	Absortividade molar
I_0	Intensidade do feixe incidente
I	Intensidade do feixe transmitido
S_0	Estado fundamental singleto
S_n	Ordem dos estados excitados
dn/dT	Coefficiente termo-óptico
t	Tempo de vida da fluorescência

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1 CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS	16
1.1 Saliva natural e artificial	16
1.2 Potencial Hidrogênionico.....	18
2 AMOSTRAS UTILIZADAS	20
2.1 Fluoresceína	20
2.2 Antocianina	21
3 TÉCNICAS EXPERIMENTAIS	25
3.1 Absorção	25
3.1.1 Coeficiente de Absorção Óptica	28
3.2 Fluorescência.....	29
3.3 Interferômetro.....	30
3.4 Fluorescência resolvida no tempo.....	34
3.4.1 Técnica contagem de fóton único resolvida no tempo (TCSPC)	36
3.4.2 Aquisição de dados para a medida experimental	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Análises dos resultados obtidos das amostras estudadas neste trabalho. ..	41
5 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICE A – Medidas de pH para a saliva artificial	64
APÊNDICE B – Antocianina diluída em água.....	65
APÊNDICE C – Medida de pH para as amostras de antocianina diluída em saliva artificial em diferentes concentrações de antocianina.	67
APÊNDICE D – Espectros de absorção e fluorescência para as amostras de diferentes concentrações de antocianina.	70

INTRODUÇÃO

Um método mais comumente utilizado nos laboratórios para diagnóstico clínico, é por meio da análise do sangue [1]. O problema de tal método é que ele é invasivo e muito das vezes causa incomodo e dor ao paciente [2]. Sabendo disso e com o avanço das tecnologias, novos meios para análise do estado de saúde de um indivíduo vêm sendo desenvolvidas. Sendo assim, o fluido salivar tem sido uma alternativa para uma análise menos invasiva e de fácil coleta [1,3]. Pois, na saliva existem em menor concentração alguns constituintes que também estão presentes no sangue como: ácido desoxirribonucleico, ácido ribonucleico, proteínas, hormônios, metabólitos, anticorpos entre outros [1]. Por outro lado, como a concentração dos marcadores biológicos é mais baixa em relação a que está presente no plasma, e devido a viscosidade, e durante armazenamento e transporte podem ocorrer riscos de contaminação bacteriana além de outras interferências contidas na saliva, faz com que haja uma maior limitação na coleção da amostra de saliva e na utilização dela como meio de diagnóstico [3–5].

Segundo LIMA et al. (2014) “os recentes avanços científicos e tecnológicos estão produzindo melhoras continuadas em aspectos como a determinação dos componentes salivares [...]”. Além disso, com o maior conhecimento a respeito das características de nanopartículas e corantes tem surgido biossensores, sensores colorimétricos e eletroquímicos capazes de superar tais limitações com capacidade de análise no local [2,4,6]. Por outro lado, recentemente muitos trabalhos estão dando maior atenção aos corantes naturais e suas aplicações [7], por exemplo em aplicações com marcadores ópticos em diagnósticos médicos de várias doenças [8], biomonitoramento ambiental [9], na área alimentar, cosmética e industrial [7].

Neste trabalho foram realizadas caracterizações espectroscópicas e fotofísicas de corantes fluorescentes (fluoresceína e antocianina) suspenso em saliva artificial em diferentes valores de potencial de hidrogênio (pH). A saliva foi usada como um fluido de estudo com a finalidade de simular um meio biológico e analisar qual o melhor sensor, ou seja, aquele com maior sensibilidade de detecção de variação do pH salivar. Os resultados obtidos serão comparados com resultados da literatura usando nanopartículas de CdSe/ZnS embebidas em biofluidos em função do pH [10]. O estudo dependente do pH se justifica, devido ao fato de que, em uma pessoa saudável

o valor do pH salivar varia entre 6 e 7, conforme o fluxo salivar, podendo haver pequenas alterações para baixo ou para cima, independentemente da idade. Enquanto que, em indivíduos que apresentam alguma patologia o valor de pH poderá sofrer variações, como por exemplo, pacientes com câncer apresentam menores níveis de pH salivar assim como em casos de pacientes com refluxo gastroesofágico entre outros [11,12].

Assim, o objetivo desse trabalho é fazer uma caracterização espectroscópica (absorção e fluorescência) e termo-óptica (determinação do parâmetro de dn/dT) em função da variação do pH da saliva, e avaliar dois corantes fluorescentes (antocianina e fluoresceína), como uma potencial solução fluorescente dependente do pH, para possível aplicação como biossensor para diagnósticos de doenças, levando em consideração que o pH da saliva humana pode variar em casos de patologia [11].

CAPÍTULO 1

1 CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

Neste capítulo são apresentados os conceitos importantes para o entendimento da saliva (natural e artificial) e sobre potencial hidrogeniônico.

1.1 Saliva natural e artificial

A saliva é um importante fluido corporal sintetizado e secretado pelas glândulas salivares. Essas glândulas são divididas em maiores (parótidas, submandibular e sublingual) e menores (labial, bucal, lingual e palatina) e são inervadas pelo sistema autônomo [13]. Ela exerce um importante papel de lubrificação e umedecimento, ingestão do bolo alimentar, homeostase e de proteção microbiana. A sua composição consiste basicamente em água (99,5%), e o restante de sais inorgânicos e enzimas (0,2%) e proteínas (0,3%) [13].

Além disso, são encontrados em menor concentração alguns constituintes que estão presentes no sangue como: ácido desoxirribonucleico, ácido ribonucleico, proteínas, hormônios, metabólitos, anticorpos entre outros. Isso ocorre devido aos processos de difusão passiva e dos transportes recorrentes da ultrafiltração das membranas, proporcionando que ocorra o transporte de substâncias presentes no sangue para a saliva [1]. A presença desses componentes denominados biomarcadores são fontes de informação sobre a condição do estado de saúde pois eles se alteram caso o indivíduo apresente alguma doença, da mesma forma isso ocorre em relação ao pH salivar [1].

Devido ao fato da coleta da saliva ser de fácil acesso e não invasiva, muitos pesquisadores tem utilizado o fluido salivar para obter importantes informações do estado fisiológico e patológico que o corpo se encontra [12]. Sendo assim, a saliva tem se mostrado como uma ótima opção para diagnóstico e monitoramento em muitos campos da ciência como a medicina, odontologia e farmacoterapia [14].

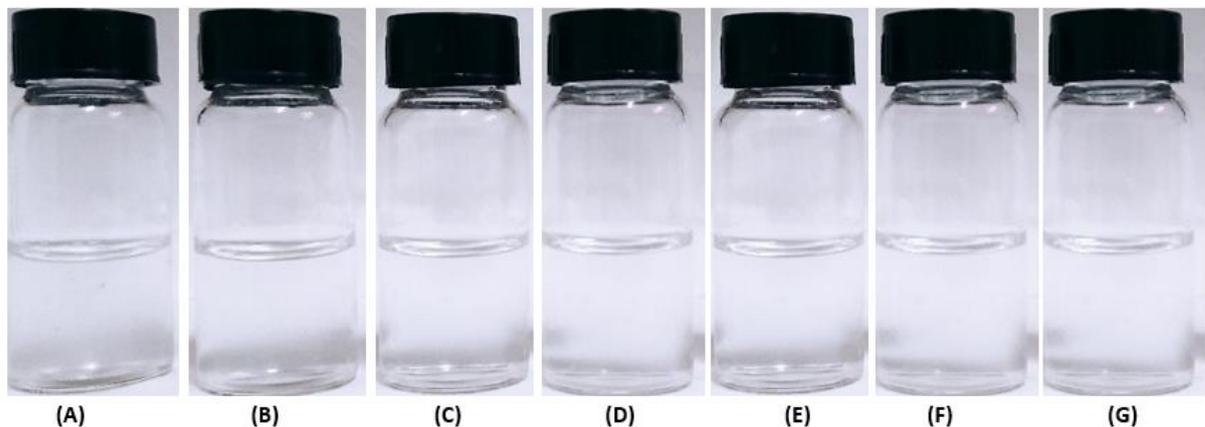
Um pH considerado normal para saliva varia entre 6,0 - 7,0, mas poderá haver redução do pH salivar em pacientes com doenças, como por exemplo pacientes com refluxo gastroesofágico, estomatite protética entre outros [12]. Em casos de disfunção das glândulas salivares, como xerostomia e a hipossalivação é feito o uso de saliva

artificial. A saliva artificial garante a lubrificação dos tecidos orais, alivia a sensação de boca seca e protege os tecidos dentais das cáries [15].

Existem várias abordagens sobre como pode ser obtida essa saliva artificial, além de algumas delas tentarem imitar a saliva natural. Na formulação da saliva artificial que é encontrada disponível no mercado é composta por carboximetilcelulose (CMC), carboximetilcelulose de sódio (SCMC) e hidroxietilcelulose como agentes espessantes e lubrificantes [15].

A saliva artificial adquirida para esse trabalho possui como característica uma consistência líquida e viscosa, a ideia de utilizar essas salivas artificiais é que por meio delas possa ser feito simulações de um fluido biológico. Na Figura 1 estão representados os frascos com as salivas artificiais puras com diferentes valores de pH (3-12).

Figura 1. Saliva artificial pura no qual o frasco (A), (B), (C), (D), (E), (F) e (G) correspondem aos valores de pH nominal 3, 5, 6, 7, 8, 10 e 12 respectivamente.



Fonte: Autor.

As salivas artificiais utilizadas nesse trabalho foram obtidas comercialmente em farmácia de manipulação e cada uma com um valor diferente de pH, os valores nominais de cada uma delas são: pH 3, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, pH 10 e pH 12. E por meio da Tabela 1 pode ser visualizada a sua composição.

Tabela 1. Composição da saliva artificial

SALIVA ARTIFICIAL	
CMC	1%
Sorbitol	3%
Cloreto de Magnésio	0,005%
Nipagim	0,1%
Cloreto de Potássio	0,12%
Cloreto de Sódio	0,08%
Água destilada	500mL

Fonte: Autor.

1.2 Potencial Hidrogênionico

O termo pH significa potencial hidrogeniônico, e ele é usado universalmente para indicar o grau de acidez, neutralidade ou alcalinidade em uma solução aquosa. Por meio da medição do pH pode-se definir as características químicas de um material. A água pode sofrer ionização e produzir íons H^+ e OH^- . Assim, para uma solução aquosa podemos escrever [16].



Logo, em uma solução aquosa sempre haverá íons H^+ e OH^- que serão utilizados para caracterizar uma solução em ácida e ou em básica. O valor de pH é dado por [16]

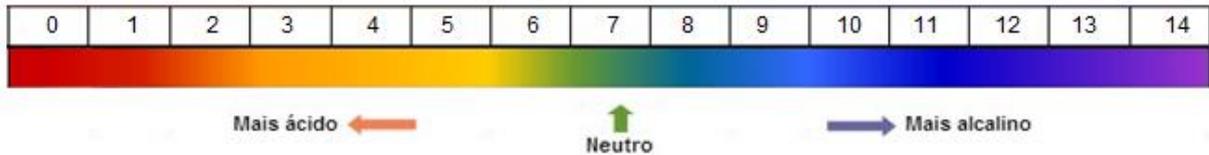
$$pH = -\log \alpha H^+ \quad (2)$$

Sendo que, ácidos em solução aquosa produzem íons hidrogênio, enquanto que as bases produzem íons hidroxila em solução. Deste modo, a força de um ácido ou base poderá ser definida conforme a sua magnitude de dissociação [17].

Para critérios de análise, existe uma escala de pH conforme Figura 2 que varia entre 0 a 14. Uma amostra é considerada com pH neutro se possuir valor de pH 7, e

soluções com pH inferior a 7 são consideradas ácidas enquanto que as soluções com pH superior a 7 são consideradas alcalinas [16].

Figura 2. Escala de pH



Fonte: Autor.

Existem diversos métodos e materiais que fazem a detecção do valor de pH, como por exemplo: papel de tornassol, papel de pH, sensor de pH baseado em ISFET, sensor de imagem de pH, sensor de fibra óptica de pH, sensor de pH fluorimétrico, sensor de pH radiométrico, conjunto de sensores de pH de faixa completa de câmera CCD, sensor de pH sem fio, sensor magnetoelástico de pH, sensor condutimétrico de pH, sensor cantilever de pH, eletrodo de vidro e sensores de pH potenciométricos [16].

Entretanto, as técnicas ópticas, como absorção, fluorescência e tempo de vida, também são estudadas e utilizadas para esse fim. Portanto, neste trabalho foi estudado dois tipos de corantes que sofrem alterações em sua estrutura química dependendo do pH da solução em que são diluídos. Desse modo, tais técnicas ópticas apresentadas podem ser usadas para avaliar o funcionamento desses corantes como sensores de pH, colorimétricos ou fluorimétricos, em diferentes amostras.

CAPÍTULO 2

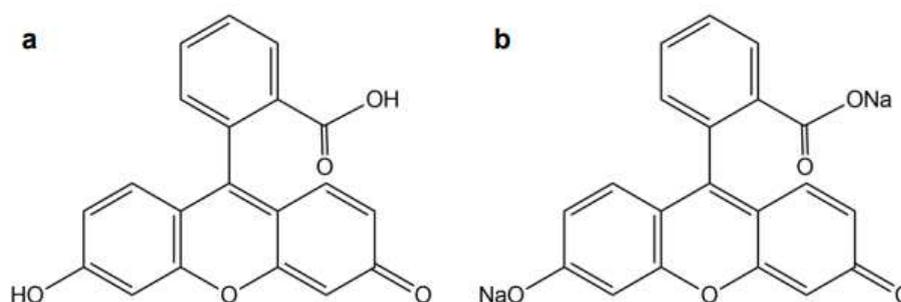
2 AMOSTRAS UTILIZADAS

Neste capítulo serão abordados os processos de sínteses e extrações das soluções fluorescentes caracterizadas neste trabalho: (a) Fluoresceína; e (b) corante natural extraídos de plantas (antocianinas).

2.1 Fluoresceína

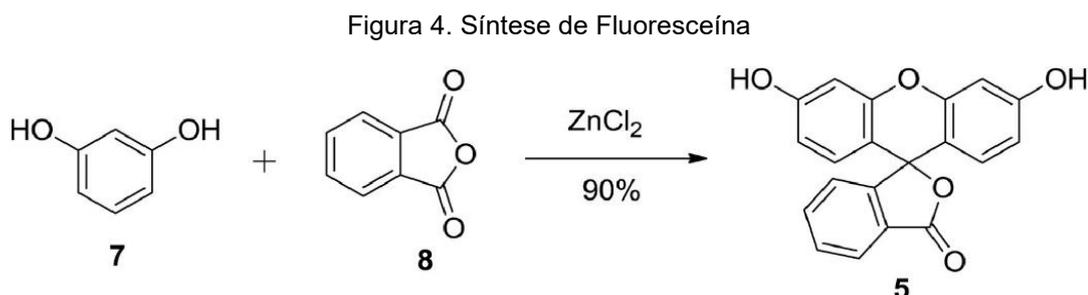
A fluoresceína é um corante orgânico da classe dos corantes xantenos [18], e Paul Ehrlich a utilizou pela primeira vez em 1882. Na Figura 3 está representada a sua fórmula estrutural [19,20].

Figura 3. Fórmula estrutural do corante fluoresceína (a) e da fluoresceína sódica (b)



Fonte: GUELLIS (2019). [21]

O primeiro a sintetizar a fluoresceína foi o químico alemão Johann Friedrich Adolf von Bayer [20]. E a síntese da fluoresceína visualizada na Figura 4 é realizada através da reação de Friedel Craft de resorcinol e anidrido ftálico, usando cloreto de zinco como catalisador o qual atua como um agente desidratante [22].



Fonte: RAJASEKAR (2021). [22]

A fórmula química da fluoresceína sódica é $C_{20}H_{10}O_5Na_2$ com peso molecular de 376,3. Ela é solúvel em água e álcool e pode ser encontrada comercialmente como um pó fino vermelho-alaranjado [19]. A fluoresceína emite luz verde-amarelado quando exposto a luz de comprimento de onda de 465–490 nm (azul), e apresenta tempo de vida em cerca de 4 ns [19,23].

Devido as suas ótimas propriedades espectroscópicas a fluoresceína ganha destaque dentre os demais corantes orgânicos, devido ao fato de apresentar alto rendimento quântico de fluorescência e coeficientes de extinção, ampla absorção e fluorescência na região do visível, fácil operação e boa biocompatibilidade [24]. Outra característica da fluoresceína é que seus espectros de absorção e fluorescência são dependentes do pH [22].

Além disso, a fluoresceína e seus derivados podem ser encontrados em outras espécies conforme o valor do pH da solução aquosa, havendo uma variação de tais espécies que progridem da forma catiônica protonada (*solução ácida, FH_3^+*) para neutra (FH_2) seguindo para aniônicas (FH^-) e dianiônicas (FH^{2-}) quando em soluções alcalinas [25]. Observa-se que os derivados simples de fluoresceína possuem baixa fluorescência na região de pH ácido e alta fluorescência em região básica e ou neutra [26].

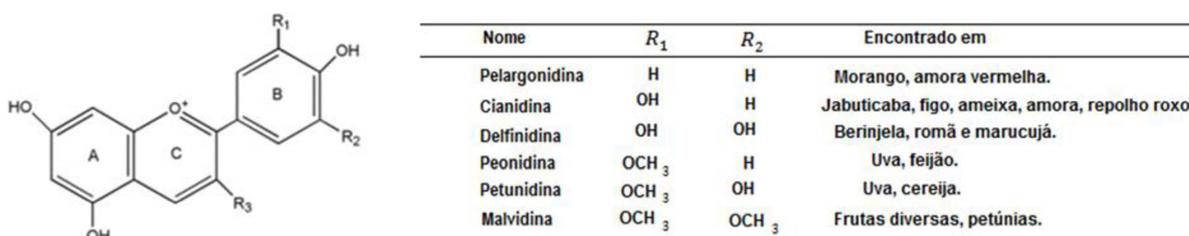
Portanto, como a fluoresceína apresenta características importantes este composto tem sido usado em uma ampla gama de aplicações, como marcação de anticorpos para imunoenaios [23], sondas fluorescentes [24], para detecção de tumor no cólon, estômago, mama e cérebro e em ensaios clínicos baseados em cirurgias guiadas por fluoresceína [27] e na avaliação da taxa de cura de lesões epiteliais da córnea [28]. A amostra pura de fluoresceína para este trabalho foi preparada usando 3,0 mg de fluoresceína sódica em 10 mL de etanol, e foram inseridos 130 μ L de fluoresceína em 10 mL de saliva artificial em diferentes valores de pH. Em seguida utilizou o agitador magnético Fisatom (modelo 752) por 20 min para homogeneizar as amostras.

2.2 Antocianina

As antocianidinas são flavonoides catiônicos com estrutura composta por dois anéis aromáticos ligados a três carbonos em um heterociclo oxigenado, conforme a Figura 5 [29]. Apenas seis tipos de antocianidinas são derivadas de plantas sendo

elas a cianidina, pelargonidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina. Devido ao fato das antocianidinas serem particularmente instáveis, elas são encontradas sob a forma de antocianinas [30].

Figura 5. Estrutura química das antocianinas e algumas fontes naturais das mesmas.



Fonte: Adaptado de LI et al. (2020). [30]

Portanto as antocianinas são derivadas das antocianidinas [31]. Essas antocianinas (das palavras gregas anthos, flor e kianos, azul), é um pigmento vegetal solúvel em água integrante do grupo dos compostos fenólicos chamados flavonóides [31,32]. Que apresentam em sua estrutura 15 átomos de carbono na forma C6- C3- C6 e absorvem fortemente na região visível do espectro [32,33].

Nas plantas as antocianinas apresentam diversas funções, dentre elas, é a atração dos agentes polinizadores e dispersores de sementes e a proteção dos vários tecidos da planta durante as fases de seu ciclo de vida [33]. Elas também são responsáveis por dar coloração a diversos tipos de plantas e seus extratos variam conforme a acidez ou alcalinidade do meio [31,33]. Sendo assim, em condições ácidas a antocianina apresenta coloração vermelha enquanto que em condições alcalina ela irá apresentar coloração azul e/ou amarela conforme apresentada na Figura 6 [31].

Figura 6. Cubeta óptica com amostra de antocianina em saliva, a esquerda pH 3,05 e a direita pH 11,46.



Fonte: Autor.

Ela também apresenta atividade antioxidante que previne doenças neuronais, doenças cardiovasculares, câncer e inflamação [32]. Demonstrando ter capacidade de proteger o cérebro contra doenças neurodegenerativas [30], e também efeitos biológicos que beneficiam pacientes com doenças crônicas relacionadas à síndrome metabólica [29]. Além disso, ela também possui aplicações como corante natural, conservante natural e como compostos bioativos na área de saúde [32,34].

Neste trabalho utilizou-se a planta *Tradescantia pallida* cv. *purpúrea* apresentada na Figura 6, que pertencente à família *Commelinaceae* [9]. Ela é uma planta de fácil cultivo e que apresenta boa adaptabilidade em diferentes condições climáticas e ambientais alcançando tamanho de 25 centímetros de altura. Suas folhas apresentam coloração roxa devido possuir em sua epiderme grande quantidade de antocianina e suas flores são de coloração rósea. Tendo em vista a suas características faz com que essa planta seja muito utilizada para ornamentação e paisagismo, e além disso ela é utilizada para biomonitoramento das alterações da qualidade do ar causados por poluentes atmosféricos [35].

Figura 7. *Tradescantia pallida* cv. *purpúrea*



Fonte: Autor.

A extração do pigmento natural da planta *Tradescantia pallida* cv *purpúrea* foi realizado pelo grupo de pesquisa GPOTM (Grupo de Propriedades Ópticas e Térmicas de Materiais) conforme as etapas descritas na Figura 8. Para obter a antocianina concentrada, foram coletadas as folhas da planta *Tradescantia pallida* cv *purpúrea* na Universidade Federal de Uberlândia (UFU), e lavados sequencialmente com água corrente e água destilada. Em seguida, as folhas foram secas em papel

absorvente e cortadas em pequenas tiras. Após feito isso, elas foram desidratadas em um desidratador de Alimentos *Fun Kitchen* modelo FD-880^a, e sua massa foi determinada por uma balança analítica Shimadzu (modelo AUW220D). Assim, obteve 8 gramas de folhas da planta e em seguida foram macerados manualmente em temperatura ambiente, usando um almofariz e pilão, por aproximadamente vinte minutos com 12 mL de água destilada. A mistura homogênea passou por um filtro de metal e depois por um filtro de papel para obter a solução do corante natural. Depois disso, a solução de corante foi centrifugada por 20 min a 7200 rpm (BioPet Modelo 8011154). Então, as amostras de antocianina concentrada foram armazenadas e refrigeradas.

Figura 8. Etapas para a extração da Antocianina



Fonte: Autor.

A extração da antocianina foi realizada na concentração de 0,66 g/mL. Após a extração, foram realizadas medidas de absorção e fluorescência em cubeta óptica de 1 cm, para 150 μ L de antocianina diluída em 4 mL de água destilada apresentando uma concentração de 25 mg/mL, e 300 μ L de antocianina diluída em 4 mL de água destilada apresentando uma concentração de 50 mg/mL. Também foi realizada uma outra extração de antocianina na concentração de 0,833 g/mL, e utilizados 600 μ L de antocianina diluída em 6 mL de água destilada com concentração de 0,0833 g/mL. E dentre essas, a amostra escolhida para este trabalho foi a de 300 μ L de antocianina diluída em 4 mL de água destilada apresentando uma concentração de 50 mg/mL.

CAPÍTULO 3

3 TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

Neste capítulo são apresentadas as técnicas experimentais utilizadas para análise das amostras, os equipamentos e os parâmetros utilizados.

3.1 Absorção

A radiação eletromagnética pode ser considerada como um conjunto de ondas, caracterizado por determinadas propriedades como comprimento de onda, frequência, velocidade e amplitude que são transmitidas através do espaço ou ar com uma alta velocidade. Um exemplo de radiação eletromagnética é a luz, a qual é constituída por partículas de energia denominadas fótons [36].

Inicialmente, um analito que se deseja analisar estará em seu estado fundamental e só após receber um estímulo pela aplicação de uma fonte de radiação eletromagnética externa é que ele sofrerá uma transição para um estado de energia excitado (estado energético superior) [36]. De qualquer forma, para que esse processo de absorção de luz venha ocorrer é necessário que a energia contida no fóton seja incorporada na estrutura das moléculas absorventes. Esse processo só ocorrerá quando a energia da radiação eletromagnética incidente for igual ou próxima a energia de transição entre os dois orbitais [37]. Posteriormente, certas frequências são seletivamente absorvidas fazendo com que por meio desse processo seja possível obter informações a respeito do analito. Denomina-se de espectroscopia de absorção, a medida da quantidade de luz que foi absorvida em função do comprimento de onda [36].

A lei de absorção, conhecida como lei de Beer-Lambert, relaciona quantitativamente o grau de atenuação de uma fonte de radiação eletromagnética incidente, com a concentração das moléculas absorventes presentes e o tamanho do caminho sobre o qual acontece a absorção. Quanto maior for o comprimento do caminho óptico por onde a luz passa (ou maior concentração de moléculas absorventes), haverá mais centros absorventes presentes no caminho, e conseqüentemente maior atenuação do feixe de radiação [36].

A Figura 9 apresenta uma ilustração da atenuação de um feixe de luz monocromática (de intensidade I_0), ao passar por uma solução absorvente, em um cubeta de espessura L (com concentração igual a c mols/litro).

Figura 9. Atenuação de um feixe de radiação por uma solução absorvente.



Fonte: Autor.

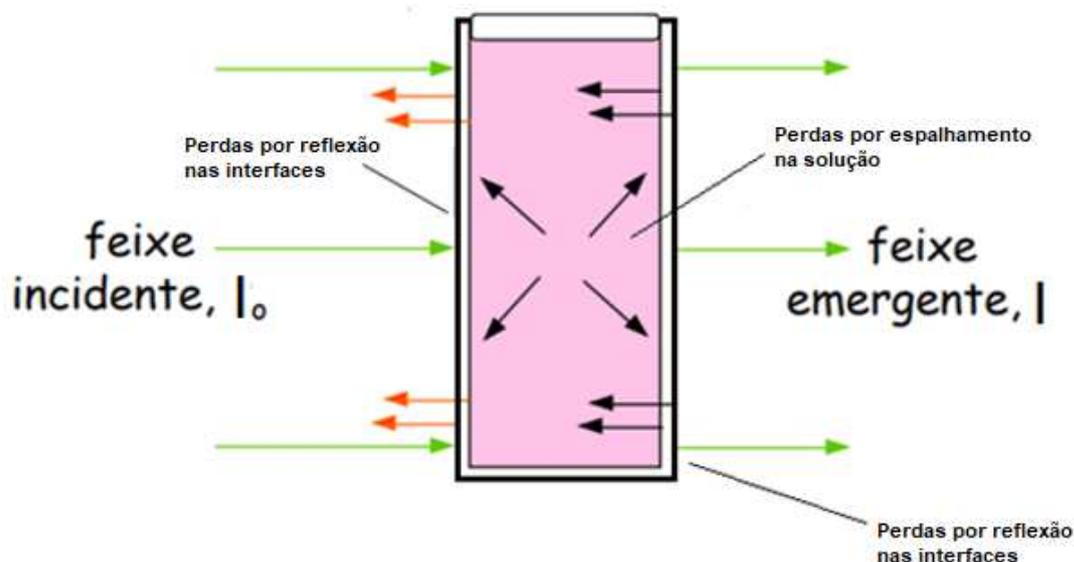
Devido a interação entre os fótons e as moléculas absorventes, a intensidade do feixe decresce de I_0 para I . A essa atenuação sofrida pelo feixe de radiação incidente chamamos de transmitância e a absorbância (Abs) se relaciona com a transmitância na forma logarítmica sendo dada por [36]

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (3)$$

$$Abs = -\log T = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (4)$$

Assim, para realizar a medida de absorção em líquidos, é necessário a utilização um recipiente transparente (denominado cubeta óptica). Mas, o problema de se utilizar esse tipo de recipiente é que há perdas por reflexão ou espalhamento através de suas paredes. Ou seja, ocorre espalhamento da luz por todas as direções por meio das partículas presentes no solvente, causando uma atenuação adicional do feixe quando este atravessar a solução, conforme mostrado na Figura 10 [36].

Figura 10. Perdas por reflexão e espalhamento.



Fonte: Adaptado de DENADAI (2014). [38]

Esses efeitos podem ser compensados fazendo a comparação entre a potência do feixe transmitida em uma cubeta com amostra com a potência que atravessou essa mesma cubeta apenas com solvente ou branco dos reagentes. Encontra-se a absorvância experimental que se aproxima muito da absorvância verdadeira da solução fazendo [36]

$$A = \log \frac{I_0}{I} \approx \log \frac{I_{\text{solvente}}}{I_{\text{solução}}}. \quad (5)$$

Conforme a lei de Beer a absorvância é diretamente proporcional à concentração de uma espécie absorvente c (g/L^{-1}) e ao caminho óptico L (cm) do meio absorvente, conforme a expressão [36]

$$A = \log(I_0/I) = aLc, \quad (6)$$

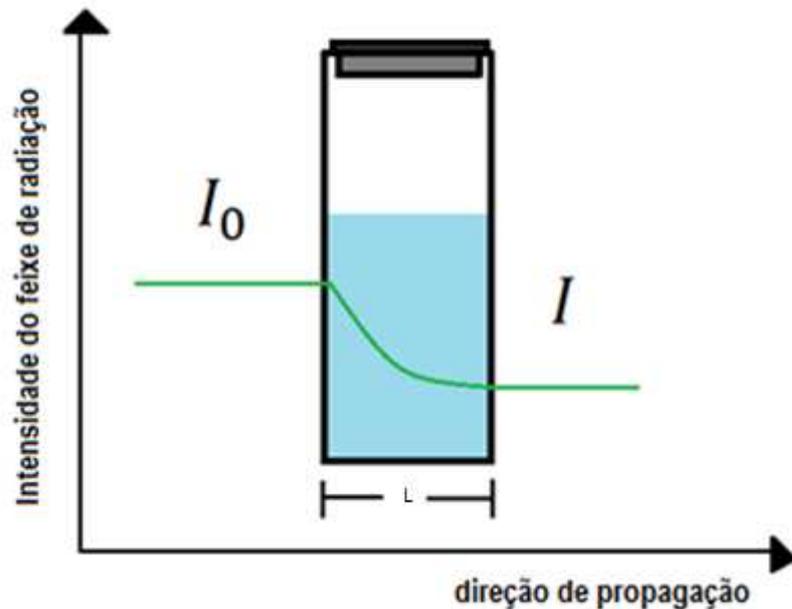
Onde a é a constante de proporcionalidade denominada absorvância. Se a concentração for expressa em mols/litro e L em centímetros, a constante de proporcionalidade é chamada absorvância molar (ϵ). Assim, a equação pode ser reescrita na forma [36]

$$A = \epsilon Lc \quad (7)$$

3.1.1 Coeficiente de Absorção Óptica

A lei Lambert-Beer estabelece relações entre a intensidade de luz incidente e transmitida, com a espessura do caminho óptico percorrido. Quando um feixe de luz com intensidade I atravessa um meio absorvedor ocorre um decréscimo exponencial conforme a espessura do meio absorvedor aumenta (Figura 11), sendo I a intensidade do feixe emergente e I_0 a intensidade do feixe incidente [39].

Figura 11. Representação da absorção de luz por uma amostra em função da distância percorrido por um feixe de luz no interior da amostra.



Fonte: Adaptado de GALO; COLOMBO (2009). [40]

A absorvância (A) nos informa o quanto de luz foi absorvido por uma amostra em uma faixa de comprimento de onda. Sendo assim, o cálculo do decréscimo exponencial e da absorvância é obtido na forma [39,41]:

$$I = I_0 x e^{-\alpha L}. \quad (8)$$

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right). \quad (9)$$

Sendo $\alpha(\lambda)$ o coeficiente de absorção óptica, e sua unidade é cm^{-1} e L é a espessura da amostra. Para o cálculo do coeficiente de absorção, aplica-se o log na equação 8 obtendo [39,41]:

$$\alpha = \frac{Abs}{0,4343 L}. \quad (10)$$

O cálculo da espessura efetiva da amostra e do comprimento de onda médio de emissão foram determinados utilizando as expressões [41,42], respectivamente:

$$L_{eff} = (1 - e^{-\alpha L})/\alpha \quad (11)$$

$$\langle \lambda_{em} \rangle = \frac{\int \lambda f(\lambda) d\lambda}{\int f(\lambda) d\lambda} \quad (12)$$

As medidas do espectro de absorbância neste trabalho, foram realizadas utilizando um espectrofotômetro da OceanOptics (USB2000+), e cubeta óptica de caminho óptico de 1 cm (quartzo com quatro faces polidas).

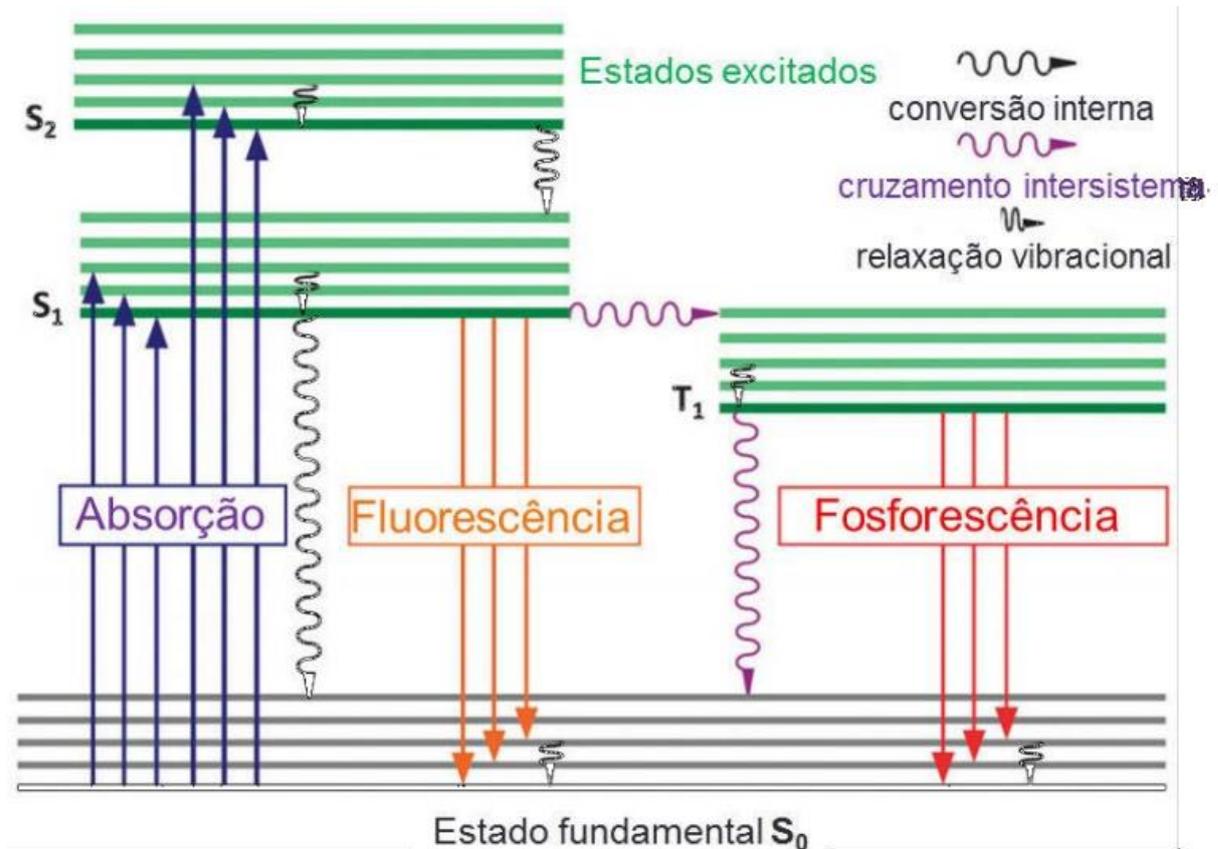
3.2 Fluorescência

Uma molécula no seu estado fundamental possui uma energia mínima. Sendo assim, para que essa molécula seja promovida para o seu estado excitado, é necessário que uma energia quantizada suficiente seja absorvida, para que ocorra uma transição eletrônica nessa molécula [37]. Após um certo tempo, essa molécula retornará ao seu estado fundamental liberando parte da energia absorvida na forma de energia radiante, esse fenômeno é denominado de emissão [43].

A emissão pode manifestar-se de duas maneiras conforme o tempo de duração da emissão de luz, podendo ser fluorescência e/ou fosforescência. Na fluorescência ocorre emissão de luz a partir de um estado excitado, havendo uma transição entre dois estados eletrônicos sem haver mudança de spin [44].

A maneira como ocorre os eventos nos processos de absorção e emissão em uma molécula são apresentados no diagrama de Jablonski (Figura 12). Em que, S_0 é o estado fundamental singleto enquanto que os estados excitados são representados por S_n com $n= 1, 2, 3$ etc. [44]

Figura 12. Diagrama de Jablonski.



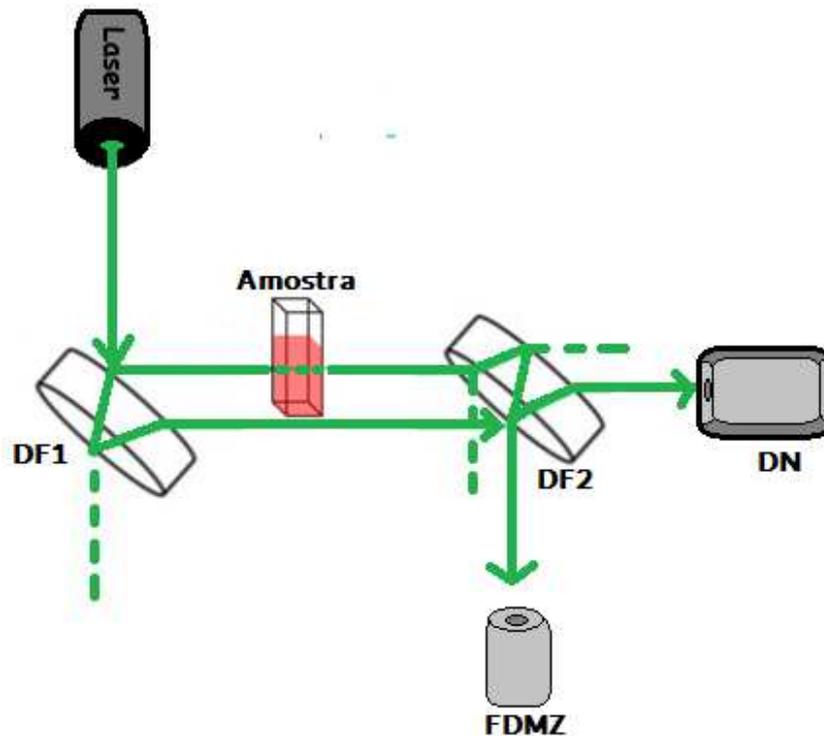
Fonte: BRAUN (2018). [44]

Os espectros de fluorescências foram obtidos utilizando-se um laser DPSSL Driver (modelo MGL532), com potência $P \approx 44$ mW, e cubeta óptica de caminho óptico de 1 cm (quartzo com quatro faces polidas).

3.3 Interferômetro

Para a determinação do coeficiente termo-óptico $\left(\frac{dn}{dT}\right)$ foi utilizado o interferômetro de feixe duplo de braço único semelhante ao interferômetro de Mach-Zehnder [39,45]. Para isso, foi utilizado um laser de 532 nm para a realização das medidas. Na Figura 13 é apresentada a representação do funcionamento desse interferômetro [39].

Figura 13. Esquema do Interferômetro de feixe duplo de braço único.

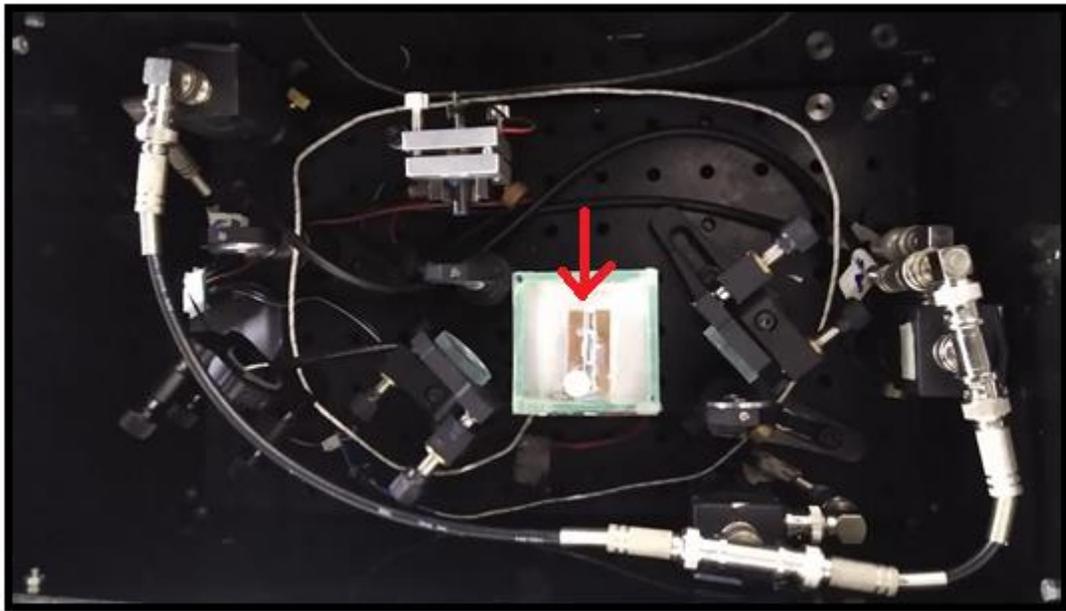


Fonte: Adaptado de DOMENEGUETI et al. (2017). [45]

O divisor de feixe (DF1) é constituído por superfícies planas e paralelas que permitem a reflexão do feixe. Assim, a luz proveniente do laser é refletida pela primeira e segunda face do (DF1), surgindo dois novos feixes que irão seguir dois caminhos adiante diferentes. Um desses feixes que sofreu reflexão na primeira face do (DF1) irá atravessar a cubeta de quartzo de 1 mm que contém a amostra e sofrerá reflexão na primeira face e segunda face do segundo divisor de feixe (DF2). Sendo que a primeira reflexão no (DF2) é desprezada, enquanto a segunda reflexão vai para o fotodetector Mach-Zehnder (FDMZ). O feixe que sofreu a reflexão pela segunda face do (DF1), irá seguir o seu caminho sem interagir com a amostra. Assim, quando o segundo feixe chega no (DF2) ele vai sofrer reflexão na primeira e na segunda faces do (DF2). A primeira reflexão no (DF2) é direcionada para o (FDMZ) enquanto a segunda reflexão, tem uma parte desprezada e outra parte que vai para o detector de normalização (DN), este fará a correção de possíveis flutuações de intensidade no laser. Depois dessas reflexões, os dois feixes se encontram na primeira face do (DF2) com uma diferença de fase, seguindo juntos até o (FDMZ) local onde será realizada a leitura da interferência causada pela interação desses feixes [39].

Para realizar o experimento, inicialmente coloca-se dentro do equipamento uma cubeta de quartzo de espessura de 1 mm contendo uma amostra em um suporte de cobre com formato de U, em cima de uma pastilha termoelétrica com operação baseada no efeito Peltier que está centralizado no meio do equipamento, conforme sinalizado pela seta vermelha na Figura 14. Assim, essa amostra vai sofrer variação de sua temperatura, e a medida que a sua temperatura é alterada, haverá modificação no caminho óptico e por consequência uma diferença de fase [39].

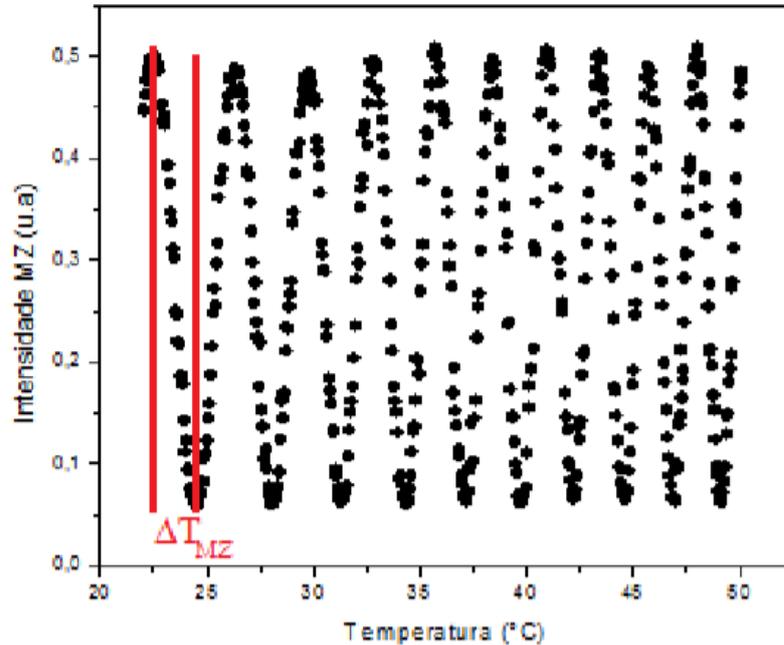
Figura 14. Seta vermelha informando o local onde é colocada a cubeta no interferômetro de feixe duplo.



Fonte: Autor.

Devido a essa diferença de fase, surgirá um padrão de franjas de interferência no (FDMZ) de acordo com a Figura 15, que é interpretado pelo módulo de aquisição de dados (DAQ). Esse módulo de aquisição de dados também é responsável por fazer o controle da temperatura da pastilha termoelétrica. Posteriormente, a análise é realizada no computador através do software LabVIEW [39].

Figura 15. Padrão de franjas de interferência para amostra de água destilada.



Fonte: LIMA (2018). [39]

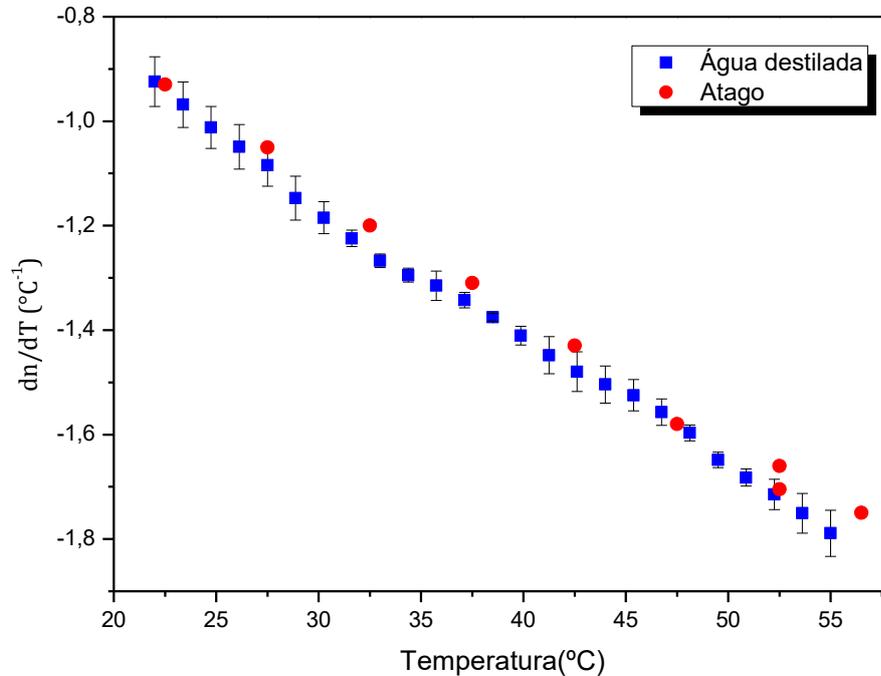
Na tela do software pode-se visualizar os máximos e mínimos das franjas de interferência que são obtidas conforme a temperatura vai aumentando, permitindo assim que os valores de ΔT_{MZ} sejam encontrados. Com esses valores encontrados são inseridos na equação de coeficiente termo-óptico utilizando o interferômetro de Mach-Zehnder dada por [39]

$$\frac{dn}{dT} = m \frac{\lambda}{2 L_0 \Delta T_{MZ}} \quad (13)$$

No qual o ΔT_{MZ} é a diferença entre um máximo e mínimo consecutivo de temperatura, em que neste caso $m = 1$. Já o L_0 é o comprimento da cubeta e λ é o comprimento de onda no vácuo. Sendo assim, com a utilização da Equação 13, o valor do coeficiente termo-óptico em função da temperatura é encontrado [39]. Após as coletas experimentais, os valores de dn/dT são obtidos. Desta forma, é possível realizar o gráfico de dn/dT para a solução estudada. Na Figura 16 é apresentado o gráfico de dn/dT da água destilada obtido por uso do interferômetro, e comparado com resultados da literatura obtidos usando um refratômetro comercial. Os quadrados em azul são os resultados obtidos para água destilada, colocada em uma cubeta óptica de quartzo de espessura de 1 mm em temperatura entre 22–50 °C, e os círculos

em vermelho são os resultados obtidos com um refratômetro comercial de alta precisão (Atago RX5000- α) [39].

Figura 16. Coeficiente termo-óptico da água destilada.



Fonte: Autor, e adaptada da literatura. [45]

3.4 Fluorescência resolvida no tempo

Os fluoróforos são grupos químicos fluorescentes, divididos em intrínsecos e extrínsecos. Os fluoróforos intrínsecos são moléculas que emitem luz naturalmente, já os extrínsecos são adicionados em uma amostra fornecendo a fluorescência e mudando as propriedades espectrais da mesma. As duas características mais importantes dos fluoróforos é o tempo de vida de fluorescência e o rendimento quântico [43,44].

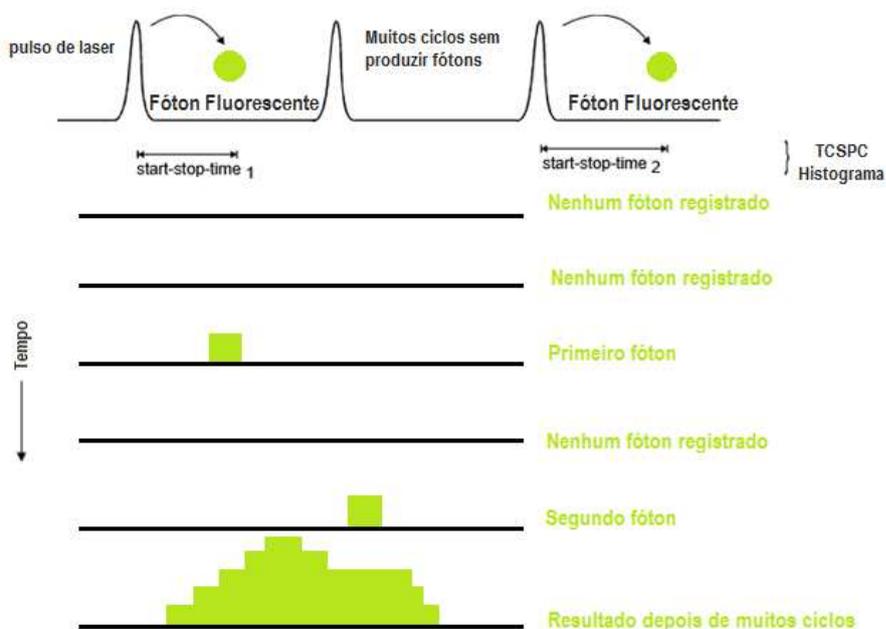
Rendimento quântico de fluorescência é definido como a razão do número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos. Enquanto que, o tempo de vida de fluorescência fornece informação do tempo disponível para que o fluoróforo venha a interagir e ou difundir-se no meio, possibilitando o conhecimento a respeito de sua emissão [43,46].

Logo, o tempo de vida de fluorescência é definido pelo tempo médio em que a molécula permanece no estado excitado antes de retornar ao seu estado fundamental

[46,47]. Essas medidas de tempo de vida são importantes e necessárias para a espectroscopia de fluorescência, pois por meio dos dados coletados é possível saber a taxa de transferência de energia e a taxa de reações no estado excitado [47]. Porém, as medidas de tempo de vida de fluorescência são relativamente difíceis de serem obtidas, pois em muitos materiais os valores são na faixa de nanossegundos, necessitando de equipamentos de alta velocidade e com detectores capazes para tais medidas. Há três métodos mais utilizados sendo eles: o método de pulsos, método estroboscópico e o método harmônico ou modulação de fases [47].

O método utilizado neste trabalho é o método de pulsos, no qual a molécula é excitada através de pulsos de LED (diodos emissores de Luz). A medição é realizada ao longo de muitos ciclos de excitação e emissão, sendo medido o tempo entre cada ciclo de excitação e emissão. Sendo assim, o equipamento determina o tempo entre os pulsos e o tempo de chegada do fóton e essas medições são coletadas possibilitando que a aquisição das curvas de decaimento de fluorescência sejam realizadas por meio de um histograma utilizando a técnica de contagem de fóton único resolvida no tempo (TCSPC), conforme a Figura 17 [48,49].

Figura 17. Representação de como o histograma é formado após vários ciclos de captura de fótons.



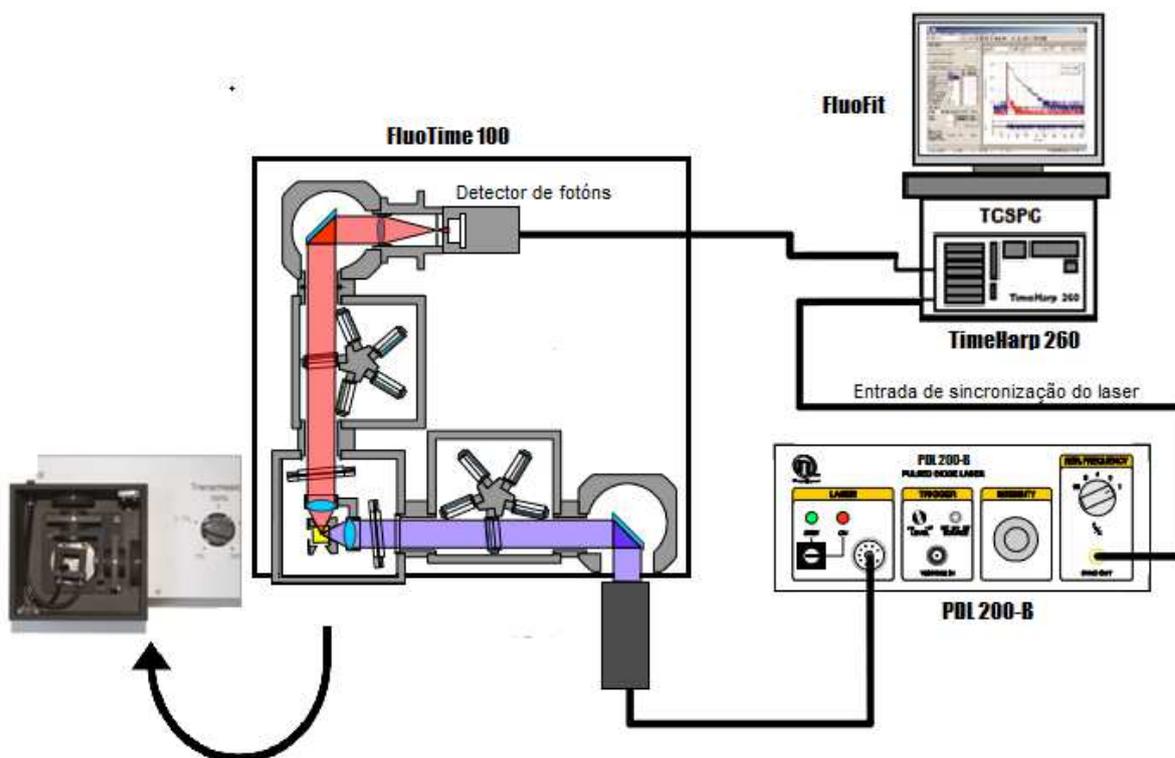
Fonte: Adaptado de PICOQUANT (2018). [50]

3.4.1 Técnica contagem de fóton único resolvida no tempo (TCSPC)

A contagem de fóton único correlacionada com o tempo (TCSPC) é uma técnica para análise do tempo de vida de fluorescência, que caracteriza o tempo de vida médio do estado excitado [51]. Essa técnica é importante em análise de sensibilidade e para compreensão dos processos bioquímicos [49].

A configuração experimental para medições do decaimento de fluorescência do sistema TCSPC pode ser visualizado na Figura 18. Ele é composto por um driver de diodo pulsado em picossegundos (PDL 200-B), detector de contagem de fótons PMT (PMA series) baseada nos módulos fotossensores da série Hamamatsu H5783 / H10721, FluoTime e TimeHarp 260. Além disso, há o software TimeHarp 260 que pode ser executado em plataformas Windows no computador e esses dados podem ser convenientemente exportados por meio da área de transferência, por exemplo, para processamento imediato através do software FluoFit *Fluorescence Decay Fit* [50,52].

Figura 18. Configuração do sistema TCSPC



Fonte: Adaptado de WAHL et al. (2002). [49]

Esta é uma configuração típica para medições de tempo de vida da fluorescência usando um canal de entrada do TimeHarp 260. O TimeHarp 260 é uma placa de contagem de fóton único com correlação de tempo (TCSPC) e escala multicanal (MCS) compacta e fácil de usar para a interface PCIe [50].

O driver do laser de diodo de picossegundos (PDL 200-B) é acionado por seu oscilador de cristal interno (o driver é fisicamente separada do cabeçote do LED), que é conectado por meio de um cabo flexível. Isso permite colocar o LED convenientemente em qualquer lugar da configuração óptica [53].

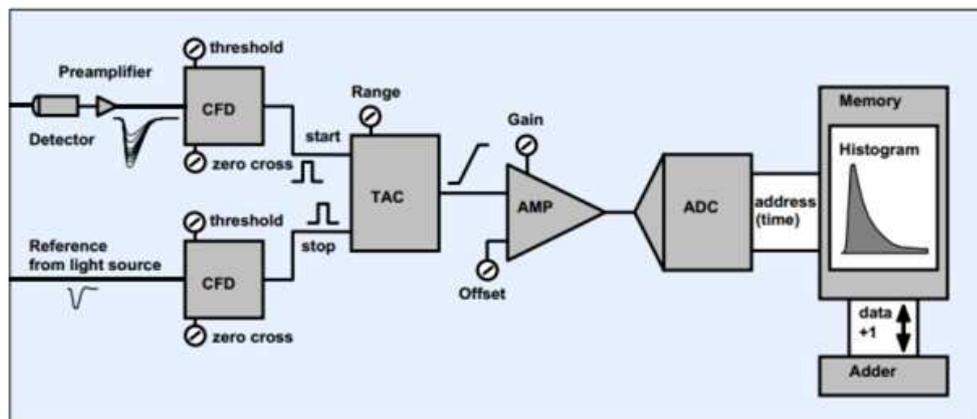
Nesse método (Figura 19) a medição começa com um LED que irá irradiar a amostra e induzir a emissão de fluorescência. O sinal de sincronização usado é tipicamente um sinal negativo estreito pulso de -800 mV em 50Ω (padrão NIM), e os pulsos de luz são direcionados para a cubeta de amostra por meio de lentes apropriadas. Após a excitação, a amostra fluorescente emitirá luz em um comprimento de onda mais longo do que o da luz de excitação e a luz de fluorescência é filtrada por meio de um filtro óptico. Em seguida, a luz de emissão de fluorescência da amostra vai ser direcionada para o detector de fóton único, normalmente por um tubo fotomultiplicador (PMT), um diodo de avalanche de fóton único (SPAD) ou intensificador de imagem que são usados para capturar os fótons de fluorescência [50]. Depois disso, o sinal elétrico de emissão é enviado para um discriminador de fração constante (CFD), que tem como função eliminar os ruídos e contribuir para uma medida mais precisa do tempo de chegada do pulso [50,52].

Semelhante ao sinal do detector, o sinal elétrico de sincronização fornecido diretamente pelo LED que também é chamado de sinal de excitação deve ser disponibilizado para o circuito de temporização pois ele será a referência para o tempo. Devido ao fato que os pulsos de sincronização são geralmente de amplitude e forma bem definidas. E da mesma forma que há na outra entrada do sinal de emissão um CFD, há também nesse canal de sincronização [50,52].

Assim, esses sinais dos dois discriminadores (CFD) são enviados a um conversor de tempo para amplitude (TAC). E essa (TAC) ela irá produzir uma tensão proporcional ao tempo que for medido entre a diferença de tempo entre os dois sinais. Após isso, essa tensão é amplificada e vai para o conversor analógico digital (ADC) que vai converter o valor de voltagem em contagem de fótons fornecendo o valor de temporização digital para endereçar o histograma [50,52].

Essa estrutura a qual foi descrita, é típica dos sistemas de TCSPC convencionais, vale lembrar que no design do TimeHarp 260 há uma certa diferença. Pois, as tarefas executadas pela (TAC) e o (ADC) são realizadas por um conversor tempo para digital (TDC). Sendo assim, no TimeHarp 260 se utiliza de um circuito para cada canal de entrada e um para a saída síncrona. Dessa forma, eles trabalham independentemente em cada sinal de entrada e fornecem horários de chegada de picossegundos e podem ser processado ainda mais, com muito mais opções do que nos sistemas TCSPC convencionais. Além disso, no TCSPC clássico o processamento se dá por meio da subtração dos dois valores de tempo obtendo o histograma das diferenças, conforme é realizado nas medições start-stop utilizados na TAC convencional [50].

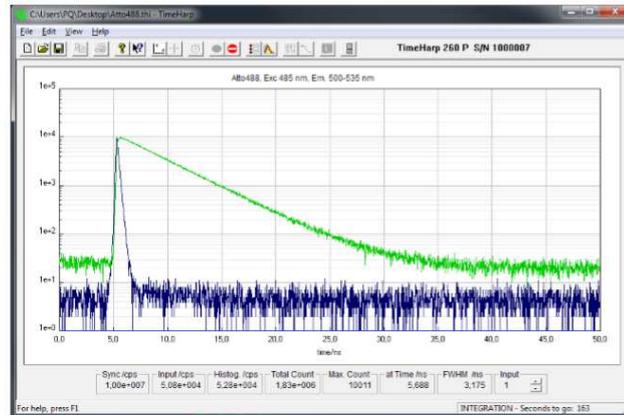
Figura 19. Diagrama de blocos do sistema TCSPC



Fonte: NOGUEIRA (2016). [54]

Portanto, nesse método é utilizado um diodo pulsado, sendo que para realizar as medidas é necessário incidir a luz de excitação e esperar um tempo para coletar a informação de fluorescência. E essa informação de fluorescência vai decaindo ao longo do tempo conforme mostrado na Figura 20. Assim, o que o sistema faz é medir fótons únicos ao longo do tempo com base nas informações guardadas de quanto tempo ele gastou para chegar depois que recebeu a excitação.

Figura 20. Perfil de decaimento de ciclo único a partir de eventos de fóton único coletados em muitos ciclos



Fonte: WAHL (2014). [52]

3.4.2 Aquisição de dados para a medida experimental

Para realizar o experimento, inicialmente coloca-se dentro do equipamento FluoTime 100 (*Fluorescence Lifetime Spectrometer*), a amostra de referência que geralmente é a sílica coloidal (Ludox) como solução espalhadora para medição da função de resposta do instrumento (IRF) e posteriormente a amostra de interesse de investigação.

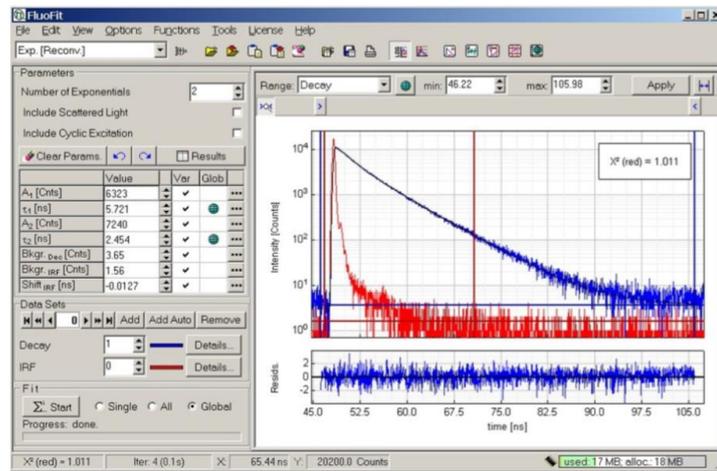
O equipamento vai coletar as medições e fará a aquisição das curvas de decaimento de fluorescência. E a partir dessas aquisições, é feito um histograma de pontos de intensidade de decaimento ($I_p(t)$), em que o eixo Y representa a quantidade de fótons detectados e o X é o intervalo de tempo de chegada. Esses pontos são apresentados em uma curva de decaimento de fluorescência, utilizando a convolução entre uma função de resposta do instrumento (IRF) e a função de resposta do pulso $I(t)$ [46].

A $I(t)$ é apresentada na equação 14, e temos que A e B são constantes e t é o tempo correspondente à determinada intensidade. Desta forma, é importante ressaltar que essa equação é utilizada apenas para decaimentos únicos. No software FluoFit (Figura 21) o gráfico principal próximo ao painel de parâmetros mostra os dados experimentais analisados, e a curva de ajuste exponencial. Com esses dados é possível realizar a análise estatística e o cálculo de X^2 através das equações dado por [46]:

$$I(t) = A + B \times e^{\left(\frac{-t}{\tau}\right)} \quad (14)$$

$$X^2 = \sum_{k=1}^n \frac{|I_p(t_k) - I(t_k)|^2}{I_p(t_k)} \quad (15)$$

Figura 21. Parâmetros e curvas obtidas da análise.



Fonte: PICOQUANT (2014). [55]

Diretamente acima do gráfico (Figura 21), há dois controles deslizantes que permitem definir os intervalos por meio de uma ação de clicar e arrastar do mouse que permite deixar o parâmetro dentro do aceitável, assim, bons valores para esse parâmetro são aqueles em que $X^2 < 1,2$. A função do X^2 é testar se a curva adquirida é consistente com as medidas obtidas. Os resultados numéricos e gráficos podem ser impressos e salvos.

CAPÍTULO 4

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão discutidos e apresentados os resultados experimentais obtidos pelas técnicas de interferometria do tipo Mach-Zehnder e da fluorescência resolvida no tempo. São apresentadas também as caracterizações espectroscópicas de absorção e fluorescência das amostras investigadas (a) corante natural extraído de plantas (antocianinas) e (b) fluoresceína inseridas em saliva artificial.

4.1 Análises dos resultados obtidos das amostras estudadas neste trabalho.

Na Tabela 2, estão dispostos os resultados obtidos para as medidas de pH das salivas artificiais e das soluções as quais foram realizadas através do equipamento da marca *Hanna Instruments* (HI 2221), sendo possível verificar o valor de pH medido em relação ao pH nominal para as salivas artificiais. Enquanto que na Tabela 3 estão os resultados obtidos para as medidas de pH da água destilada, e para a antocianina diluída em 4 mL de água destilada.

Tabela 2. Potencial hidrogeniônico das salivas artificiais

pH nominal	pH 3	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 10	pH 12
Leitura 1	3,74	5,63	6,30	7,95	8,44	8,94	11,90
Leitura 2	3,74	5,64	6,32	7,96	8,45	8,97	11,86
Leitura 3	3,74	5,65	6,37	7,97	8,44	8,96	11,89
Leitura 4	3,76	5,66	6,41	7,98	8,43	8,97	11,90
Leitura 5	3,76	5,66	6,43	7,99	8,44	8,97	11,89
Leitura 6	3,77	5,67	6,44	8,00	8,45	8,97	11,88
Leitura 7	3,77	5,68	6,45	8,01	8,45	8,97	11,89
Leitura 8	3,77	5,69	6,46	8,02	8,45	8,98	11,87
Leitura 9	3,77	5,69	6,47	8,01	8,45	8,96	11,89
Leitura 10	3,77	5,70	6,48	8,02	8,45	8,97	11,88
pH médio	3,77	5,70	6,49	8,02	8,45	8,97	11,88
DPA	0,01	0,02	0,06	0,03	0,01	0,01	0,01

Fonte: Autor.

Tabela 3. Medidas de pH para a água destilada, e para a 300 µL antocianina diluída em 4 mL de água destilada.

Medidas	Água destilada	Água e antocianina 300 µL
Leitura 1	4,84	5,96
Leitura 2	4,84	6,0
Leitura 3	4,85	6,01
Leitura 4	4,95	6,02
Leitura 5	4,96	6,03
Leitura 6	4,91	6,04
Leitura 7	4,92	6,05
Leitura 8	4,97	6,05
Leitura 9	4,98	6,06
Leitura 10	4,99	6,06
pH médio	4,92	6,03
DPA	0,06	0,03

Fonte: Autor.

As primeiras análises foram iniciadas na saliva artificial com o objetivo de caracterizar suas propriedades, e verificar se o coeficiente termo-óptico (dn/dT) poderia ser um parâmetro de análise sensível ao pH das salivas artificiais. Na Figura 22 são apresentados os resultados das medidas de interferometria de dn/dT em função da temperatura para a saliva artificial pura com diferentes valores de pH ($\approx 3-12$). Na Tabela 4 é apresentado o valor de dn/dT obtido para a água em 22 °C, e comparado com os valores obtidos na literatura [56]. O resultado do coeficiente termo-óptico obtido para água destilada está em bom acordo com a literatura [56].

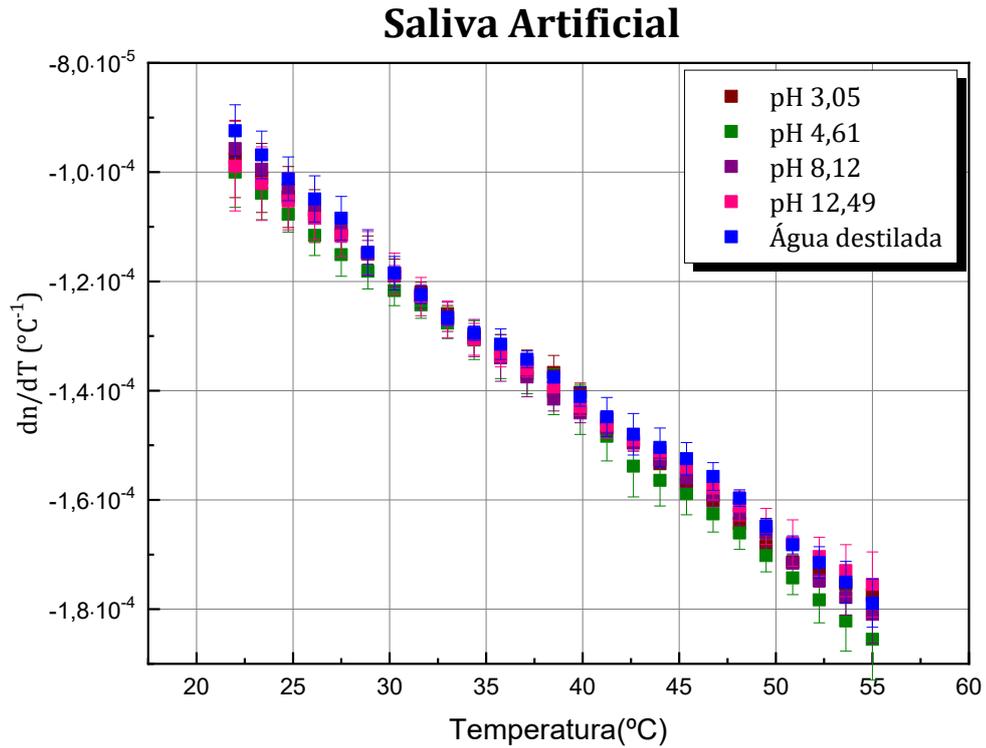
Tabela 4. Valor de dn/dT para água destilada e valor encontrado na literatura.

	- dn/dT ($10^{-4} K^{-1}$)	
Amostra	532 nm (22 °C)	Literatura
Água destilada	-0,92 \pm 0,05	0,8 - 1,0 [56]

Fonte: Autor.

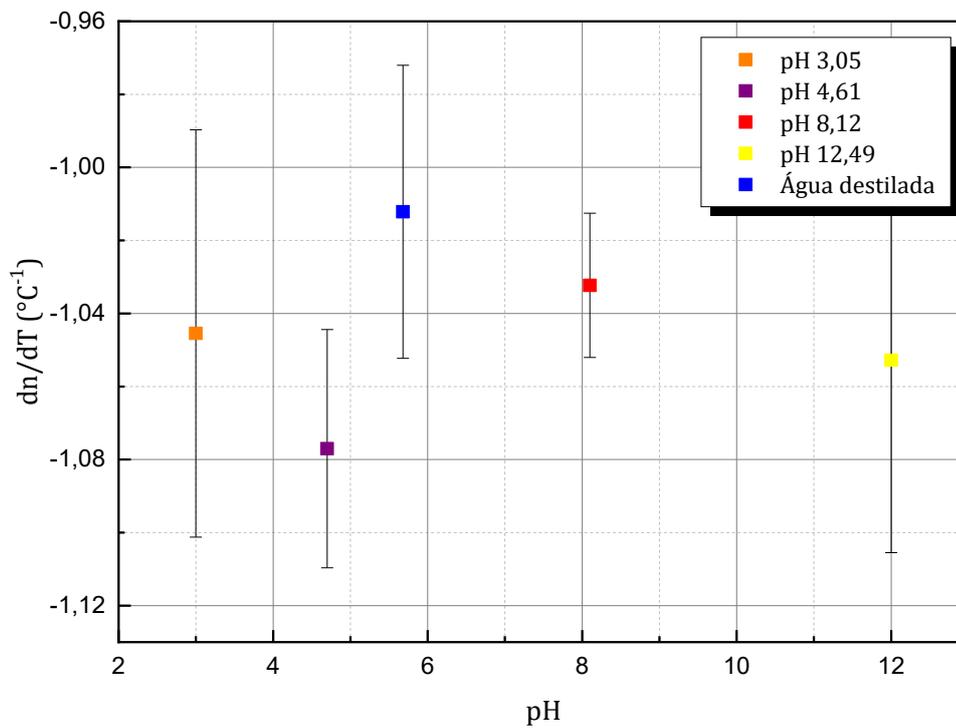
Na Figura 23 e Tabela 5 são apresentados os valores de dn/dT em função do pH da saliva artificial. É possível observar que os coeficientes termo-ópticos para saliva artificial pura não apresentaram modificações significativas para os diferentes valores de pH. Desta forma, a medida de dn/dT não é um parâmetro sensível como indicador de pH , tendo em vista as baixas concentrações dos corantes fluorescentes que serão avaliados, e desta forma não devem influenciar significativamente os resultados de dn/dT em função do pH .

Figura 22. Medidas de dn/dT para saliva artificial com diferentes valores de pH.



Fonte: Autor.

Figura 23. Medidas de dn/dT em função do pH em temperatura de 24°C.



Fonte: Autor.

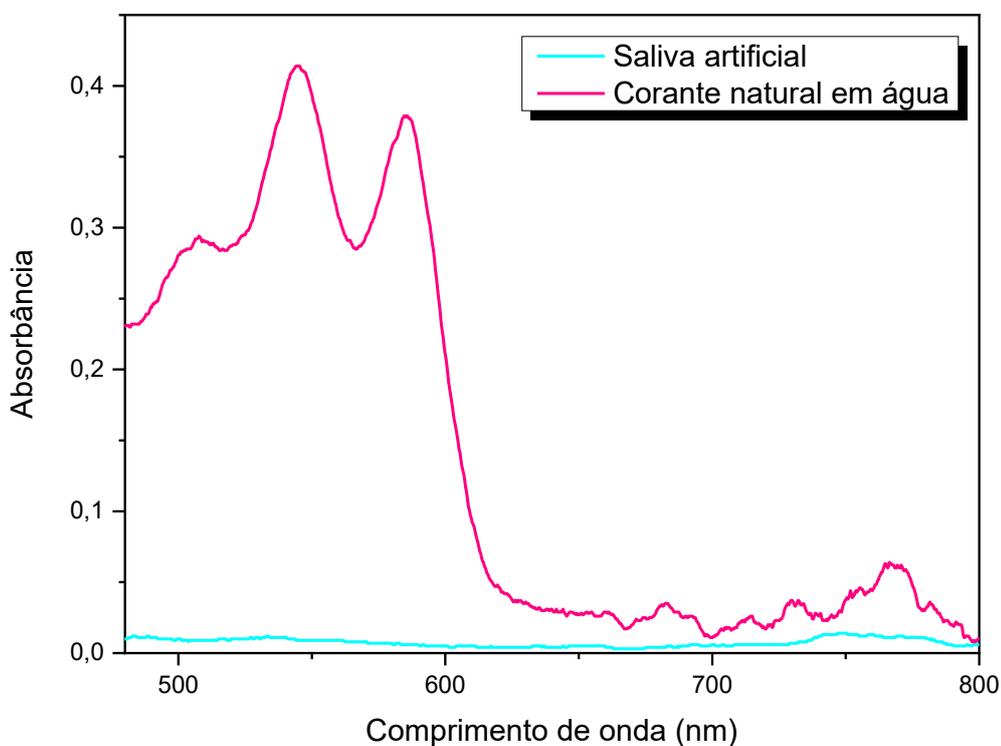
Tabela 5. Valor de dn/dT para saliva artificial pura.

$- dn/dT (10^{-4} K^{-1})$	
pH	532 nm (24°C)
3,05	$-1,04 \pm 0,05$
4,61	$-1,08 \pm 0,03$
8,12	$-1,03 \pm 0,02$
12,49	$-1,05 \pm 0,05$

Fonte: Autor.

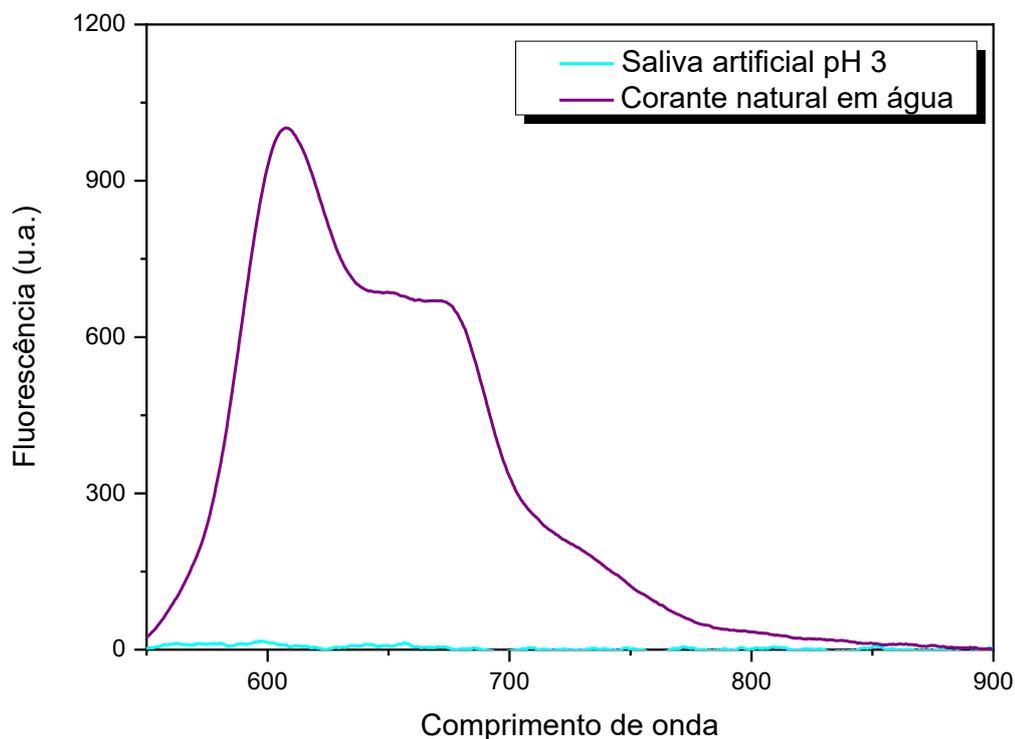
Desta forma, foram realizadas as caracterizações espectroscópicas (absorbância e fluorescência) em função do pH das salivas artificiais puras, como também na saliva artificial na presença de corantes fluorescentes, para testar a possível dependência desses resultados com os valores de pH. Nas Figuras 24 e 25 são apresentadas as medidas de absorbância e de fluorescência da saliva artificial com pH 3,74 e corante natural em água ($L= 1$ cm).

Figura 24. Espectro de absorbância para a saliva artificial pura (pH 3,74) e antocianina concentração de 0,66 g/ml diluída em 4 mL de água destilada.



Fonte: Autor.

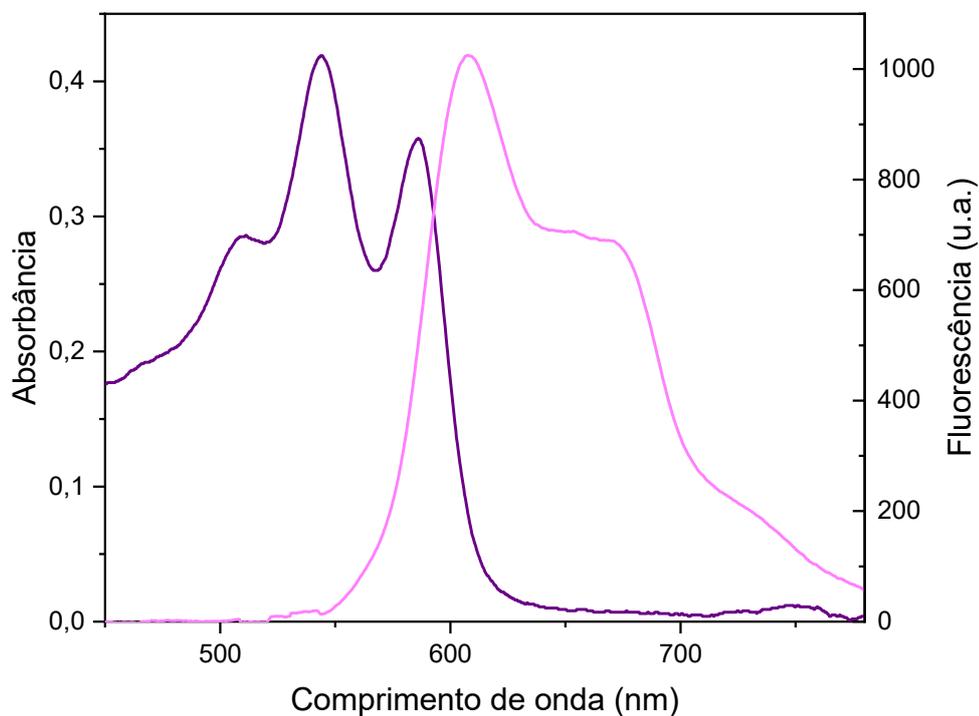
Figura 25. Espectro de fluorescência para a saliva artificial pura (pH 3,74) e antocianina concentração de 0,66 g/mL diluída em 4 mL de água destilada.



Fonte: Autor.

Sendo assim, por meio das análises obtidas (Figuras 24 e 25) percebe-se que o espectro de absorção para 300 μ L de corante natural (antocianina concentração de 0,66 g/mL) diluída em 4 mL de água destilada apresenta espectro característico de absorção, com bandas em 507,8, 545,5 e 585,72 nm. Essas bandas estão em acordo com os obtidos por Lima et al. [57] para a antocianina extraída das folhas de *Tradescantia pallida cv. purpúrea*. Além disso, é possível observar que na faixa entre 500 e 800 nm a saliva artificial pura não apresentou sinal de absorbância e nem de fluorescência. Na Figura 26 são apresentados os espectros de absorbância e fluorescência para antocianina inserida em saliva artificial pH 5,81 (concentração de 50 mg/mL). Desta forma, observa-se que quando são inseridas substâncias fluorescentes em saliva obtém-se os seus espectros característicos. Sendo assim, concluímos que a ausência de espectros de absorbância e fluorescência na saliva artificial é algo positivo, pois quando diluídas outras substâncias na saliva artificial o sinal que for obtido será da substância a qual foi diluída nela. Com isso é possível observar como essa substância se comportará ao ser inserida nesse fluido e se haverá variação quando inseridas em salivas em diferentes valores de pH.

Figura 26. Espectro de absorção e fluorescência em 300 μL de antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial (50 mg/mL; pH = 5,81; laser 532 nm e potência 44 mW)



Fonte: Autor.

Na Figura 27 são apresentados os frascos de antocianina inserida em saliva com diferentes valores de pH (concentração de 50 mg/mL). É possível observar a modificação de coloração da antocianina em diferentes pHs, indicando a possibilidade de utilização do mesmo como indicador de pH.

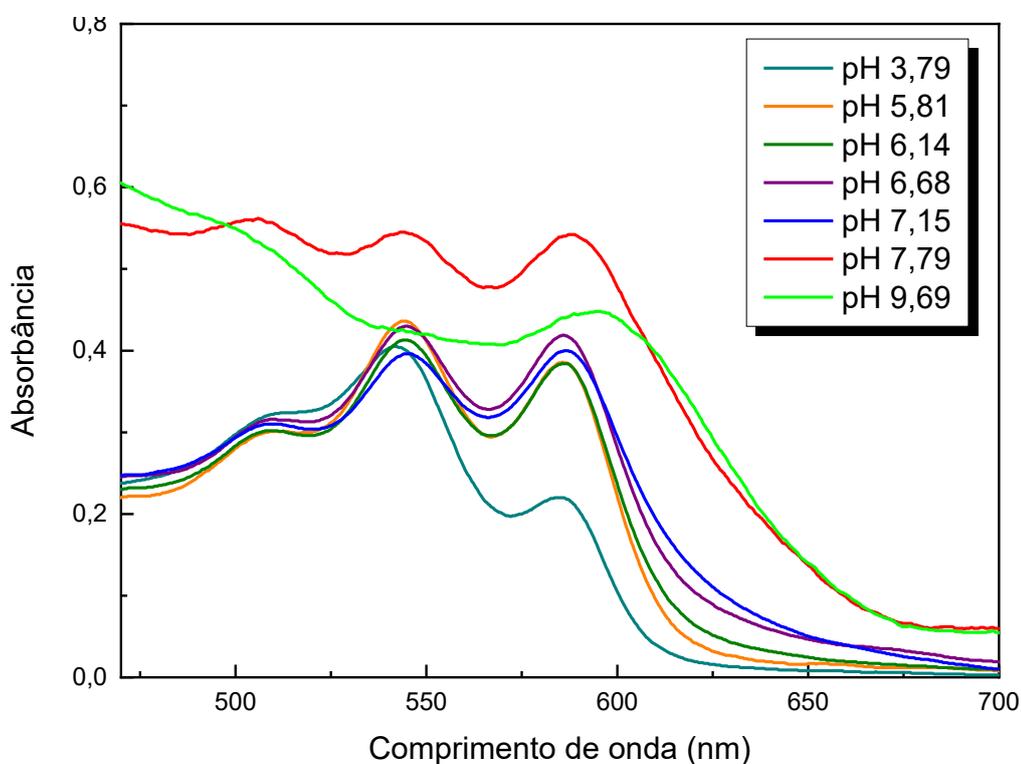
Figura 27. Amostra com 300 μL Antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial (concentração de 50 mg/mL) (A) pH 3,79; (B) pH 5,81; (C) pH 6,14; (D) pH 6,68; (E) 7,15; (F); 7,79; (G) 9,69.



Fonte: Autor.

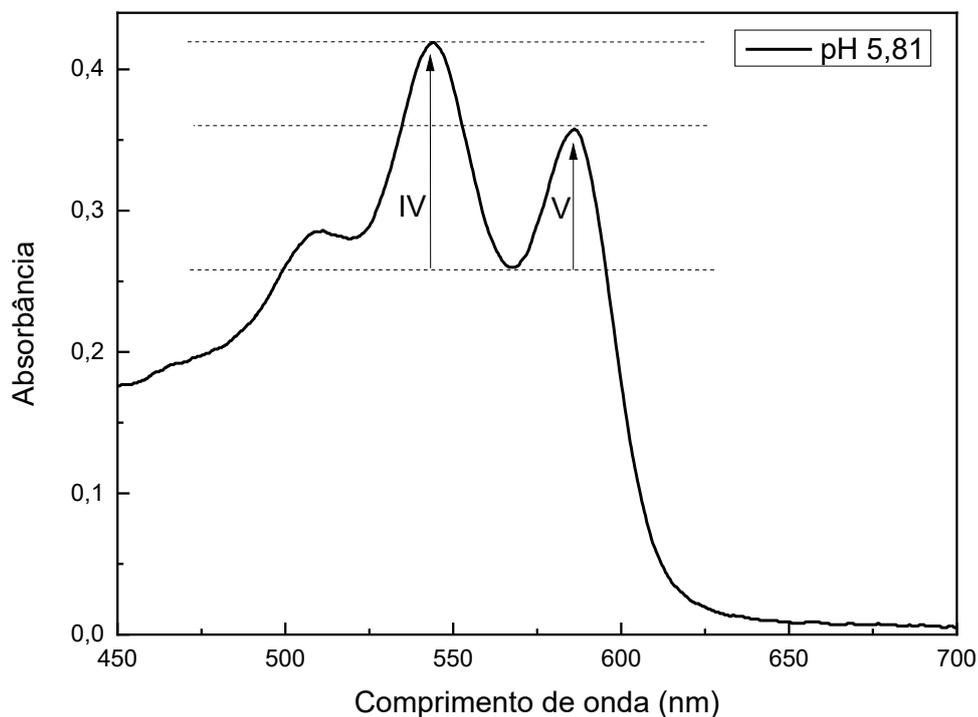
Os espectros de absorção e de fluorescência ($L = 1 \text{ cm}$, 532 nm e potência de 44 mW) foram realizados nas amostras da Figura 27. A Figura 28 apresenta o espectro de absorção na região do visível da antocianina inserida em saliva artificial para diferentes valores de pH (concentração 50 mg/mL). É possível observar a presença de 3 picos de absorção e que há uma diferença entre as alturas das bandas, como identificado na Figura 29. Percebe-se que a banda V aumenta em relação à banda IV, e que dentre todas as amostras investigadas, a antocianina inserida em saliva com pH 3,57 foi a que teve uma maior diferença entre a altura dos picos. A razão entre os picos de absorção V/IV são apresentados em % na Tabela 6. Com base nessa tabela e a Figura 28, observa que a relação entre os picos V e IV aumenta com o pH da saliva artificial, mas a partir do pH 7,79 essa razão tende a se manter constante (Figura 30). Na Tabela 6 são apresentados também, os valores de coeficiente de absorção em 532 nm , comprimento efetivo e comprimento de onda de emissão média, obtidos usando as Equações (11) e (12), respectivamente.

Figura 28. Espectros de absorção $300 \mu\text{L}$ de antocianina concentrada diluída em 4 mL de saliva artificial com concentração de 50 mg/mL .



Fonte: Autor.

Figura 29. Espectro de absorção para 300 μL de antocianina concentrada diluída em 4 mL de saliva artificial de pH 5,81 com concentração de 50 mg/mL.



Fonte: Autor.

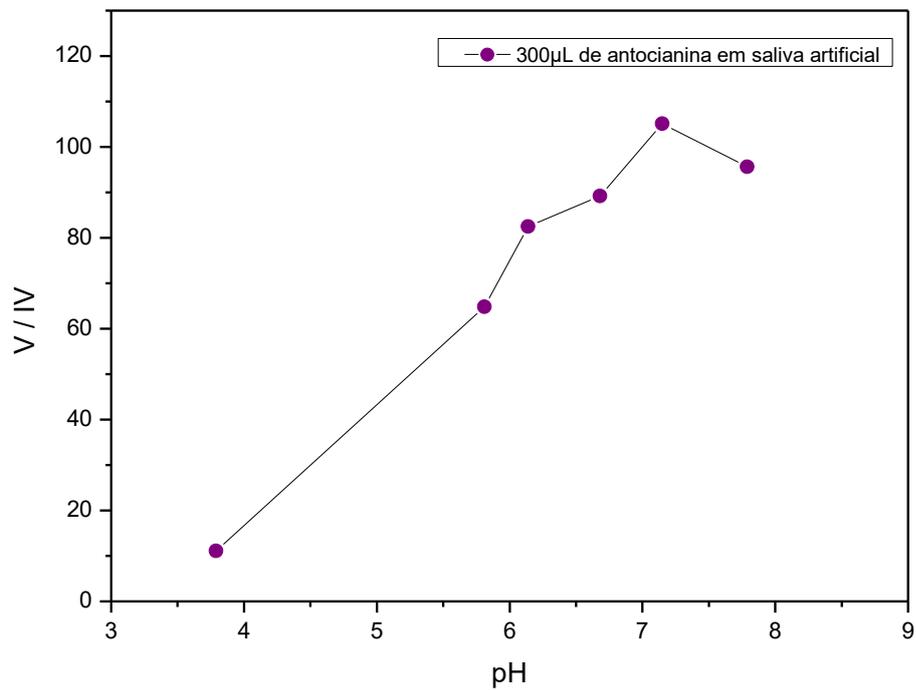
Tabela 6. Concentração e propriedades ópticas de 300 μL antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial em diferentes pHs (concentração 50 mg/mL, $\lambda = 532 \text{ nm}$).

Amostras (pH)	$\alpha(\text{cm}^{-1})$	$L_{\text{eff}} (\text{cm})$	V/IV (%)	$\langle \lambda_{em} \rangle (\text{nm})$
3,79	0,84	0,67	11,06	651,52
5,81	0,83	0,68	64,79	649,50
6,14	0,79	0,69	82,5	650,38
6,68	0,82	0,68	89,21	654,04
7,15	0,78	0,69	105,13	650,62
7,79	1,20	0,58	95,59	648,92
9,69	1,01	0,63	---	642,03

Fonte: Autor.

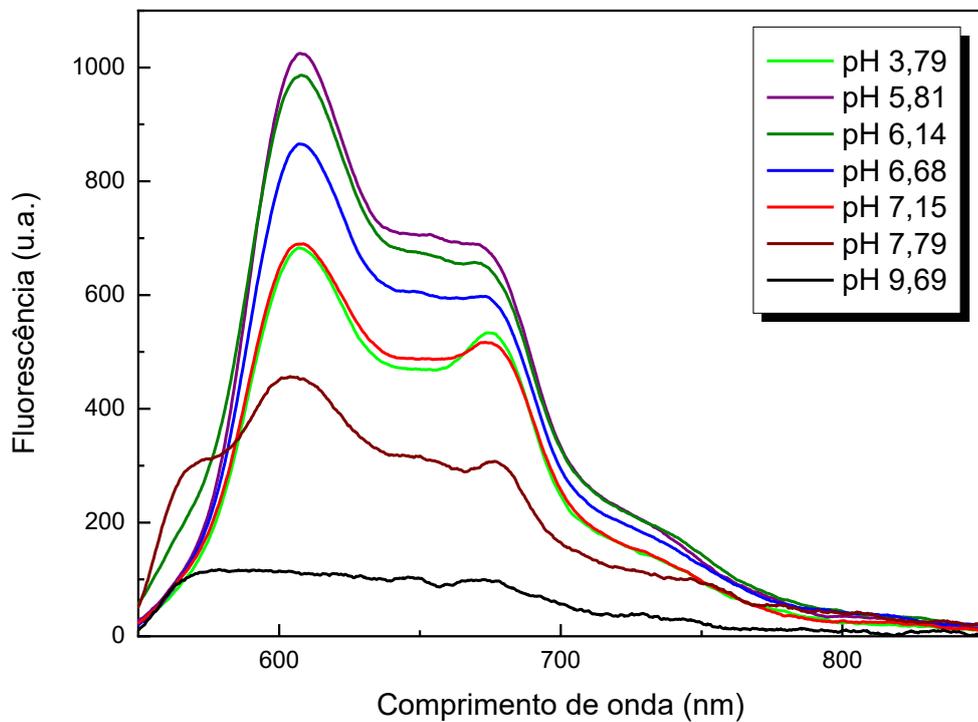
Nas Figuras 31 e 32 são apresentados os espectros de fluorescência e fluorescência normalizada por αL_{eff} , respectivamente. Com exceção da amostra de antocianina inserida em pH mais ácido (pH 3.79), as intensidades de pico das fluorescências diminuem com o aumento do pH (5.8-9.7). Na Tabela 6 são apresentados também, os resultados do comprimento de onda de emissão média $\langle \lambda_{em} \rangle$, nenhuma modificação significativa foi observada para os valores de $\langle \lambda_{em} \rangle$ no intervalo de pH investigado.

Figura 30. Relação entre os picos em função do pH para 300 μ L antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial (concentração de 50 mg/mL).



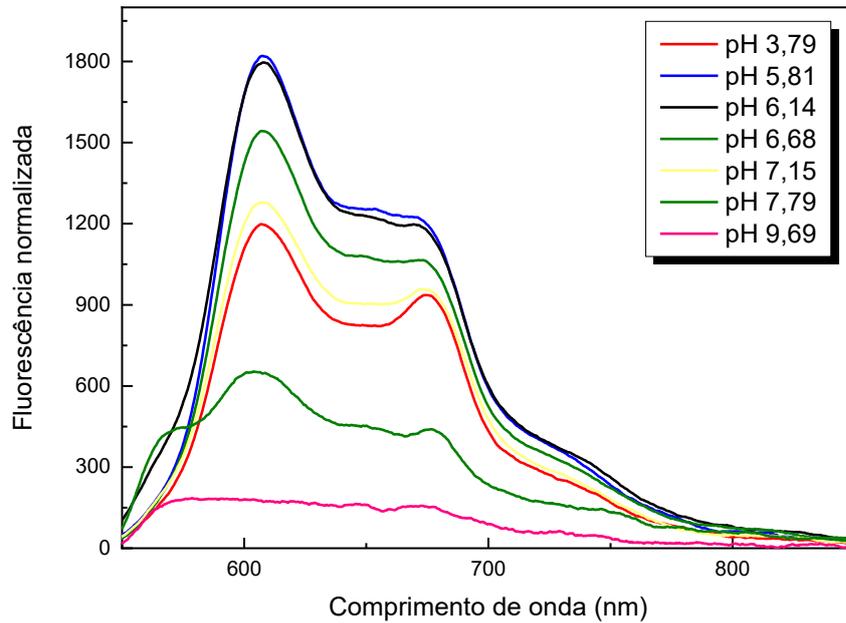
Fonte: Autor.

Figura 31. Espectro de fluorescência para 300 μ L antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial (concentração de 50 mg/mL).



Fonte: Autor.

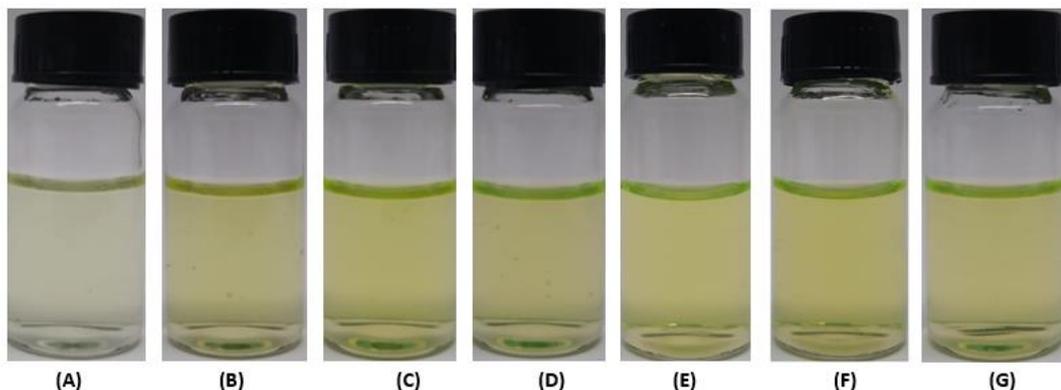
Figura 32. Espectro de fluorescência normalizada da antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial (concentração de 50 mg/mL).



Fonte: Autor.

O segundo corante analisado neste trabalho foi a fluoresceína na concentração (0.3 mg/mL) inserida em saliva artificial em diferentes valores de pH. A amostra de fluoresceína para este trabalho foi realizada usando 3,0 mg de fluoresceína sódica em 10 mL de etanol, e foram inseridos 130 μ L de fluoresceína em 10 mL de saliva artificial para cada um dos valores de pH. As fotos das amostras de fluoresceínas em diferentes valores de pH são apresentadas na Figura 33. Observa-se que a saliva artificial de pH 3,75 (Figura 33) apresenta uma coloração mais clara quando comparada as demais, e que as amostras não apresentaram mudança de cor significativa.

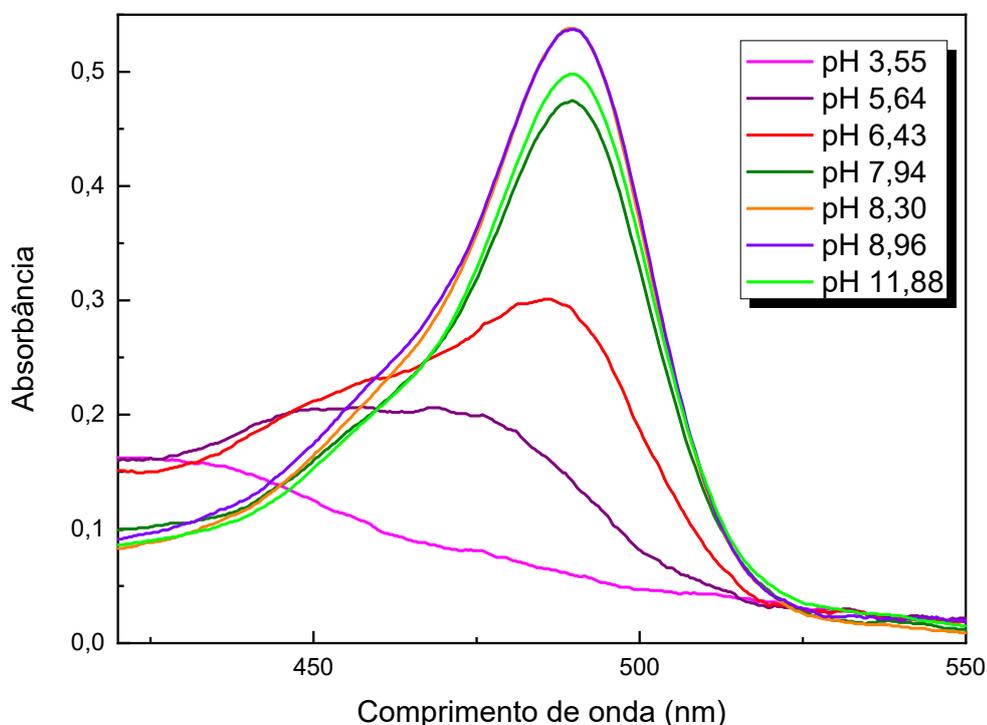
Figura 33. Amostras com 130 μ L de fluoresceína diluída em 10 mL de saliva artificial com concentração de $3,9 \times 10^{-3}$ mg/mL. (A) pH 3,57; (B) pH 5,64; (C) pH 6,43; (D) pH 7,94; (E) 8,30; (F) 8,96; (G) 11,88.



Fonte: Autor.

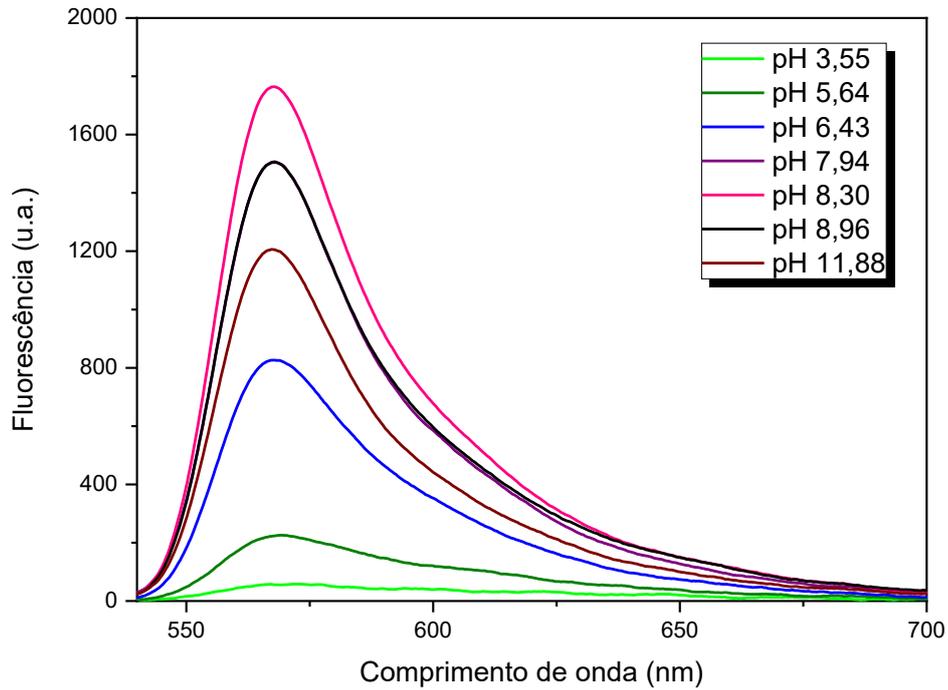
Nas Figuras 34 e 35 são apresentados os espectros de absorção e de fluorescência, respectivamente, para as amostras de fluoresceína inseridas em saliva artificial ($L = 1\text{ cm}$). Na Tabela 7 são apresentados os resultados de absorbância máxima e os valores de comprimento de onda de emissão média para as soluções de fluoresceínas em diferentes valores de pH. Na Figura 34, é possível observar que o pico de absorção a esquerda é suprimido com o aumento do pH das salivas, e por outro lado, um outro pico de absorção aparece a direita com a elevação do pH da saliva. Na Tabela 7 são apresentados os valores de pico máximo de absorbância, para cada uma das amostras de fluoresceína, e percebe-se que há um aumento na absorção com a elevação dos valores de pH (pH mais alcalino). Portanto, observa-se que os espectros de absorção e de fluorescência apresentam para a fluoresceína dependência dos valores de pH. O valor médio de $\langle \lambda_{em} \rangle = 593,29\text{ nm}$ foi obtido para todos os valores de pH analisados neste trabalho para a fluoresceína inserida em saliva artificial.

Figura 34. Espectro de absorção para $130\ \mu\text{L}$ de fluoresceína inserida em $10\ \text{mL}$ de saliva artificial (concentração $3,9 \times 10^{-3}\ \text{mg/mL}$).



Fonte: Autor.

Figura 35. Espectro de fluorescência para 130 μL de fluoresceína inserida em 10 mL de saliva artificial (concentração $3,9 \times 10^{-3}$ mg/mL).



Fonte: Autor.

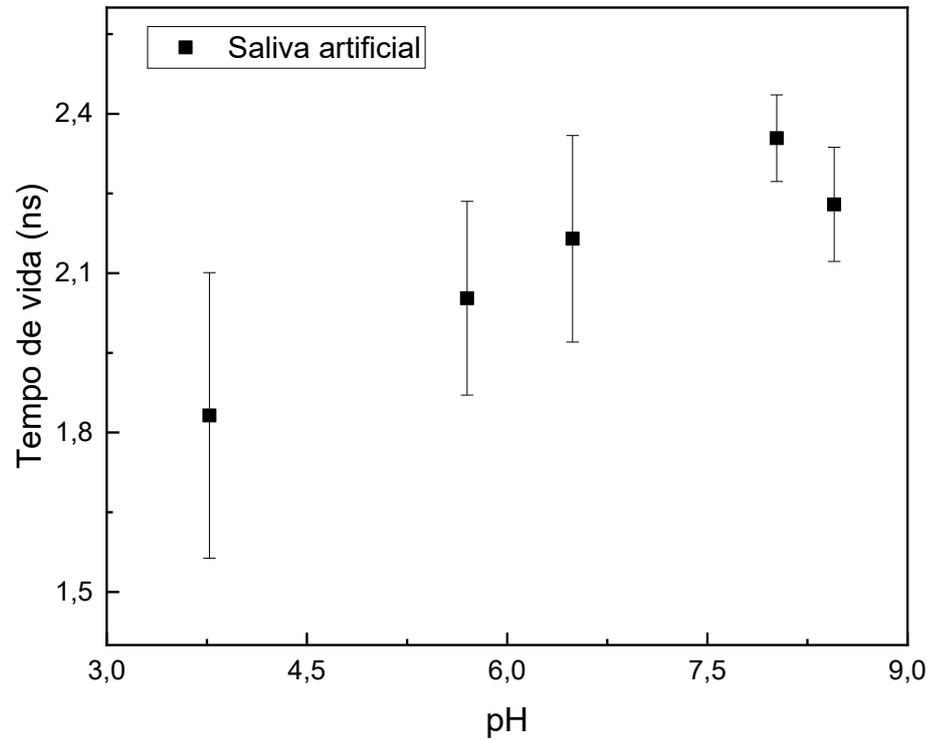
Tabela 7. Valores de pH, pico de absorção e $\langle \lambda_{em} \rangle$ para fluoresceína inseridas em salivas (concentração de $3,9 \times 10^{-3}$ mg/mL).

Amostras (pH)	Pico máximo de absorbância	$\langle \lambda_{em} \rangle$ (nm)
3,55	0,161	602,5
5,64	0,206	598,7
6,43	0,301	588,2
7,94	0,475	588,9
8,30	0,538	589,1
8,96	0,537	593,0
11,88	0,498	592,7

Fonte: Autor.

As medidas de tempo de vida de fluorescência foram realizadas pelo grupo de pesquisa, e todas as medidas foram ajustadas usando uma única exponencial com valores de $\chi^2 < 1.2$. Na Figura 36 é apresentada o resultado do tempo de vida para a saliva pura com valores de pH 3,77; pH 5,7; pH 6,49; pH 8,02 e pH 8,45. Figuras 37 e 38 apresentam os resultados de tempo de vida de fluorescência para a antocianina e fluoresceínas inseridas em salivas artificiais em função do pH, respectivamente.

Figura 36. Fluorescência resolvida no tempo para a saliva artificial pura



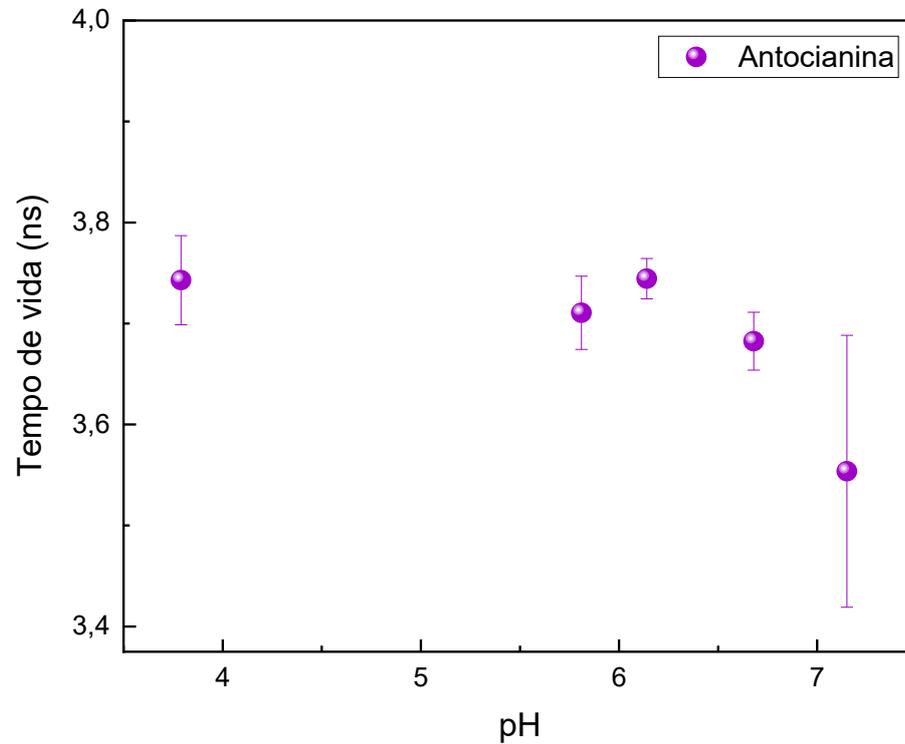
Fonte: Autor.

Tabela 8. Tabela com os respectivos parâmetros de ajustes para a saliva artificial.

pH nominal	pH medido	τ (ns)	A	χ^2
3,0	3,77	$1,5 \pm 0,2$	80 ± 7	$0,9 \pm 0,1$
5,0	5,7	$1,8 \pm 0,2$	78 ± 6	$0,96 \pm 0,09$
6,0	6,49	$1,8 \pm 0,3$	80 ± 10	$0,96 \pm 0,04$
7,0	8,02	$2,1 \pm 0,3$	90 ± 10	$0,97 \pm 0,07$
8,0	8,45	$2,2 \pm 0,3$	114 ± 9	$0,94 \pm 0,05$

Fonte: Realizada pelo grupo de pesquisa.

Figura 37. Fluorescência resolvida no tempo para 300 μL antocianina em 4 mL de saliva artificial em função do pH (concentração 50 mg/mL).



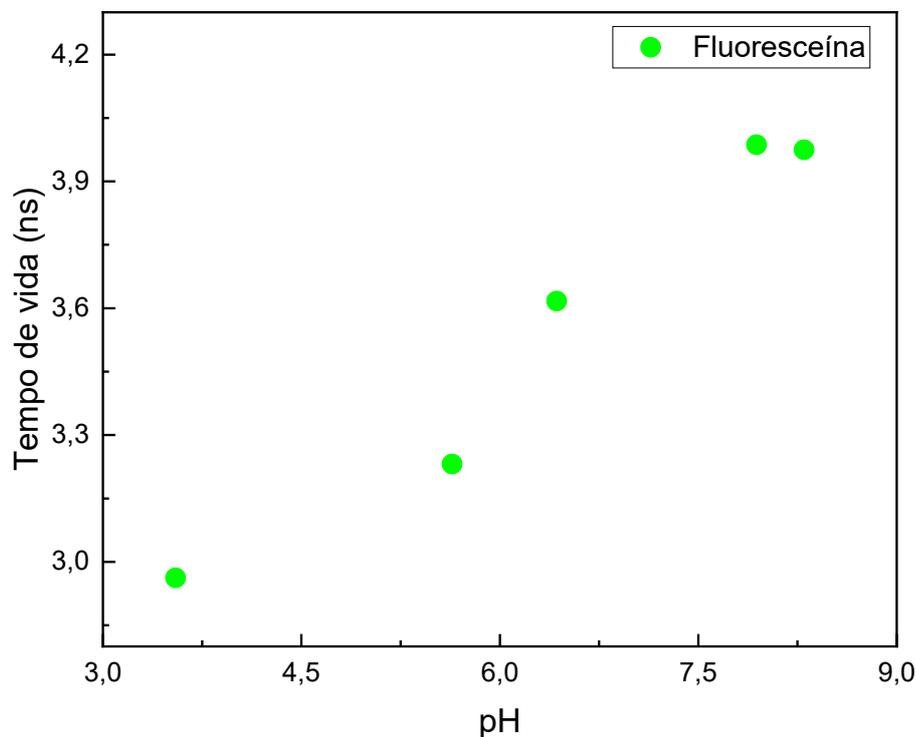
Fonte: Autor.

Tabela 9. Tabela com os respectivos parâmetros de ajustes para 300 μL antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial em diferentes pHs (concentração 50 mg/mL).

pH nominal	pH medido	τ (ns)	A	χ^2
3,0	3,79	$3,74 \pm 0,04$	410 ± 6	$1,14 \pm 0,04$
5,0	5,81	$3,71 \pm 0,04$	480 ± 10	$1,14 \pm 0,03$
6,0	6,14	$3,74 \pm 0,02$	492 ± 6	$1,07 \pm 0,04$
7,0	6,68	$3,68 \pm 0,03$	430 ± 20	$1,10 \pm 0,05$
8,0	7,15	$3,55 \pm 0,13$	300 ± 100	$1,12 \pm 0,03$

Fonte: Realizada pelo grupo de pesquisa.

Figura 38. Fluorescência resolvida no tempo para 130 μL de fluoresceína inserida em 10 mL de saliva artificial (concentração $3,9 \times 10^{-3}$ mg/mL).



Fonte: Autor.

Tabela 10. Tabela com os respectivos parâmetros de ajustes 130 μL de fluoresceína inserida em 10 mL de saliva artificial (concentração $3,9 \times 10^{-3}$ mg/mL).

pH nominal	pH medido	τ (ns)	A	χ^2
3,0	3,55	$2,96 \pm 0,01$	4350 ± 80	$0,94 \pm 0,05$
5,0	5,64	$3,23 \pm 0,01$	12000 ± 200	$1,15 \pm 0,02$
6,0	6,43	$3,62 \pm 0,01$	12000 ± 300	$1,16 \pm 0,03$
7,0	7,94	$3,99 \pm 0,01$	12000 ± 200	$1,01 \pm 0,03$
8,0	8,30	$3,97 \pm 0,01$	12100 ± 200	$0,99 \pm 0,03$

Fonte: Realizada pelo grupo de pesquisa.

Na Figura 37, observa-se que a antocianina inserida em saliva artificial apresenta um decréscimo do tempo de vida conforme o pH aumenta. Por outro lado, os valores de tempo de vida de fluorescência para a fluoresceína, aumentam em função da elevação do pH (Figura 38). Na literatura observou-se que as nanopartículas de CdSe/ZnS com diferentes tamanhos de núcleos aumentavam o valor da eficiência quântica da fluorescência com a elevação do pH da saliva [10]. Estes resultados estão em acordo com o aumento do tempo de vida observado para a fluoresceína,

destacando a possibilidade do uso desse cromóforo fluorescente como indicador de pH em salivas artificiais. Por outro lado, o corante natural mostrou ser um biossensor menos efetivo para esse tipo de aplicação dependente do pH, devido a necessidade de utilização em maiores concentrações, limitados pelo processo de extração, e baixas quantidades de volumes que podem ser inseridas na saliva para não modificar o valor do pH da saliva investigada.

CAPÍTULO 5

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram apresentados estudos de dois corantes fluorescentes (fluoresceína e antocianina) suspensos em saliva artificial em diferentes valores de potencial de hidrogênio (entre $\sim 3,5 - 11,9$). Foram realizadas medidas espectroscópicas (absorção, fluorescência e tempo de vida da fluorescência) em ambos os corantes, com o objetivo de estudar as características ópticas da antocianina e da fluoresceína em função do pH, com a finalidade de avaliar esses corantes como possíveis sensores de pH salivar. Além disso, também foram realizadas medidas termo-ópticas (determinação do parâmetro de dn/dT) em função da variação do pH da saliva. Tendo por base que a saliva é um importante fluido corporal com valor de pH normal que varia (entre $6,0 - 7,0$), e que em casos de patologias o valor do pH salivar poderá sofrer variações. Foi utilizado a saliva artificial como um fluido de estudo a fim de simular um meio biológico e analisar qual o melhor sensor, ou seja, aquele com maior sensibilidade de detecção de variação do pH salivar.

Baseado nos resultados colorimétricos obtidos, observou-se que o corante natural ao ser inserido em saliva artificial, apresenta modificação de coloração da antocianina em diferentes valores de pHs. Desta forma, possibilitando a utilização do mesmo como indicador de pH. Além disso, foi possível observar que os valores de tempo de vida de fluorescência para a fluoresceína aumentaram em função da elevação do pH. Estes resultados são similares aos obtidos na literatura para as nanopartículas de CdSe/ZnS, com diferentes tamanhos de núcleos, que apresentam aumento dos valores da eficiência quântica da fluorescência com a elevação do pH da saliva [10]. Desta forma, os resultados obtidos para as nanopartículas estão em acordo com o aumento do tempo de vida observado para a fluoresceína, destacando a possibilidade do uso desse cromóforo fluorescente como indicador de pH em salivas artificiais.

Por outro lado, o corante natural mostrou ser um sensor menos efetivo para esse tipo de aplicação dependente do pH, devido a necessidade de utilização em maiores concentrações, limitados pelo processo de extração, e baixas quantidades de volumes que podem ser inseridas na saliva para não modificar o valor do pH da saliva

investigada. Então, a partir do apresentado pode-se, em estudos futuros, realizar análises com nanopartículas e verificar qual sensor é o mais eficaz para a aplicação em diagnóstico e na prevenção de doenças, levando em consideração que o pH da saliva humana pode variar em casos de patologia.

REFERÊNCIAS

- [1] NETO, J. M. de A. e S. et al. A saliva como sendo um meio de diagnósticos: uma revisão de literatura. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, [S. l.], n. 41, p. e2506–e2506, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.25248/reas.e2506.2020>
- [2] ILEA, A. et al. Saliva, a Magic Biofluid Available for Multilevel Assessment and a Mirror of General Health—A Systematic Review. **Biosensors**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 27, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/bios9010027>
- [3] LIMA, D. P. et al. O uso de saliva para diagnóstico de doenças orais e sistêmicas. **Revista Odontológica de Araçatuba**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 6, 2014.
- [4] MALON, R. S. P. et al. Saliva-Based Biosensors: Noninvasive Monitoring Tool for Clinical Diagnostics. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2014, p. 1–20, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/962903>
- [5] FINO, M. de A. C. S. **A saliva como meio de diagnóstico**. 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Dentária). Instituto Universitário Egas Moniz, [S. l.], 2018.
- [6] GARCIA, P. de T. **Desenvolvimento de sensores colorimétricos e eletroquímicos para aplicações clínicas e forenses**. 2017. 162 f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.
- [7] SHAHID, M.; SHAHID-UL-ISLAM; MOHAMMAD, F. Recent advancements in natural dye applications: a review. **Journal of Cleaner Production**, [S. l.], v. 53, p. 310–331, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.03.031>
- [8] GEREGA, A. et al. Wavelength-resolved measurements of fluorescence lifetime of indocyanine green. **Journal of Biomedical Optics**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 067010, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1117/1.3593386>
- [9] XISTO, L. A. D.; MORGAN, N. M. T.; FREITAS, N. P. de. Utilização da espécie *tradescantia pallida* cv. *purpurea* como bioindicadora da qualidade do ar, através de bioensaio de micronúcleo. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, [S. l.], v. 15, n. 2, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5892/ruvrd.v15i2.3243>.
- [10] PILLA, V. et al. Fluorescence quantum efficiency of CdSe/ZnS quantum dots embedded in biofluids: pH dependence. **Journal of Applied Physics**, v. 112, n. 10, p. 104704, 2012.
- [11] SANTANA, J. F. de. et al. Optical characterization of core–shell quantum dots embedded in synthetic saliva: Temporal dynamics. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S. l.], v. 151, p. 208–212, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.08.016>.

- [12] LUO, C. et al. An Optical Sensor with Polyaniline-Gold Hybrid Nanostructures for Monitoring pH in Saliva. **Nanomaterials**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 67, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nano7030067>
- [13] ROBLEGG, E.; COUGHRAN, A.; SIRJANI, D. Saliva: An all-rounder of our body. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 142, p. 133–141, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.06.016>.
- [14] KACZOR-URBANOWICZ, K. E. et al. Saliva diagnostics – Current views and directions. **Experimental Biology and Medicine**, [S. l.], v. 242, n. 5, p. 459–472, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1535370216681550>.
- [15] MANOSROI, A. et al. A biological active artificial saliva formulation containing flower mucilage from Ceylon Spinach (*Basella alba* Linn.). **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 769–776, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.01.007>.
- [16] KHAN, M. I. et al. A review on pH sensitive materials for sensors and detection methods. **Microsystem Technologies**, [S. l.], v. 23, n. 10, p. 4391–4404, 2017. Disponível em: <https://10.1007/s00542-017-3495-5>
- [17] GAMA, M. da S.; AFONSO, J. C. De Svante Arrhenius ao peagâmetro digital: 100 anos de medida de acidez. **Química Nova**, [S. l.], v. 30, p. 232–239, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000100038>
- [18] BENEVIDES, C. A. **Avaliação espectroscópica de corantes orgânicos submetidos a raios-x: aplicação em dosimetria de radiação ionizante**. 2015. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.
- [19] O'GOSHI, K.; SERUP, J. Safety of sodium fluorescein for in vivo study of skin. **Skin Research and Technology**, v. 12, n. 3, p. 155–161, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.0909-752X.2006.00147.x>
- [20] PIROLO, A. A. B. **SÍNTESE DA FLUORESCÉINA**. Trabalho de Conclusão de Curso (Trabalho de Conclusão de Curso em Química Industrial). Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, [s.l.], 2010.
- [21] GUELLIS, C. **Eletrofiação de quitosana e poli (óxido de etileno) com incorporação de acetato de itérbio e corantes fluorescentes**. 2019. 71 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2019.
- [22] RAJASEKAR, M. Recent development in fluorescein derivatives. **Journal of Molecular Structure**, [S. l.], v. 1224, p. 129085, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129085>
- [23] CASTRO, N. S. et al. Fluorescence anisotropy of fluorescein derivative varies according to pH: Lessons for binding studies. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, [S. l.], v. 372, p. 59–62, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.12.008>

- [24] HOU, X. et al. An “off-on” fluorescein-based colorimetric and fluorescent probe for the detection of glutathione and cysteine over homocysteine and its application for cell imaging. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [S. I.], v. 260, p. 295–302, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.01.013>
- [25] PILLA, V. et al. Lifetime and Fluorescence Quantum Yield of Two Fluorescein-Amino Acid-Based Compounds in Different Organic Solvents and Gold Colloidal Suspensions. **Chemosensors**, [S. I.], v. 6, n. 3, p. 26, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/chemosensors6030026>
- [26] KIM, H. N.; SWAMY, K. M. K.; YOON, J. Study on various fluorescein derivatives as pH sensors. **Tetrahedron Letters**, [S. I.], v. 52, n. 18, p. 2340–2343, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2011.02.076>
- [27] QAISER, D. et al. Novel use of fluorescein dye in detection of oral dysplasia and oral cancer. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [S. I.], v. 31, p. 101824, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101824>
- [28] KIM, J. M. The use of vital dyes in corneal disease. **Current Opinion in Ophthalmology**, [S. I.], v. 11, n. 4, p. 241–247, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00055735-200008000-00005>
- [29] JIANG, X. et al. The target cells of anthocyanins in metabolic syndrome. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. I.], v. 59, n. 6, p. 921–976, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1491022>
- [30] LI, P. et al. Protective effects of anthocyanins on neurodegenerative diseases. **Trends in Food Science & Technology**, [S. I.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.005>.
- [31] TERCI, D. B. L.; ROSSI, A. V. Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução? **Química Nova**, [S. I.], v. 25, n. 4, p. 684–688, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000400026>.
- [32] SHARIF, N.; KHOSHNOUDI-NIA, S.; JAFARI, S. M. Nano/microencapsulation of anthocyanins; a systematic review and meta-analysis. **Food Research International**, [S. I.], v. 132, p. 109077, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109077>
- [33] PASCHOA, A. dos S. **Sensor orgânico, tipo embalagem colorimétrica, para monitoramento de pH de alimentos**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016.
- [34] BELWAL, T. et al. Anthocyanins, multi-functional natural products of industrial relevance: Recent biotechnological advances. **Biotechnology Advances**, [S. I.], v. 43, p. 107600, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107600>

- [35] SAVÓIA, E. J. L. **Potencial de Tradescantia pallida cv. Pupurea para acumular metais pesados oriundos da poluição atmosférica particulada na região do grande ABC paulista**. 2013. Tese (Doutorado). Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2013.
- [36] SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª edição, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2005.
- [37] LENZ, G. **Métodos Fotométricos**. Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.
- [38] DENADAI, P. J. **Apostila de Análise Instrumental**. Escola Técnica Estadual Tiguatira. 2014.
- [39] LIMA, S. **Medidas de parâmetros termo-ópticos e de eficiência quântica da fluorescência em líquidos por interferometria e difração cônica de origem fototérmica**. 2018. 107 f. Dissertação (Pós-graduação em Física). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.14393/ufu.di.2019.346>
- [40] GALO, A.; COLOMBO, M. F. Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa. **Química Nova**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 488-492, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000200036>.
- [41] DIAS, V. M. et al. Caracterização óptica de Bixina extraída de sementes de urucum. **XII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VIII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação**, n. 53, p. 4, 2009.
- [42] DIAS, V. M. et al. Optical Characterization in Annatto and Commercial Colorific. **Journal of Fluorescence**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 415–421, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10895-010-0730-1>
- [43] LUIZ, F. C. L. **Estudos de fluorescência estacionária e resolvida no tempo de anestésicos locais e de antibióticos da classe das fluoroquinolonas**. 2009. 154 f. Tese (Doutorado em Física). Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.17771/PUCRio.acad.15676>.
- [44] BRAUN, R. K. **Síntese e caracterização fotofísica de benzocalcogenodiazolas sililadas**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Trabalho de Conclusão de Curso em Química Industrial). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.
- [45] DOMENEGUETI, J. F. M. et al. Simultaneous measurement of thermo-optic and thermal expansion coefficients with a single arm double interferometer. **Optics Express**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 313–319, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1364/OE.25.000313>.

- [46] LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd. ed. New York, Springer, 2010.
- [47] FERREIRA, E. S. et al. Introdução às espectroscopias de absorção e fluorescência: aplicações farmacêuticas. **Caderno de Física da UEFS**, [S. l.], v. 12, p. 41–55, 2014.
- [48] KAPUSTA, P.; WAHL, M.; ERDMANN, R. **Advanced Photon Counting: Applications, Methods, Instrumentation**. 2015^a. ed. Springer International Publishing, 2015.
- [49] WAHL, M. et al. Application of sub-ns pulsed LEDs in fluorescence lifetime spectroscopy. **Symposium on Integrated Optoelectronic Devices**, San Jose, p. 171–178, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1117/12.462651>.
- [50] PICOQUANT. **TIMEHARP 260**: User's Manual and Technical Data. Berlin: PicoQuant GmbH, p. 72, 2018.
- [51] BECKER, W. **Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Applications**. New York: Springer International Publishing, 2015.
- [52] WAHL, M. **Time-Correlated Single Photon Counting**. Berlin: PicoQuant GmbH, 2014.
- [53] PICOQUANT. **PDL 200-B**: Picosecond pulsed diode laser driver. Berlin: PicoQuant GmbH, 2012. Disponível em: <http://www.kawaska.pl/images/pliki/aparatura/PicoQuant/Sterownik/PDL200-B.pdf>. Acesso em: 6 abr. 2021.
- [54] M.S. Nogueira. **Fluorescence lifetime spectroscopy for diagnosis of clinically similar skin lesions**. 2016. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.76.2016.tde-21102016-103110>.
- [55] PICOQUANT. **FLUOFIT**: User's Manual and Technical Data. Berlin: PicoQuant GmbH. p. 51, 2018.
- [56] BROCHARD, P.; GROLIER-MAZZA, V.; CABANEL, R. Thermal nonlinear refraction in dye solutions: a study of the transient regime. **Journal of the Optical Society of America B**, [S. l.], v. 14, p. 405, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1364/JOSAB.14.000405>.
- [57] LIMA, S. R. de. et al. Fluorescence quantum yield of natural dye extracted from *Tradescantia pallida purpurea* as a function of the seasons: Preliminary bioapplication as a fungicide probe for necrotrophic fungi. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S. l.], v. 200, p. 111631, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111631>.

APÊNDICE A – Medidas de pH para a saliva artificial

Tabela 11. Valor do pH da saliva artificial pura para medidas de dn/dT.

pH nominal	pH 3	pH 5,5	pH 8	pH 8,5
Leitura 1	3,02	4,61	8,16	12,48
Leitura 2	3,04	4,61	8,17	12,49
Leitura 3	3,05	4,62	8,16	12,48
Leitura 4	3,05	4,61	8,14	12,49
Leitura 5	3,06	4,61	8,13	12,5
Leitura 6	3,06	4,61	8,12	12,49
Leitura 7	3,06	4,61	8,11	12,49
Leitura 8	3,06	4,61	8,1	12,5
Leitura 9	3,07	4,61	8,08	12,49
Leitura 10	3,08	4,61	8,07	12,5
pH médio	3,06	4,61	8,12	12,49
DPA	0,02	0,01	0,03	0,01

Fonte: Autor.

Tabela 12. Medida de pH para as salivas artificiais que foram usadas nas amostras de fluoresceína.

pH nominal	pH 3	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 10	pH 12
Leitura 1	3,51	5,63	6,39	7,92	8,31	8,94	11,9
Leitura 2	3,52	5,62	6,4	7,92	8,29	8,97	11,86
Leitura 3	3,53	5,63	6,39	7,91	8,3	8,96	11,89
Leitura 4	3,54	5,64	6,4	7,92	8,29	8,97	11,9
Leitura 5	3,56	5,64	6,43	7,93	8,3	8,97	11,89
Leitura 6	3,57	5,65	6,45	7,94	8,3	8,97	11,88
Leitura 7	3,57	5,64	6,46	7,94	8,3	8,97	11,89
Leitura 8	3,58	5,65	6,45	7,95	8,3	8,98	11,87
Leitura 9	3,58	5,65	6,46	7,96	8,31	8,96	11,89
Leitura 10	3,58	5,65	6,47	7,97	8,31	8,97	11,88
pH médio	3,55	5,64	6,43	7,94	8,30	8,97	11,89
DPA	0,03	0,01	0,03	0,02	0,01	0,01	0,01

Fonte: Autor.

Tabela 13. Medida de pH para as salivas artificiais usadas com o corante natural (antocianina).

pH nominal	pH 3	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 10	pH 12
Leitura 1	3,74	5,63	6,3	7,95	8,44	8,94	11,9
Leitura 2	3,74	5,64	6,32	7,96	8,45	8,97	11,86
Leitura 3	3,74	5,65	6,37	7,97	8,44	8,96	11,89
Leitura 4	3,76	5,66	6,41	7,98	8,43	8,97	11,9
Leitura 5	3,76	5,66	6,43	7,99	8,44	8,97	11,89
Leitura 6	3,77	5,67	6,44	8	8,45	8,97	11,88
Leitura 7	3,77	5,68	6,45	8,01	8,45	8,97	11,89
Leitura 8	3,77	5,69	6,46	8,02	8,45	8,98	11,87
Leitura 9	3,77	5,69	6,47	8,01	8,45	8,96	11,89
Leitura 10	3,77	5,7	6,48	8,02	8,45	8,97	11,88
pH médio	3,77	5,70	6,49	8,02	8,45	8,97	11,89
DPA	0,01	0,02	0,06	0,03	0,01	0,01	0,01

Fonte: Autor.

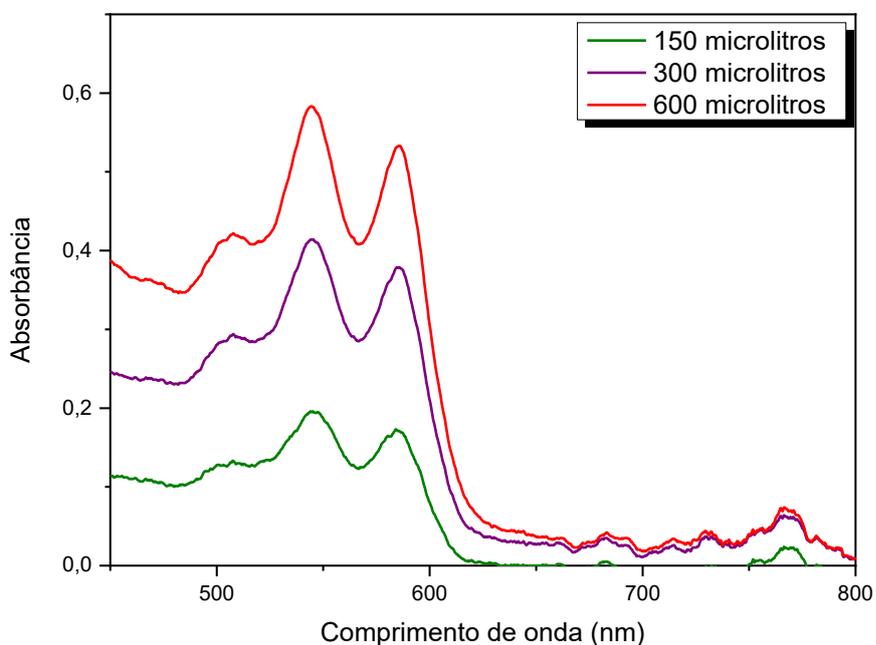
APÊNDICE B – Antocianina diluída em água

Tabela 14. Medida de pH para as diferentes amostras de Antocianina diluída em água destilada. Em que M1 é amostra de 150 μL (concentração de 25 mg/mL); M2 é a amostra de 300 μL (concentração de 50 mg/mL) e M3 referente a amostra de 600 μL (concentração de 83 mg/mL).

Amostra	M1	M2	M3	Água destilada
Leitura 1	6,10	5,96	5,98	4,84
Leitura 2	6,11	6,00	5,98	4,84
Leitura 3	6,08	6,01	5,98	4,85
Leitura 4	6,08	6,02	5,98	4,95
Leitura 5	6,08	6,03	5,98	4,96
Leitura 6	6,09	6,04	5,98	4,91
Leitura 7	6,09	6,05	5,98	4,92
Leitura 8	6,09	6,05	5,98	4,97
Leitura 9	6,09	6,06	5,98	4,98
Leitura 10	6,09	6,06	5,98	4,99
pH médio	6,09	6,03	5,98	4,92
DPA	0,01	0,03	0,00	0,06

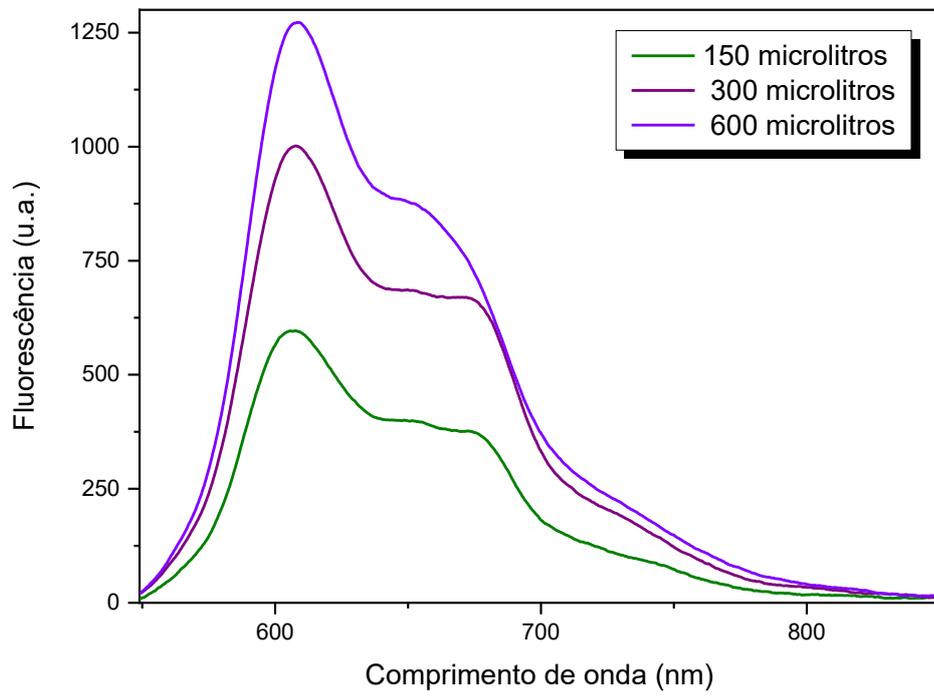
Fonte: Autor.

Figura 39. Medida de absorção para a antocianina diluída em água destilada para as três concentrações.



Fonte: Autor.

Figura 40. Fluorescência da antocianina diluída em água destilada para as três concentrações.



Fonte: Autor.

APÊNDICE C – Medida de pH para as amostras de antocianina diluída em saliva artificial em diferentes concentrações de antocianina.

Figura 41. Amostra com 150 μ L de antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial com concentração de 25 mg/mL.



Fonte: Autor.

Tabela 15. Medida de pH para a amostra de 150 μ L de antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial com concentração de 25 mg/mL.

pH nominal	pH 3	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 10	pH 12
Leitura 1	3,88	5,8	6,36	7,19	7,79	8,22	10,05
Leitura 2	3,89	5,79	6,28	7,21	7,8	8,29	10,06
Leitura 3	3,88	5,81	6,29	7,21	7,79	8,3	10,09
Leitura 4	3,89	5,83	6,3	7,22	7,8	8,32	10,1
Leitura 5	3,89	5,84	6,32	7,24	7,81	8,33	10,09
Leitura 6	3,88	5,85	6,33	7,24	7,82	8,34	10,1
Leitura 7	3,89	5,86	6,34	7,25	7,82	8,34	10,09
Leitura 8	3,89	5,87	6,35	7,24	7,81	8,35	10,08
Leitura 9	3,88	5,87	6,35	7,25	7,82	8,35	10,07
Leitura 10	4,88	5,87	6,36	7,25	7,82	8,35	10,1
pH médio	3,89	5,84	6,33	7,23	7,81	8,32	10,08
DPA	0,01	0,03	0,03	0,02	0,01	0,04	0,02

Fonte: Autor.

Figura 42. Amostra de 300 μ L de antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial com concentração de 50 mg/mL.



Fonte: Autor.

Tabela 16. Medida de pH para amostra de 300 μ L de antocianina diluída em 4mL de saliva artificial com concentração de 50 mg/mL.

pH nominal	pH 3	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 10	pH 12
Leitura 1	3,72	5,76	6,09	6,60	7,09	7,70	9,67
Leitura 2	3,75	5,77	6,10	6,61	7,10	7,72	9,68
Leitura 3	3,76	5,78	6,11	6,67	7,15	7,77	9,67
Leitura 4	3,78	5,80	6,13	6,69	7,15	7,78	9,66
Leitura 5	3,79	5,81	6,14	6,70	7,16	7,79	9,67
Leitura 6	3,80	5,82	6,15	6,70	7,16	7,80	9,69
Leitura 7	3,81	5,82	6,16	6,71	7,16	7,82	9,70
Leitura 8	3,81	5,83	6,17	6,70	7,16	7,83	9,72
Leitura 9	3,82	5,84	6,17	6,71	7,16	7,83	9,71
Leitura 10	3,83	5,85	6,18	6,71	7,16	7,84	9,70
pH médio	3,79	5,81	6,14	6,68	7,15	7,79	9,69
DPA	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03	0,05	0,02

Fonte: Autor.

Figura 43. Amostra de 600 μ L de antocianina diluída em 6 mL de saliva artificial com concentração de 83 mg/mL.



Fonte: Autor.

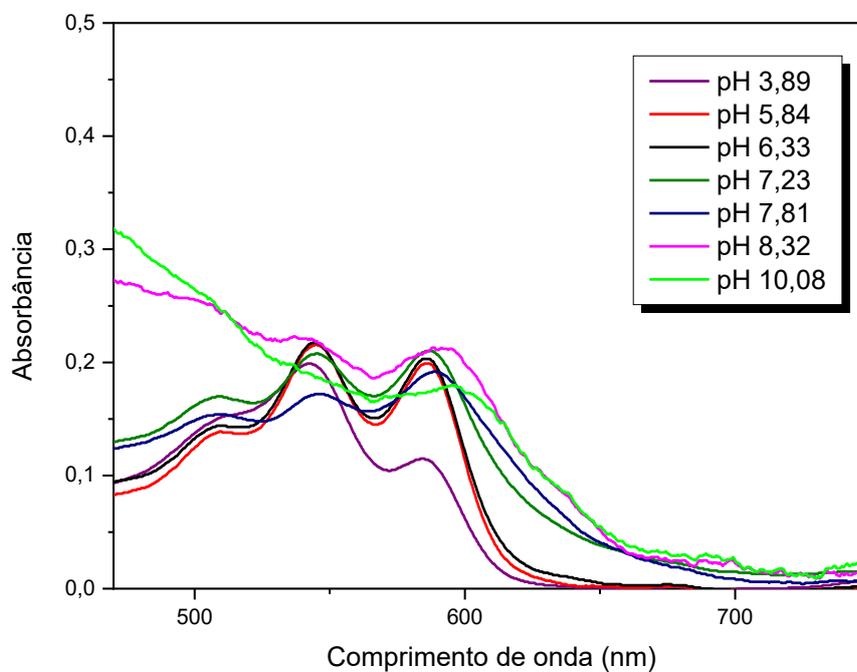
Tabela 17. Medidas de pH para 600 μ L de antocianina diluída em 6 mL de saliva artificial com concentração de 83 mg/mL.

pH nominal	pH 3	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 10	pH 12
Leitura 1	3,88	5,81	6,15	6,55	6,92	7,88	10,03
Leitura 2	3,89	5,82	6,16	6,56	6,93	7,88	10,02
Leitura 3	3,89	5,83	6,17	6,58	6,93	7,89	10,03
Leitura 4	3,90	5,86	6,17	6,59	6,94	7,89	10,02
Leitura 5	3,90	5,87	6,17	6,59	6,94	7,89	10,03
Leitura 6	3,90	5,87	6,17	6,59	6,95	7,89	10,04
Leitura 7	3,90	5,87	6,18	6,59	6,96	7,89	10,03
Leitura 8	3,91	5,88	6,18	6,59	6,97	7,89	10,02
Leitura 9	3,91	5,88	6,18	6,59	6,97	7,89	10,02
Leitura 10	3,91	5,88	6,18	6,59	6,97	7,89	10,01
pH médio	3,90	5,85	6,17	6,58	6,95	7,89	10,03
DPA	0,01	0,03	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01

Fonte: Autor.

APÊNDICE D – Espectros de absorção e fluorescência para as amostras de diferentes concentrações de antocianina.

Figura 44. Absorbância para a amostra de 150 μL de antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial com concentração de 25 mg/mL.



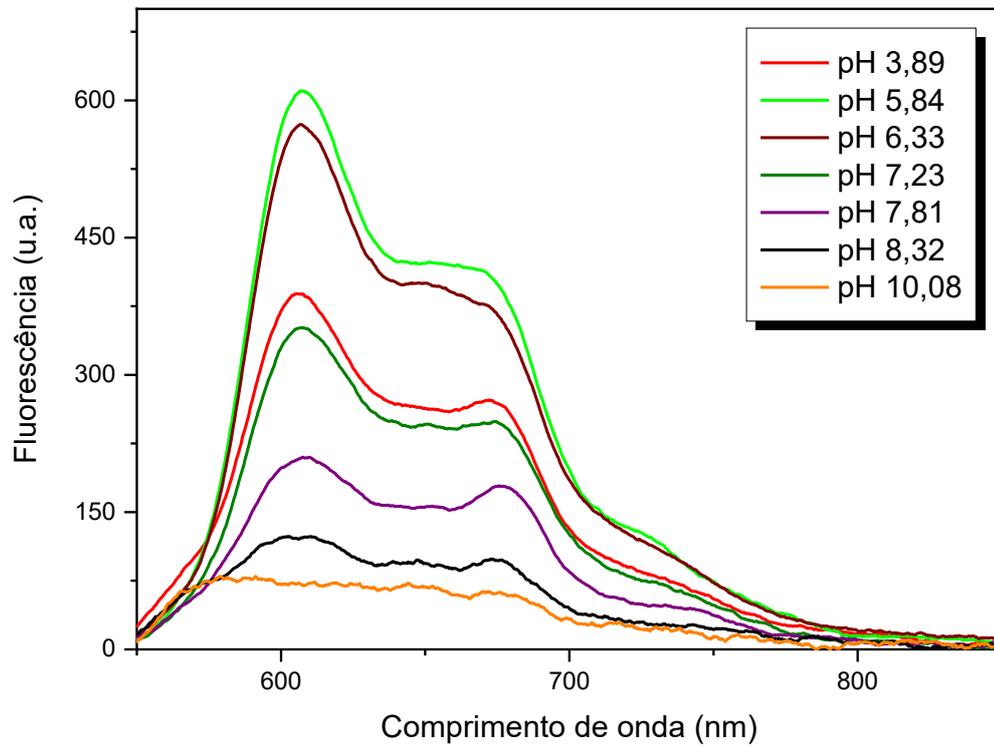
Fonte: Autor.

Tabela 18. Concentração e propriedades ópticas de 150 μL antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial em diferentes pHs com concentração de 25 mg/mL.

Amostras	$C(\text{g/mL})$	$\alpha(\text{cm}^{-1})$	V/IV (%)	$\langle \lambda_{em} \rangle$ (nm)
pH 3,89	0,05	0,437	11,58	648,83
pH 5,84	0,05	0,391	76,06	648,68
pH 6,33	0,05	0,403	77,61	647,94
pH 7,23	0,05	0,412	105,26	647,31
pH 7,81	0,05	0,354	233,3	649,16
pH 8,32	0,05	0,566	--	646,49
pH 10,08	0,05	0,486	--	638,66

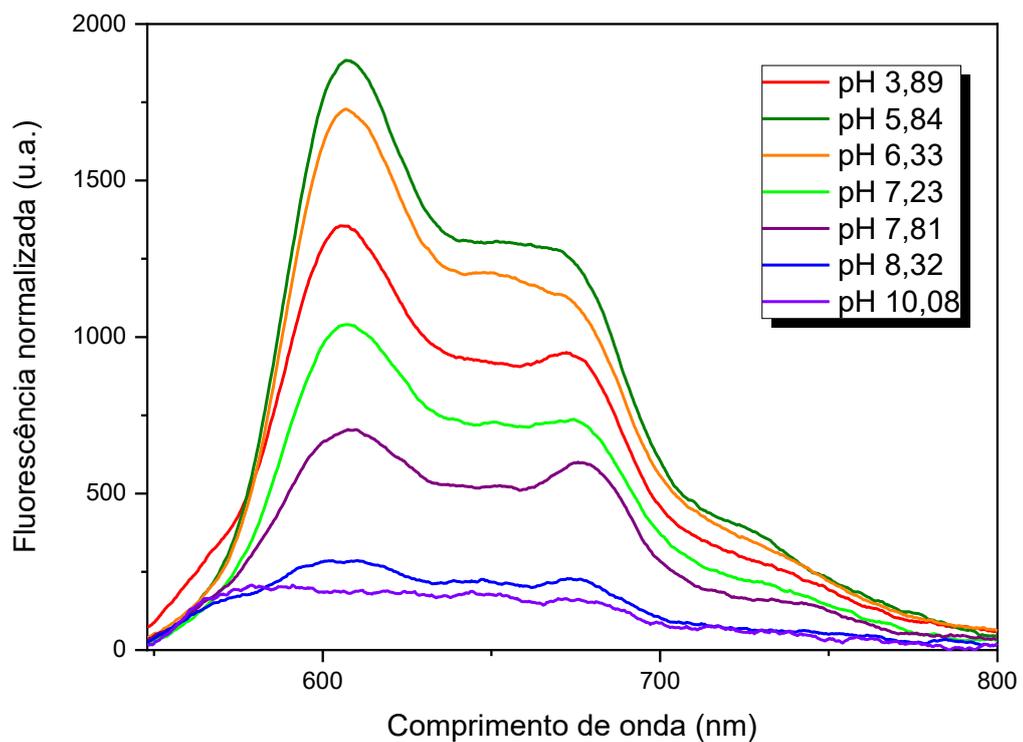
Fonte: Autor.

Figura 45. Fluorescência para a amostra de 150 μL de antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial com concentração de 25 mg/mL.



Fonte: Autor.

Figura 46. Fluorescência normalizada para a amostra de 150 μL de antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial com concentração de 25 mg/mL.



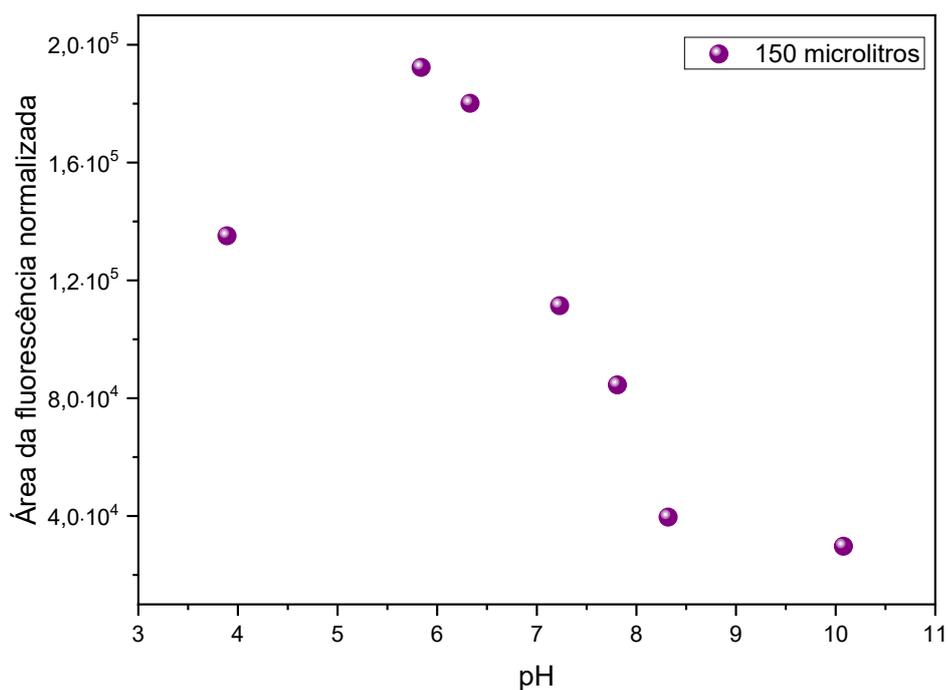
Fonte: Autor.

Tabela 19. Comprimento de onda de emissão média de 150 μL antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial em diferentes pHs com concentração de 25 mg/mL.

Amostras	$\langle \lambda_{em} \rangle$ (nm)
pH 3,89	648,83
pH 5,84	648,68
pH 6,33	647,94
pH 7,23	647,31
pH 7,81	649,16
pH 8,32	646,49
pH 10,08	638,66

Fonte: Autor.

Figura 47. Área da fluorescência normalizada (u.a.) em função do pH para 150 μL antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial em diferentes pHs com concentração de 25 mg/mL.



Fonte: Autor.

Figura 48. Absorbância da amostra de 600 μL de Antocianina diluída em 6 mL de saliva artificial com concentração de 83 mg/mL.

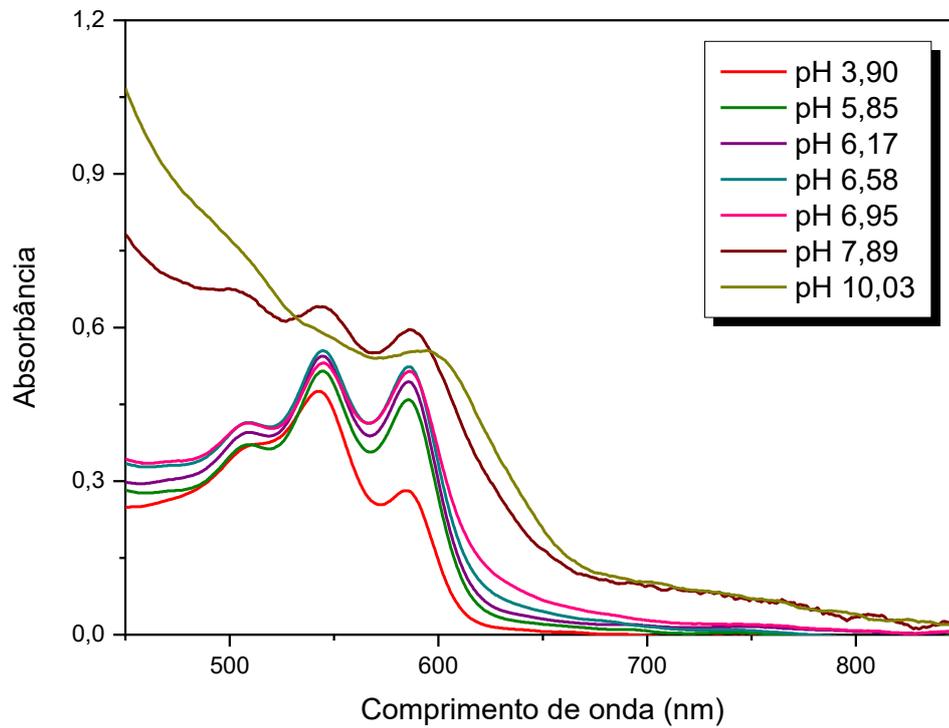


Tabela 20. Concentração e propriedades ópticas das soluções de 600 μL antocianina diluída em 6 mL de saliva artificial.

Amostras	$C(\text{g/mL})$	$\alpha(\text{cm}^{-1})$	V/IV (%)	$\langle \lambda_{em} \rangle (\text{nm})$
pH 3,90	0,083	0,983	12,21	651,87
pH 5,85	0,083	0,981	64,56	648,61
pH 6,17	0,083	1,041	67,95	646,99
pH 6,58	0,083	1,068	77,46	650,26
pH 6,95	0,083	1,034	89,43	648,07
pH 7,89	0,083	1,43	47,67	646,68
pH 10,03	0,083	1,421	30,61	640,86

Fonte: Autor.

Figura 49. Fluorescência para a amostra de 600 μL de antocianina diluída em 6 mL de saliva artificial com concentração de 83 mg/mL.

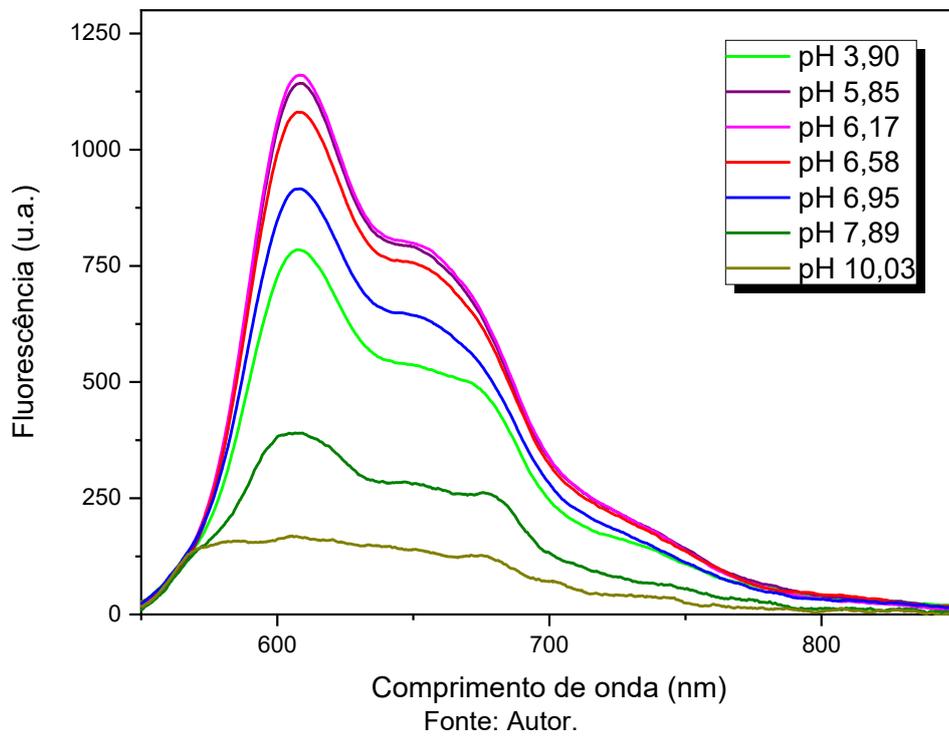


Figura 50. Fluorescência normalizada para a amostra de 600 μL de antocianina diluída em 6 mL de saliva artificial com concentração de 83 mg/mL.

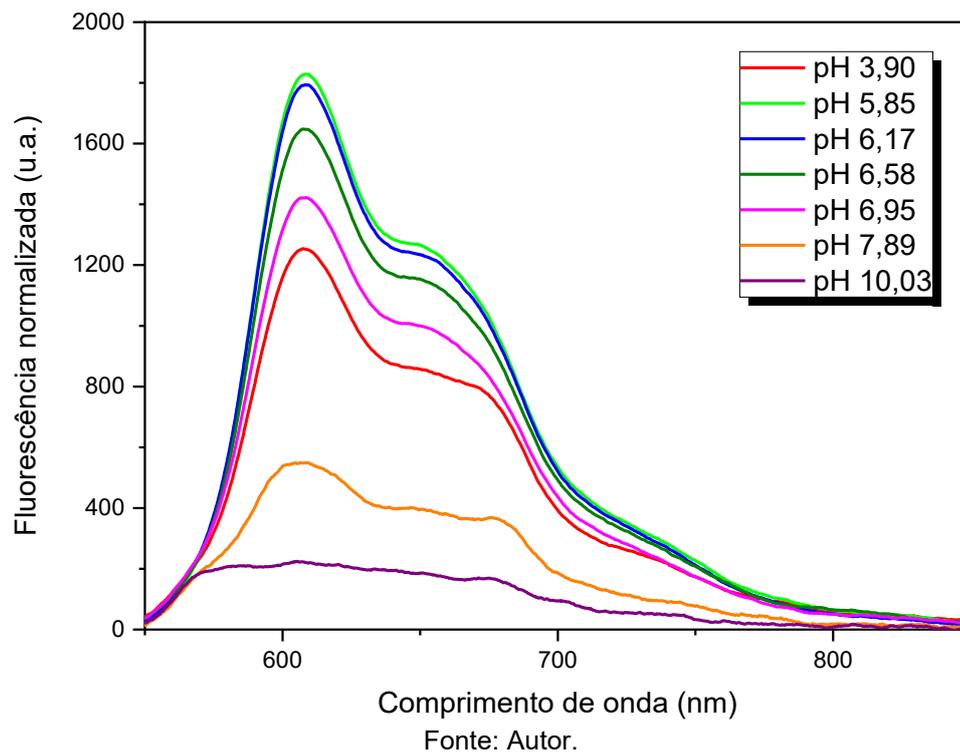
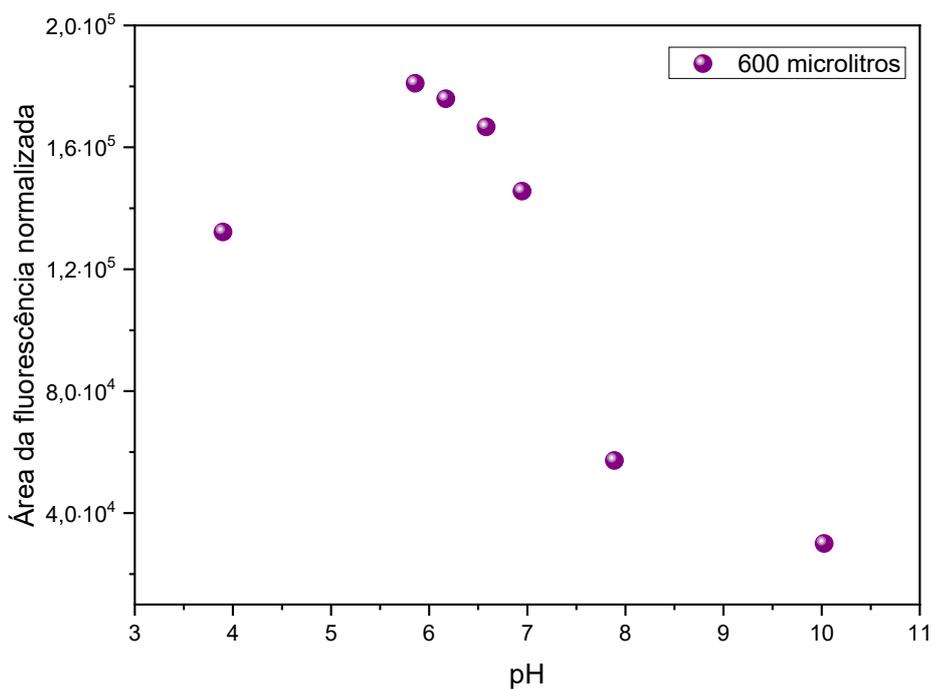


Tabela 21. Comprimento de onda de emissão média de 600 μL antocianina diluída em 6 mL de saliva artificial em diferentes pHs com concentração de 83 mg/mL.

Amostras	$\langle \lambda_{em} \rangle$ (nm)
pH 3,90	651,87
pH 5,85	648,61
pH 6,17	646,99
pH 6,58	650,26
pH 6,95	648,07
pH 7,89	646,68
pH 10,03	640,86

Fonte: Autor.

Figura 51. Área da fluorescência normalizada (u.a.) em função do pH para 600 μL antocianina diluída em 6 mL de saliva artificial.



Fonte: Autor.