



LEONARDO NORONHA MILAGRES SILVA

**CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DE SOLUÇÕES FLUORESCENTES
INSERIDAS EM SALIVAS ARTIFICIAIS PARA BIOAPLICAÇÕES**

**Uberlândia
2024**

LEONARDO NORONHA MILAGRES SILVA

**CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DE SOLUÇÕES FLUORESCENTES
INSERIDAS EM SALIVAS ARTIFICIAIS PARA BIOAPLICAÇÕES**

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Viviane Pilla

**Uberlândia
2024**

LEONARDO NORONHA MILAGRES SILVA

**CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DE SOLUÇÕES FLUORESCENTES
INSERIDAS EM SALIVAS ARTIFICIAIS PARA BIOAPLICAÇÕES**

Banca Examinadora:

Orientadora: Prof^a. Dra. Viviane Pilla

Membro: Prof^a. Dra. Ana Paula Perini

Membro: Prof. Dr. Acácio A. Andrade

**Uberlândia
2024**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão, primeiramente a Deus, que sempre me sustentou. Somente ele é digno de toda honra e glória, pois se estou aqui até hoje, é devido a Sua proteção e luz.

Agradeço à minha família, meu pai Sebastião, minha mãe Eliane e meu irmão Hélio, que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram durante toda a minha caminhada acadêmica, sempre foram minha força e inspiração. Quero expressar meu amor e minha imensa gratidão.

À minha namorada Mariana e seus pais, por toda motivação e apoio neste processo, foram fundamentais.

À Profa. Dra. Viviane Pilla, minha orientadora de trabalho de conclusão de curso, agradeço por todos os ensinamentos, por todo amparo durante as pesquisas e execução do trabalho.

Aos meus amigos que conheci durante a graduação, principalmente Caio e Walter. Sempre compartilhamos sucessos e desafios, foram fonte de incentivo.

Ao laboratório do grupo de Propriedades Ópticas e Térmicas de Materiais (GPOTM) do INFIS-UFU pela oportunidade de participação junto ao grupo e por todos os aprendizados que a mim foram passados.

Gratidão por tudo.

RESUMO

Neste trabalho são apresentadas as caracterizações ópticas de soluções fluorescentes inseridas em salivas artificiais com diferentes valores de potencial hidrogeniônico ($\text{pH} \sim 3,2 - 11,5$). Foram realizadas medidas espectroscopia de absorbância, fluorescência, tempo de vida e FTIR (Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier) das soluções fluorescentes de fluoresceína, antocianina e nanopartículas de carbono inseridas em salivas artificiais. A escolha da saliva como objeto de pesquisa é devido à sua relevância em diversas funções corporais, incluindo lubrificação, mastigação, deglutição e digestão. Além disso, a saliva é capaz de refletir o estado fisiológico e patológico do corpo, sendo que seu pH serve como indicador para determinadas doenças. O propósito deste estudo é avaliar os corantes fluorescentes, como a fluoresceína e antocianina, bem como as nanopartículas de carbono, como potenciais biossensores dependentes do pH, visando o diagnóstico de doenças, dada a variabilidade do pH da saliva humana em situações patológicas.

Palavras-chave: Potencial Hidrogeniônico. Fluoresceína. Antocianina. Nanopartículas de Carbono. Saliva Artificial. Fluorescência. Absorbância. Tempo de Vida de Fluorescência. Patologia. Biossensores. Espectroscopia.

ABSTRACT

In this work, the optical characterizations of fluorescent solutions are presented inserted into artificial saliva, with different hydrogen potential values (pH ~ 3.2 – 11.5). Spectroscopy measurements of absorbance, fluorescence, lifetime, and FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) of fluorescent solutions of fluorescein, anthocyanin and carbon nanoparticles inserted into artificial saliva were carried out. The choice of saliva as a research is due to its relevance in various bodily functions, including lubrication, chewing, swallowing, and digestion. Additionally, saliva is capable of reflecting the physiological and pathological state of the body, with their pH serves as an indicator for certain diseases. The purpose of this study is to evaluate fluorescent dyes, such as fluorescein and anthocyanin, as well as carbon dots, as potential pH-dependent biosensors, aiming for disease diagnosis, given the variability of the pH of human saliva in pathological situations.

Keywords: Hydrogenionic Potential. Fluorescein. Anthocyanin. Carbon dots. Artificial Saliva. Fluorescence. Absorbance. Fluorescence Lifetime. Pathology. Biosensors. Spectroscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Escala de pH. Adaptado de [2].....	16
Figura 2. Fórmula estrutural do corante fluoresceína. Adaptado de [4].....	17
Figura 3. Estrutura química das antocianinas. Adaptado de [7].	18
Figura 4. Esquema dos eventos que se desenrolam quando um feixe de radiação eletromagnética atinge uma célula contendo uma solução absorvente. Adaptado de [10].	20
Figura 5. Representação da absorção de luz por uma amostra em função da distância percorrido por um feixe de luz no interior da amostra. Adaptado de [10].	22
Figura 6. Diagrama de Jablonski. Adaptado de [13].....	24
Figura 7. Equipamento de AFM da Universidade Federal de Uberlândia, UFU.	27
Figura 8. Configuração do sistema TCSPC. Adaptado de [26].	29
Figura 9. Espectro de absorbância para as salivas artificiais puras.....	31
Figura 10. Espectro de FTIR para as salivas artificiais puras.	32
Figura 11. Salivas artificiais com fluoresceína, no qual o frasco (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) e (h) correspondem aos valores de pH nominal 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 12 respectivamente.	33
Figura 12. Espectro de absorção para 182 µL de fluoresceína inserida em 14 mL de saliva artificial (concentração 0,3 mg/mL).	33
Figura 13. Espectro de fluorescência para 182 µL de fluoresceína inserida em 14 mL de saliva artificial (concentração 0,3 mg/mL).	34
Figura 14. Espectro de FTIR para 182 µL de fluoresceína inserida em 14 mL de saliva artificial (concentração 0,3 mg/mL).	36
Figura 15. Salivas artificiais com antocianina, no qual o frasco (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) e (h) correspondem aos valores de pH nominal 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 12, respectivamente.	37
Figura 16. Espectro de absorção para 1050 µL de antocianina inserida em 14 mL de saliva artificial (concentração 0,4 g/mL).	37
Figura 17. Espectro de fluorescência para 1050 µL de antocianina inserida em 14 mL de saliva artificial (concentração 0,4 g/mL).	38
Figura 18. Espectro de FTIR para 1050 µL de antocianina inserida em 14 mL de saliva artificial (concentração 0,4 g/mL).	40
Figura 19. Salivas artificiais com nanopartículas de carbono, no qual o frasco (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) e (h) correspondem aos valores de pH nominal 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 12 respectivamente.....	41

Figura 20. Imagem topográfica de AFM da nanopartícula de carbono.....	41
Figura 21. Espectro de absorbância para as salivas artificiais com nanopartículas de carbono com concentração de 0,4 g/mL diluída em 10 mL de saliva.	42
Figura 22. Espectro de fluorescência para as salivas artificiais com nanopartículas de carbono com concentração de 0,4 g/mL diluída em 10 mL de saliva.	42
Figura 23. Espectro de FTIR para as salivas artificiais com nanopartículas de carbono com concentração de 0,4 g/mL diluída em 10 mL de saliva.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Potencial hidrogeniônico das salivas artificiais.	30
Tabela 2. Valores de pH e picos de absorção fluoresceína inseridas em salivas (concentração de 0,3 mg/mL).	35
Tabela 3. Propriedades ópticas de 182 µL fluoresceína diluída em 14 mL de saliva artificial em diferentes pHs (concentração 0,3 mg/mL, $\lambda = 460\text{ nm}$).	35
Tabela 4. Propriedades ópticas de 1050 µL antocianina diluída em 14 mL de saliva artificial em diferentes pHs (concentração 0,4 g/mL, $\lambda = 532\text{ nm}$).	39
Tabela 5. Propriedades ópticas de 200 µL antocianina diluída em 10 mL de saliva artificial em diferentes pHs (concentração 0,4 g/mL, $\lambda = 532\text{ nm}$).	44
Tabela 6. 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). Medido pelo grupo GPOTM.	45
Tabela 7. 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). Medido pelo grupo GPOTM.	45
Tabela 8. Tabela com os respectivos parâmetros de ajustes para 200 µL nanopartícula diluída em 10 mL de saliva artificial em diferentes pHs (concentração 0,4 g/mL).	46

LISTA DE SÍMBOLOS

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 - Coeficiente de absorção da amostra

I_0 - Intensidade do feixe incidente

I - Intensidade do feixe transmitido

τ - Tempo de vida da fluorescência

Sumário

INTRODUÇÃO	12
OBJETIVOS	13
1 CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS.....	14
1.1 Salivas Naturais e Artificiais	14
1.2 Potencial de Hidrogênio	15
2 AMOSTRAS INVESTIGADAS	16
2.1 Corantes e nanopartículas de carbono	16
2.1.1 Fluoresceína.....	17
2.1.2 Antocianina	17
2.1.3 Nanopartículas de Carbono	18
3 TÉCNICAS EXPERIMENTAIS	19
3.1 Absorbância	19
3.1.1 Coeficiente de Absorção Óptica.....	21
3.2 Fluorescência.....	23
3.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	24
3.4 Microscopia de Força Atômica (AFM)	26
3.5 Tempo de Vida de Fluorescência.....	28
3.5.1 Técnica contagem de fóton único resolvida no tempo (TCSPC)	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	30
4.1 Análises dos resultados obtidos das amostras estudadas neste trabalho	30
4.1.1 Salivas Puras.....	31
4.1.2 Fluoresceína	32
4.1.3 Antocianina	36
4.1.4 Nanopartículas de Carbono	41
4.1.5 Tempo de Vida.....	44
5 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS.....	48

INTRODUÇÃO

Tradicionalmente, um método amplamente utilizado em laboratórios para diagnóstico clínico é a análise do sangue. Porém, é visto que esse método é invasivo e frequentemente causa desconforto e dor aos pacientes. Assim, o emprego da saliva como fonte de diagnóstico vem sendo amplamente adotado em clínicas e laboratórios. Além de oferecer resultados satisfatórios e precisos, o uso da saliva é rápido e não invasivo na obtenção dos resultados.

Este trabalho apresentará as caracterizações espectroscópicas e ópticas de várias soluções fluorescentes inseridas em salivas artificiais em função do pH. Os pigmentos fluorescentes incluirão corantes naturais e nanopartículas de carbono, que serão inseridos em salivas artificiais com diferentes valores de potencial de hidrogênio. Foram realizadas medidas espectroscópicas de absorção e fluorescência, bem como outras técnicas ópticas, como a espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e medidas de tempo de vida de fluorescência.

Espectroscopia de absorbância e fluorescência são técnicas analíticas e luminosas que tem desempenhado um papel revolucionário nas ciências biomédicas e na pesquisa médica. Ao explorar os aspectos moleculares ocultos e possibilitar uma diversidade de aplicações, estas se destacam como umas ferramentas inestimáveis neste trabalho.

Este estudo visa fornecer uma compreensão mais profunda das propriedades ópticas dessas soluções fluorescentes inseridas em salivas artificiais, com foco na análise dos resultados com diferentes variações de pH. Essas investigações têm o potencial de contribuir significativamente para o desenvolvimento de biossensores e métodos de diagnóstico mais precisos e sensíveis, considerando que o pH da saliva é um indicador crucial de condições médicas subjacentes.

OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é realizar as caracterizações espectroscópicas (absorção e fluorescência), medidas de FTIR e medidas de tempo de vida de corantes e/ou nanopartículas de carbono fluorescentes inseridas em saliva artificial em diferentes valores de pH. Desta forma, determinar qual solução fluorescente (corante natural ou nanopartículas) são mais sensíveis a variação de pH, bem como a técnica óptica mais adequada para detectar a variação de seus parâmetros em função da modificação de pH. Desta forma, possibilitando uma possível aplicação como biossensor para diagnósticos de doenças, visto que o pH da saliva pode se alterar em caso de patologias.

1. CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

Neste capítulo são apresentados os conceitos importantes para o entendimento de saliva e sobre potencial hidrogeniônico.

1.1 Salivas Naturais e Artificiais

A saliva apresenta diversas funções na cavidade oral, sendo as principais a limpeza física de detritos, digestão do bolo alimentar, lubrificação, manutenção da integridade da mucosa, neutralização dos ácidos, ação antimicrobiana etc.

Na saliva, mesmo que em menor concentração em comparação ao sangue, encontram-se alguns dos constituintes presentes no plasma sanguíneo, como ácido desoxirribonucleico, ácido ribonucleico, proteínas, hormônios, metabólitos, anticorpos e outros elementos bioquímicos. Entretanto, a concentração mais baixa dos marcadores biológicos na saliva, juntamente com a viscosidade e os riscos potenciais de contaminação bacteriana durante o armazenamento e transporte, limitam a coleta da amostra de saliva e sua utilização como meio de diagnóstico.

A saliva natural é uma mistura complexa que contém uma variabilidade de funções, torna-se muito difícil recriá-la através de meios artificiais. Uma saliva artificial ideal deve apresentar longa durabilidade, capacidade de proporcionar lubrificação suficiente para manter os tecidos orais húmidos e protegidos da agressão químico-mecânica. Até hoje, ainda não se conseguiu criar nenhum tipo de saliva artificial que reúna todas estas características ideais. Porém com estudos cada vez mais avançados, deseja-se encontrar soluções para o desenvolvimento de salivas artificiais cada vez mais próximas da saliva natural.

A saliva artificial geralmente consiste numa solução aquosa de sais minerais encontrados na saliva humana, como o fosfato e o cálcio, que participam em processos fundamentais para a cavidade oral. As salivas artificiais atualmente comercializadas são baseadas em carboximetilcelulose (CMC), carboximetilcelulose de sódio (SCMC) e hidroxietilcelulose como agentes espessantes e lubrificantes.

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.

1.2 Potencial de Hidrogênio

O pH representa uma escala que indica a acidez ou alcalinidade de uma substância, variando de 0 a 14. O nível mais ácido é zero, o mais alcalino é 14, e 7 é considerado neutro. Esses valores são determinados usando a água como referência, sendo o pH 7 o ponto neutro na água pura. Isso representa um equilíbrio ideal, embora, como será apresentado posteriormente, esse valor preciso nunca é atingido no corpo humano.

A água em sua forma mais pura é a única substância com um pH verdadeiramente neutro. Substâncias ácidas são comuns de ser encontrar no cotidiano, como por exemplo, vinho, vinagre e frutas. Por outro lado, as substâncias alcalinas, podem ser exemplificadas como água do mar ou antiácidos estomacais. O equilíbrio total com um pH de 7 é impossível para o nosso organismo. Por exemplo, o sangue humano é ligeiramente alcalino, com um pH acima de 7, enquanto a saliva normalmente tem um pH entre 5,6 e 7,9, sendo geralmente ácida [1].

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 [1]:



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 [1]:

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

Para análise, existe uma escala de pH conforme Figura 1 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 .

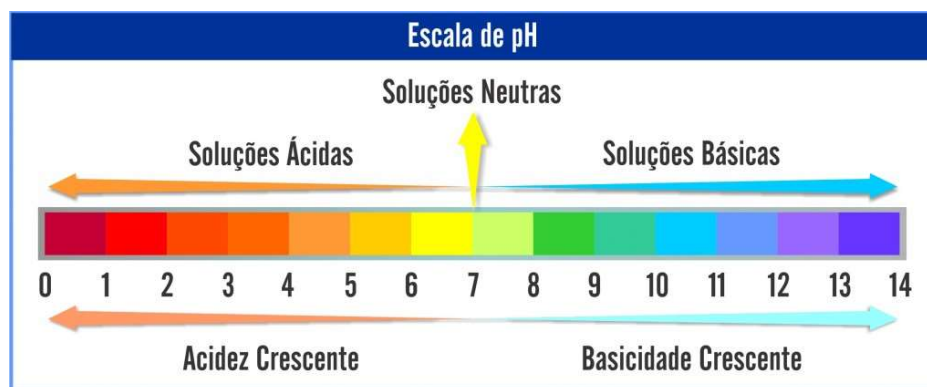


Figura 1. Escala de pH. Adaptado de [2].

Além de existirem várias formas e materiais para detecção de valores de pH, as técnicas espectroscópicas, como absorção, fluorescência e tempo de vida de fluorescência, também são estudadas e utilizadas para essa finalidade. Devido a propriedade das amostras utilizadas apresentarem cores diferentes, dependendo do pH e do meio em que elas se encontram, fazendo com que estes pigmentos possam ser utilizados como indicadores naturais de pH.

Após obter as salivas artificiais para este trabalho, com valores de diferentes pH ~3 -12, foram aferidos os valores de pH de cada saliva com um pHmetro (Hanna HI 2221).

2. AMOSTRAS INVESTIGADAS

Neste capítulo serão abordados os processos de extrações e sínteses das soluções fluorescentes caracterizadas neste trabalho: Fluoresceína; Antocianina e nanopartículas de carbono.

2.1 Corantes e nanopartículas de carbono

O corante natural caracterizado neste estudo foi extraído da planta *Tradescantia pallida purpúrea*, e as nanopartículas de carbono foram sintetizadas da mesma planta como fonte de carbono em meios aquosos. Nanopartículas de carbono têm sido aplicadas como marcadores de células e tecidos devido às suas propriedades fluorescentes na região visível [3]. O corante natural e nanopartículas de carbono utilizados nesta pesquisa foi extraído e/ou sintetizado pelo Grupo de Propriedades Ópticas e Térmicas de Materiais (GPOTM) da Universidade Federal de Uberlândia. A fluoresceína caracterizada foi preparada em etanol e descrita posteriormente.

2.1.1 Fluoresceína

A fluoresceína, por sua vez, é um corante xanteno, não tóxico e altamente fluorescente. Foi sintetizada pela primeira vez por Von Bayor em 1871 e é conhecida na sua forma de sal sódico, como uranina ($C_{20}H_{10}O_5Na_2$) ou fluoresceína sódica.

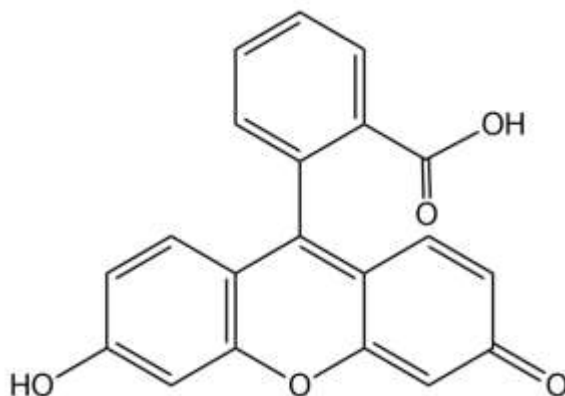


Figura 2. Fórmula estrutural do corante fluoresceína. Adaptado de [4].

A fluoresceína é uma substância fluorescente. O princípio da fluorescência está na absorção de energia luminosa de raios ultravioletas (UV), sem dissipação de energia ou decomposição molecular [5]. A fluoresceína produz coloração verde fluorescente que é ativada pela absorção de luz azul ultravioleta, na presença de hidróxido de sódio. Sua fluorescência máxima ocorre na faixa de absorção de luminosidade de luz (360-400 nm), que causa a excitação de elétrons na molécula da fluoresceína, promovendo assim uma intensa fluorescência de coloração dourado-esverdeado em ~ 560 nm [5].

2.1.2 Antocianina

O termo antocianina é de origem grega (anthos, uma flor, e kyanos, azul escuro). Após a clorofila, as antocianinas são o mais importante grupo de pigmentos de origem vegetal [6]. Compõem o maior grupo de pigmentos solúveis em água do reino vegetal e são encontradas em maior quantidade nas angiospermas [6].

As funções desempenhadas pelas antocianinas nas plantas são variadas, como antioxidantes, proteção à ação da luz, mecanismo de defesa e função biológica. As cores vivas e intensas que elas produzem têm um papel importante em vários mecanismos reprodutores das plantas, tais como a polinização e a dispersão de sementes. A estrutura

química básica das antocianinas é baseada em uma estrutura policíclica de quinze carbonos, mostrada na Figura 3.

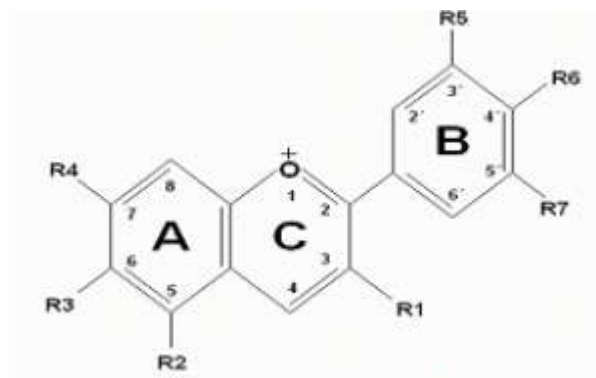


Figura 3. Estrutura química das antocianinas.
Adaptado de [7].

A sensibilidade ao pH é o principal fator limitante no processamento e utilização das antocianinas, afetando a cor e a estabilidade química. Em soluções ácidas, a antocianina é vermelha, mas com o aumento do pH a intensidade de cor diminui. Em solução alcalina, a cor azul é obtida, porém é instável [8]. Esta instabilidade foi observada por JACKMAN et al. (1987) quando do tratamento com calor ou devido ao armazenamento em que a antocianina manifestou mudança da pigmentação do azul para o amarelo.

2.1.3 Nanopartículas de Carbono

As nanopartículas de carbono (NPsC), também conhecidas como Carbon Dots (CDots), representam uma classe inovadora de materiais de carbono solúveis em água, altamente fluorescentes e com diâmetros em torno de 10 nm. Originadas pela primeira vez em 2004 através da purificação de nanotubos de carbono de parede única, estas nanoestruturas abriram caminho para uma série de métodos de síntese desenvolvidos, caracterizações e aplicações [3].

Além de suas características fundamentais, as NPsC exibem propriedades ópticas e eletrônicas intrigantes que as tornam versáteis em diversas aplicações. Suas propriedades, como alta foto-estabilidade, capacidade de ajuste do comprimento de onda de emissão e excelente biocompatibilidade, têm atraído uma atenção significativa. Estas características têm permitido o avanço em áreas como optoeletrônica, sensoriamento químico, foto-catálise e marcação biológica.

Em particular, no campo dos biomateriais fluorescentes, as NPsC têm sido objeto de uma investigação considerável. Com seu potencial para serem aplicadas em biologia celular e em biossensores, essas nanopartículas apresentam perspectivas promissoras para uma variedade de aplicações biofotônicas [3]. Este interesse contínuo reflete a importância crescente das NPsC como uma ferramenta versátil e potente em várias disciplinas científicas.

3. TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

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

3.1 Absorbância

A absorbância é uma medida fundamental usada na espectroscopia para quantificar a absorção de radiação eletromagnética por parte de moléculas, átomos ou íons. Esse fenômeno ocorre principalmente nas regiões do ultravioleta (UV) e visível (Vis) do espectro eletromagnético, onde as transições eletrônicas são comuns. Quando a luz atravessa um meio absorvente, como uma solução, a quantidade de luz absorvida depende da concentração da espécie absorvente, do coeficiente de absorção molar dessa espécie e do comprimento do caminho óptico percorrido pela radiação. A absorbância não tem unidade e fornece informações valiosas sobre a concentração de substâncias presentes na amostra, sendo amplamente utilizada em química analítica e bioquímica [9].

O estudo da variação desses parâmetros com a concentração abre portas para diversas aplicações. Em primeiro lugar, permite a determinação quantitativa de uma ampla gama de substâncias químicas e biológicas, sendo que métodos espectrofotométricos são amplamente utilizados nesse contexto, responsáveis por mais de 95% das análises clínicas nos Estados Unidos [9]. Além disso, possibilita a investigação da cinética de reações em solução, especialmente aquelas de natureza lenta, bem como a obtenção de curvas de titulação [9]. Os espectros de absorbância também podem ser utilizados para verificar a pureza de compostos, bem como para calcular a diferença de energia entre estados eletrônicos e o momento dipolar da transição [9].

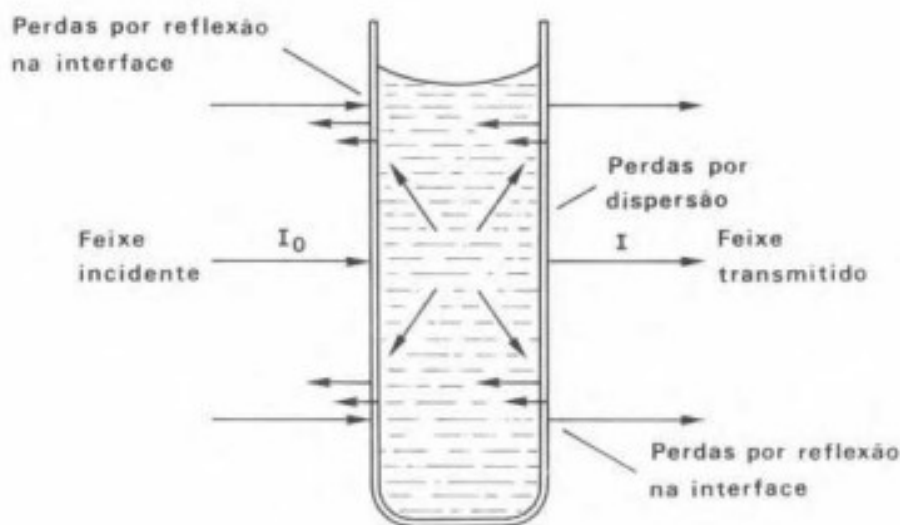


Figura 4. Esquema dos eventos que se desenrolam quando um feixe de radiação eletromagnética atinge uma célula contendo uma solução absorvente. Adaptado de [10].

Devido à interação entre os fótons e as moléculas que absorvem, a intensidade do feixe de radiação diminui de I_0 para I . Esse decréscimo na intensidade do feixe incidente é chamado de transmitância, enquanto a absorbância (Abs) está conectada à transmitância através de equações logarítmicas, conforme apresentado abaixo:

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

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

Ao realizar medições de absorção em líquidos, é crucial utilizar um recipiente transparente conhecido como cubeta óptica. No entanto, o uso desse dispositivo pode resultar em perdas devido a reflexões ou espalhamentos ao longo de suas paredes, resultando na dispersão da luz em várias direções pelas partículas presentes no solvente. Isso leva a uma redução adicional na intensidade do feixe ao atravessar a solução.

Esses efeitos podem ser compensados comparando a potência do feixe

transmitida através de uma cubeta contendo amostra com a potência que passou pela mesma cubeta apenas com o solvente, ou seja, a "amostra branca". Isso permite determinar a absorbância experimental, que se aproxima da verdadeira absorbância da solução [11].

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

De acordo com a lei de Beer a absorbância 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 [11]:

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

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

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

3.1.1 Coeficiente de Absorção Óptica

A lei Lambert-Beer relaciona 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 5), sendo I a intensidade do feixe emergente e I_0 a intensidade do feixe incidente.

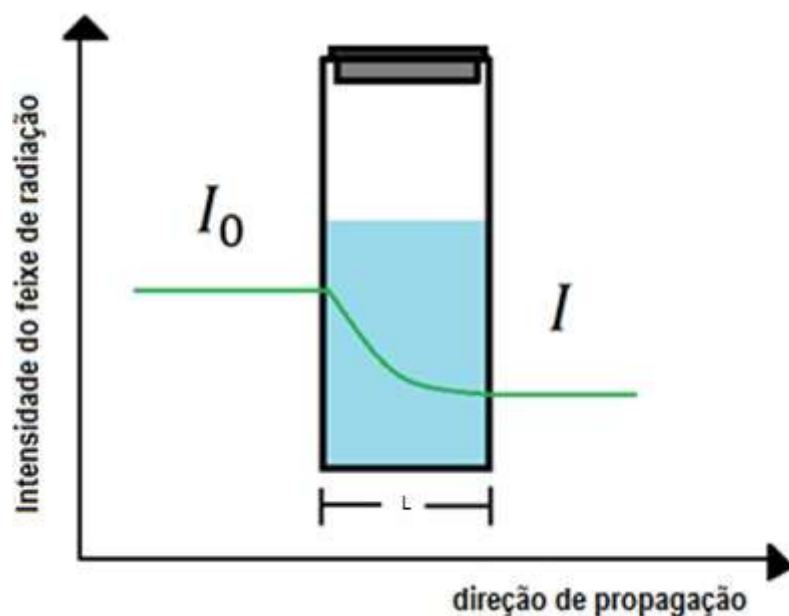


Figura 5. Representação da absorção de luz por uma amostra em função da distância percorrido por um feixe de luz no interior da amostra. Adaptado de [10].

A absorbância (A) nos informa o quanto de luz foi absorvido por uma amostra em uma faixa de comprimento de onda. Sendo assim, o cálculo do decaimento exponencial e da absorbância é obtido na forma [11]:

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

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

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:

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

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

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

$$\lambda_{em} = \frac{\int \lambda F(\lambda) d\lambda}{\int F(\lambda) d\lambda} \quad (12)$$

As medidas do espectro de absorbância neste trabalho, foram realizadas utilizando um espectrofotômetro Espectrofotômetro Cary 5000 UV-vis NIR Agilent; O Cary 5000 possui acessório, DRA-2500, para medidas de Reflectância Difusa na região de 200 a 2500 nm com alta resolução.

3.2 Fluorescência

Uma molécula em seu estado básico possui a energia mínima necessária. Assim, para que ocorra a transição eletrônica para o estado excitado, é preciso que a molécula absorva uma quantidade suficiente de energia quantizada. Após um período, essa molécula retorna ao seu estado fundamental, liberando parte da energia absorvida na forma de radiação, processo conhecido como emissão [12].

A emissão pode se apresentar de duas formas, dependendo da duração da emissão de luz: fluorescência e/ou fosforescência. Na fluorescência, ocorre a emissão de luz a partir de um estado excitado, com uma transição radiativa entre dois estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin [12].

Os processos de absorção e emissão em uma molécula são ilustrados no diagrama de Jablonski, onde S_0 representa o estado fundamental singlete e os estados excitados são denotados por S_n , com $n = 1, 2, 3$, e assim por diante. Essa

representação visual oferece “insights” sobre as transições eletrônicas e a dinâmica energética da molécula [12].

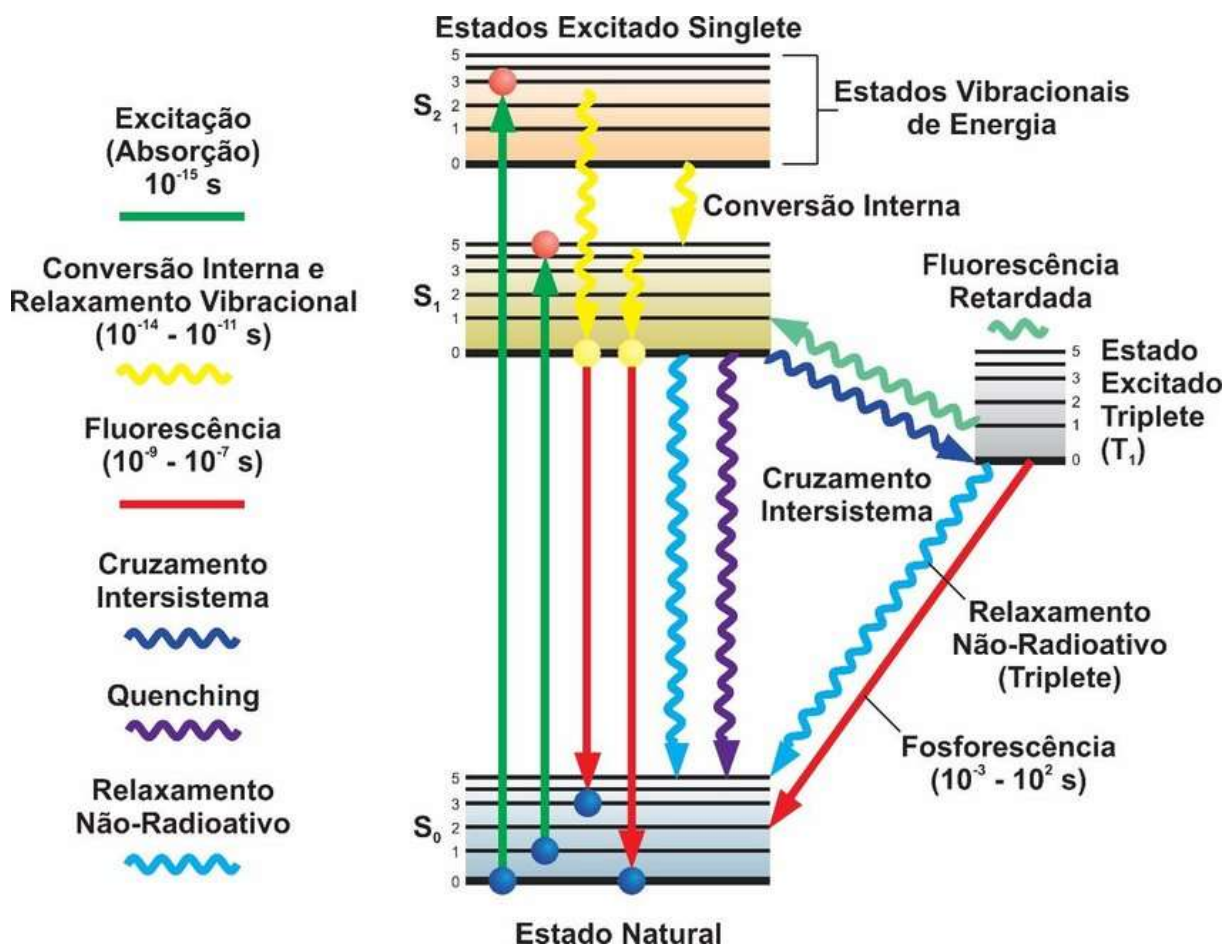


Figura 6. Diagrama de Jablonski. Adaptado de [13].

Os espectros de fluorescências foram obtidos utilizando-se um laser em 460 nm com potência $P \approx 10,5$ mW, 532 nm com potência $P \approx 44$ mW, e cubeta óptica de caminho óptico 1 cm (quartzo com quatro faces polidas).

3.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de Espectroscopia de Infravermelho (FTIR) é amplamente empregada na análise de compostos químicos, com base nas interações

moleculares que ocorrem nesse espectro. Essa técnica fornece valiosas informações sobre as vibrações moleculares e auxilia na identificação de substâncias presentes em amostras. A luz infravermelha ocupa uma faixa de comprimento de onda entre a luz visível e as micro-ondas, cobrindo aproximadamente de 2,5 a 25 m. Essa faixa é subdividida em três regiões distintas: infravermelho próximo (NIR, do inglês Near-Infrared - 0,8 a 2,5 μm), infravermelho médio (MIR, do inglês Mid-Infrared - 2,5 a 25 μm) e infravermelho distante (FIR, do inglês Far-Infrared - 25 a 300 μm) [14].

Os espectros de infravermelho mostram como as moléculas interagem com a radiação infravermelha devido às mudanças na distribuição de cargas elétricas durante as vibrações moleculares, que podem incluir estiramentos de ligação, flexões de ângulos de ligação ou torções de grupos funcionais. Cada tipo de vibração possui uma frequência característica relacionada à massa dos átomos envolvidos e às forças restauradoras presentes nas ligações químicas [14].

A absorção no infravermelho ocorre devido às frequências específicas de vibração dos dipolos moleculares, formados quando há uma assimetria de distribuição de cargas elétricas dentro de uma molécula. Durante a vibração molecular, os dipolos podem mudar de magnitude e orientação no espaço, interagindo com a radiação infravermelha e causando absorção de energia em frequências específicas. Essas frequências de absorção estão relacionadas com as frequências naturais de vibração dos dipolos na molécula. Entretanto, existem ligações moleculares que não absorvem energia no infravermelho, como aquelas presentes em moléculas diatômicas homonucleares, onde o valor do momento de dipolo permanece zero, independentemente do tamanho da ligação, resultando na ausência de absorção no infravermelho [15].

A técnica de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) é amplamente utilizada para obter informações detalhadas sobre as vibrações moleculares. Nessa técnica, o interferômetro de Michelson converte o sinal de infravermelho em um sinal de interferência, conhecido como interferograma, que contém informações sobre a intensidade da radiação em função do tempo. A transformada de Fourier é então aplicada ao interferograma para converter o sinal do domínio do tempo para o domínio da frequência, revelando os diferentes modos de vibração molecular presentes na amostra e fornecendo informações sobre as ligações químicas e grupos funcionais. No

espectro de FTIR resultante, as absorções são representadas como picos de intensidade em determinadas frequências, cada um associado a uma vibração molecular específica. A posição e a intensidade desses picos fornecem informações sobre a estrutura molecular, como a presença de grupos funcionais e a identificação de compostos [16, 17].

A Espectroscopia de Infravermelho e a técnica de FTIR são amplamente utilizadas em diversas áreas, como química, bioquímica, farmacêutica e materiais, desempenhando um papel fundamental na identificação de compostos, caracterização de polímeros, análise de estruturas moleculares e estudos de reatividade química.

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin Elmer modelo FTIR Frontier Single Range - MIR, com resolução de 4 cm^{-1} . As medidas foram realizadas com o auxílio do acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR) com cristal de diamante.

3.4 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Em 1981, Gerd Binnig e Heinrich Rohrer foram responsáveis pelo desenvolvimento do Microscópio de Varredura por Tunelamento (STM), que opera com base no fenômeno de tunelamento. Neste processo, uma ponta varre a amostra a poucos nanômetros, resultando na formação de um "túnel" pelos elétrons da amostra em direção à ponta. A alteração na corrente de tunelamento gera a topografia da imagem. O Microscópio de Força Atômica (AFM) foi derivado dessa técnica e atua como um sensor de forças intermoleculares, sendo muito útil para estudar sistemas microscópicos e criar imagens de amostras em escala micro e nanométrica [18].

Esse equipamento se baseia na geração de imagens morfológicas das amostras através da detecção das forças intermoleculares (atração e repulsão) entre a ponta do equipamento e o material analisado. Uma sonda extremamente fina, com dimensões na ordem de poucos nanômetros, interage com a amostra, percorrendo uma região específica conforme parâmetros predefinidos, como modo de operação, frequência de varredura e resolução da imagem. Posteriormente, a área varrida pela sonda é transferida para um computador, onde um sistema

complexo gera uma representação topográfica da amostra. No presente estudo, foi utilizado o equipamento AFM Shimadzu, modelo SPM9600, disponibilizado pela Rede de Laboratórios Multiusuários da UFU.



Figura 7. Equipamento de AFM da Universidade Federal de Uberlândia, UFU.

3.5 Tempo de Vida de Fluorescência

O Tempo de vida de fluorescência de uma amostra corresponde ao período médio que os átomos presentes nessa amostra permanecem em seu estado excitado antes de retornar ao estado fundamental. Quando expostos a determinados comprimentos de onda, os átomos presentes nas moléculas conseguem absorver parte da energia transportada pelas ondas eletromagnéticas. Após alcançar o estado excitado, os elétrons podem reemitir parte da energia absorvida na forma de outras ondas eletromagnéticas, em um fenômeno conhecido como emissão espontânea. Esse processo geralmente ocorre em questão de nanossegundos e, por ser característico de cada molécula, pode ser utilizado para compreender sua emissão e taxa de transferência de energia [19, 20].

Os fluoróforos são conjuntos químicos que possuem capacidade fluorescente, sendo classificados em intrínsecos e extrínsecos. Os intrínsecos são moléculas que naturalmente emitem luz, enquanto os extrínsecos são adicionados à amostra para modificar suas propriedades espectrais. Duas características fundamentais dos fluoróforos são o tempo de vida de fluorescência e o rendimento quântico [21].

O rendimento quântico de fluorescência é definido como a relação entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos. Já o tempo de vida de fluorescência fornece informações sobre o período em que o fluoróforo permanece no estado excitado antes de retornar ao seu estado fundamental. Essas medidas são cruciais na espectroscopia de fluorescência, pois possibilitam a compreensão da taxa de transferência de energia e reações no estado excitado [22].

Entretanto, a obtenção das medidas de tempo de vida de fluorescência pode ser desafiadora, especialmente quando os valores estão na faixa de nanossegundos, exigindo equipamentos de alta velocidade e detectores sensíveis. Os métodos mais comuns para esse fim incluem o método de pulsos, método estroboscópico e o método harmônico ou de modulação de fases [22].

Neste trabalho, foi empregado o método de pulsos, onde a molécula é excitada por pulsos de LED (diodos emissores de luz). A medição é realizada ao longo de múltiplos ciclos de excitação e emissão, registrando o tempo entre cada ciclo. Dessa forma, o equipamento determina o intervalo entre os pulsos e o momento de chegada do fóton, permitindo a aquisição das curvas de decaimento de fluorescência por meio

de um histograma utilizando a técnica de contagem de fótons únicos resolvida no tempo (TCSPC) [23, 24].

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

A técnica de contagem de fóton único correlacionada com o tempo (TCSPC) é usada para analisar o tempo de vida de fluorescência, fornecendo informações sobre a duração média do estado excitado. Essa abordagem é essencial para estudos de sensibilidade e compreensão de processos bioquímicos [24].

O sistema experimental para medição do decaimento de fluorescência usando TCSPC é ilustrado na Figura 8. Ele consiste em um driver de diodo pulsado em picossegundos (PDL 200-B), um detector de contagem de fótons PMT (PMA series) baseado nos módulos fotossensores da série Hamamatsu H5783 / H10721, FluoTime e TimeHarp 260. Além disso, o software TimeHarp 260, compatível com plataformas Windows, permite a exportação conveniente dos dados para processamento adicional, como com o software FluoFit Fluorescence Decay Fit [25].

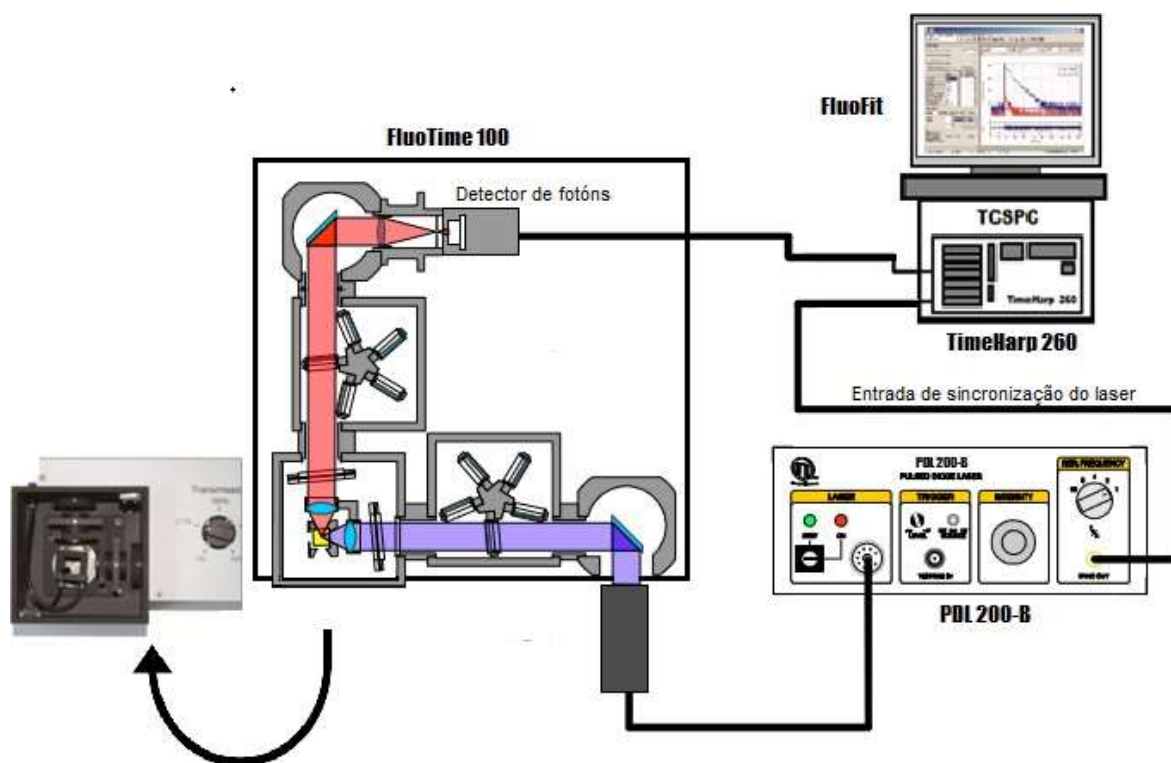


Figura 8. Configuração do sistema TCSPC. Adaptado de [26].

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão discutidos e apresentados os resultados experimentais obtidos pelas técnicas apresentadas anteriormente. São apresentadas também as caracterizações espectroscópicas de absorção e fluorescência das amostras investigadas (a) fluoresceína, (b) antocianina e (c) nanopartículas de carbono, todas elas inseridas em saliva artificial.

4.1 Análises dos resultados obtidos das amostras estudadas neste trabalho

Na Tabela 1 são apresentados os resultados obtidos para as medidas de pH das salivas artificiais, para aferir se os valores estão próximos aos nominais obtidos comercialmente. Estas medidas foram realizadas utilizando o equipamento da marca Hanna Instruments (HI 2221).

pH nominal	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9	pH10	pH12
Leitura 1	3,22	4,29	5,19	6,7	7,8	9,1	11,22	11,57	10,78
Leitura 2	3,21	4,3	5,2	6,71	7,8	9,11	11,23	11,56	10,72
Leitura 3	3,2	4,3	5,2	6,72	7,81	9,11	11,22	11,54	10,73
Leitura 4	3,2	4,31	5,19	6,74	7,82	9,09	11,24	11,54	10,71
Leitura 5	3,21	4,28	5,18	6,73	7,81	9,1	11,23	11,53	10,72
Leitura 6	3,2	4,29	5,16	6,75	7,83	9,1	11,25	11,51	10,73
Leitura 7	3,19	4,3	5,17	6,75	7,84	9,11	11,26	11,52	10,7
Leitura 8	3,18	4,3	5,17	6,74	7,83	9,11	11,26	11,52	10,78
Leitura 9	3,18	4,31	5,17	6,73	7,84	9,11	11,24	11,51	10,81
Leitura 10	3,19	4,28	5,18	6,74	7,85	9,12	11,24	11,51	10,8
Leitura 11	3,18	4,29	5,16	6,75	7,85	9,11	11,23	11,52	10,9
Leitura 12	3,2	4,3	5,17	6,75	7,84	9,12	11,24	11,52	10,94
Leitura 13	3,2	4,29	5,16	6,74	7,84	9,12	11,23	11,52	10,98
Leitura 14	3,19	4,3	5,16	6,75	7,86	9,12	11,25	11,52	11
Leitura 15	3,2	4,3	5,16	6,75	7,84	9,12	11,28	11,53	11,03
pH médio	3,20	4,30	5,17	6,74	7,83	9,11	11,24	11,53	10,82
DPA	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,12

Tabela 1. Potencial hidrogeniônico das salivas artificiais.

Após as medidas de pH, as amostras de salivas de pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 12 foram utilizadas para as caracterizações deste trabalho. Desta forma, foram realizadas as caracterizações espectroscópicas (absorbância, fluorescência e FTIR) em função do pH das salivas artificiais puras, como também na saliva artificial na presença de corantes fluorescentes e nanopartículas, para testar a possível dependência desses resultados com os valores de pH.

4.1.1 Salivas Puras

Nas Figuras 9 e 10 são apresentados os espectros de absorção e FTIR respectivamente, para as amostras de salivas artificiais puras, com os valores de pH definidos. Estes espectros serão utilizados para comparação e análises com espectros que serão apresentados nos próximos tópicos.

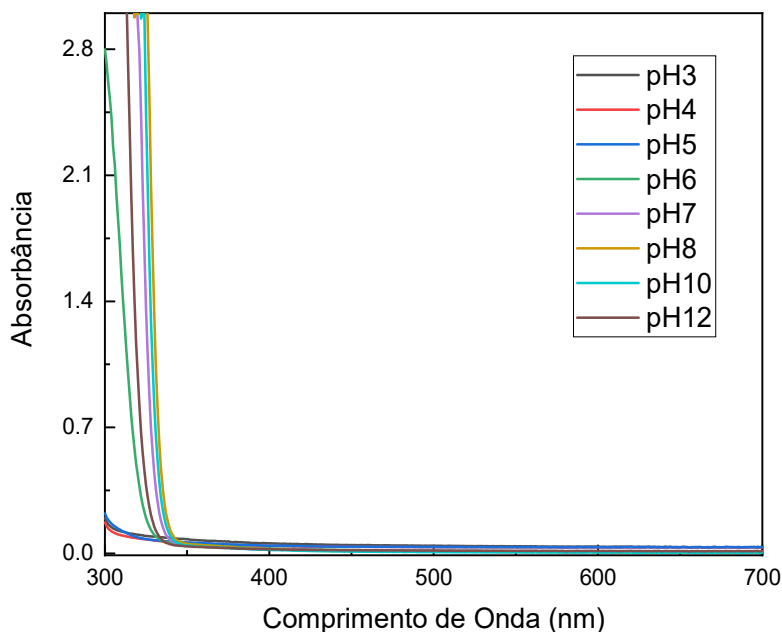


Figura 9. Espectro de Absorbância para as salivas artificiais puras.

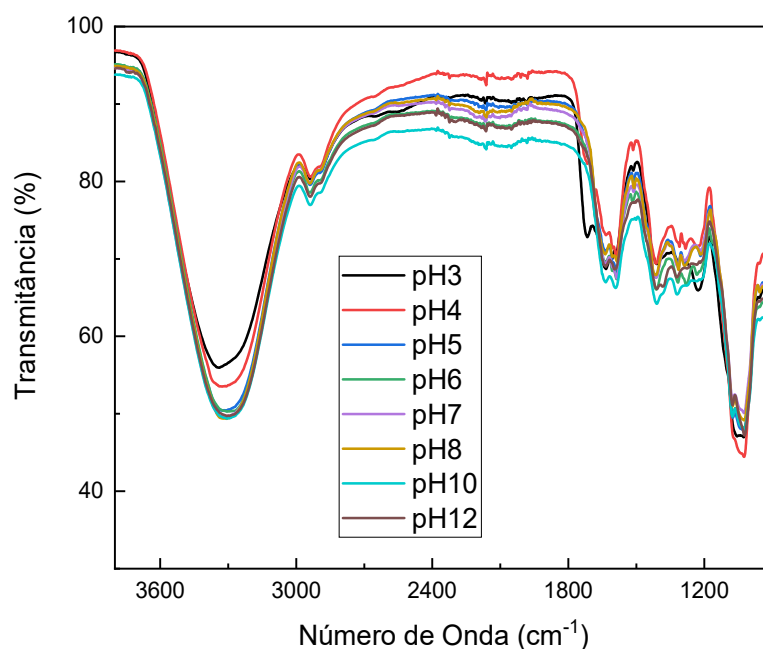


Figura 10. Espectro de FTIR para as salivas artificiais puras.

É possível observar na Figura 10, que as principais bandas de FTIR obtidas para as salivas artificiais estão presentes para todos os valores de pH investigados, e em acordo com a literatura [27].

4.1.2 Fluoresceína

Na Figura 11 são apresentados os frascos de fluoresceína inserida em saliva com diferentes valores de pH (concentração de 0,3 mg/mL). A amostra de fluoresceína para este trabalho foi realizada usando 3,0 mg de fluoresceína sódica em 10 mL de etanol, e foram inseridos 182 μ L de fluoresceína em 14 mL de saliva artificial para cada um dos valores de pH. É possível observar a modificação de coloração da fluoresceína em diferentes pHs, indicando a possibilidade de utilização do mesmo como indicador de pH. Observa-se que a saliva artificial de pH 3 (Figura 11) apresenta uma coloração mais clara quando comparada as demais, e que as amostras não apresentaram mudança de cor significativa.

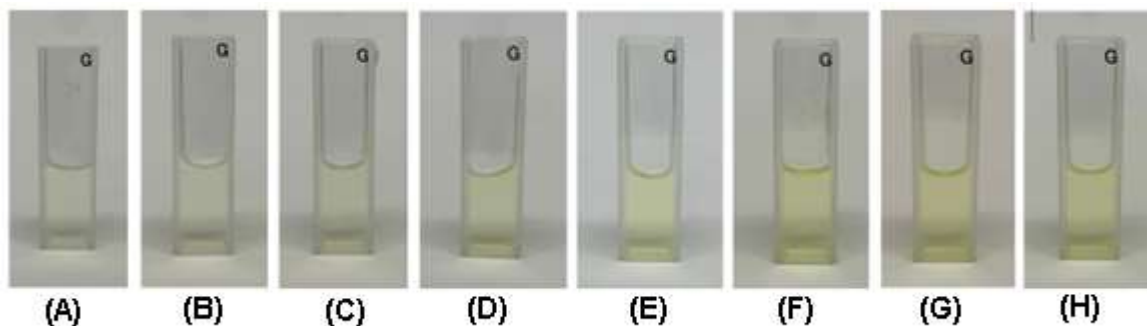


Figura 11. Salivas artificiais com fluoresceína, no qual o frasco (A), (B), (C), (D), (E), (F), (G) e (H) correspondem aos valores de pH nominal 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 12 respectivamente.

Nas Figuras 12, 13 e 14 são apresentados os espectros de absorção, fluorescência e FTIR respectivamente, para as amostras de fluoresceína inseridas em saliva artificial ($L = 1\text{cm}$). Na Tabela 2 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.

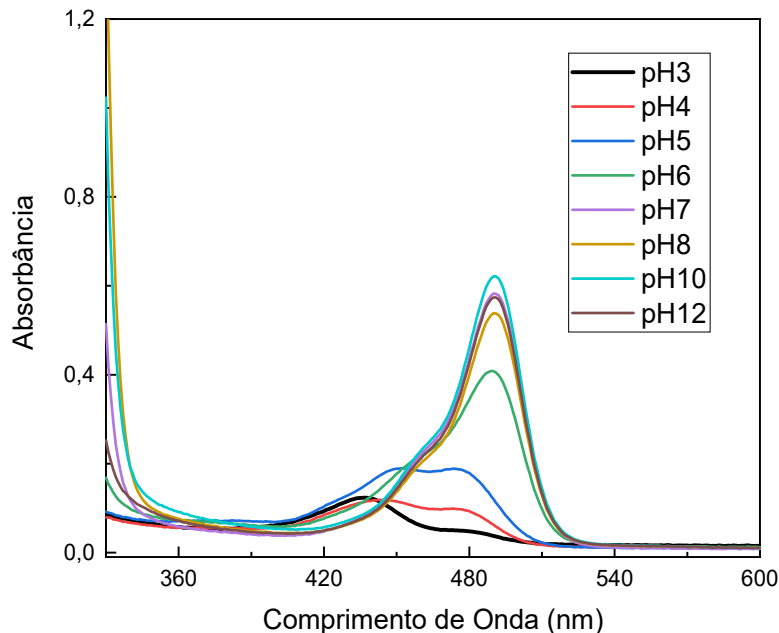


Figura 12. Espectro de absorção para 182 μL de fluoresceína inserida em 14 mL de saliva artificial (concentração 0,3 mg/mL).

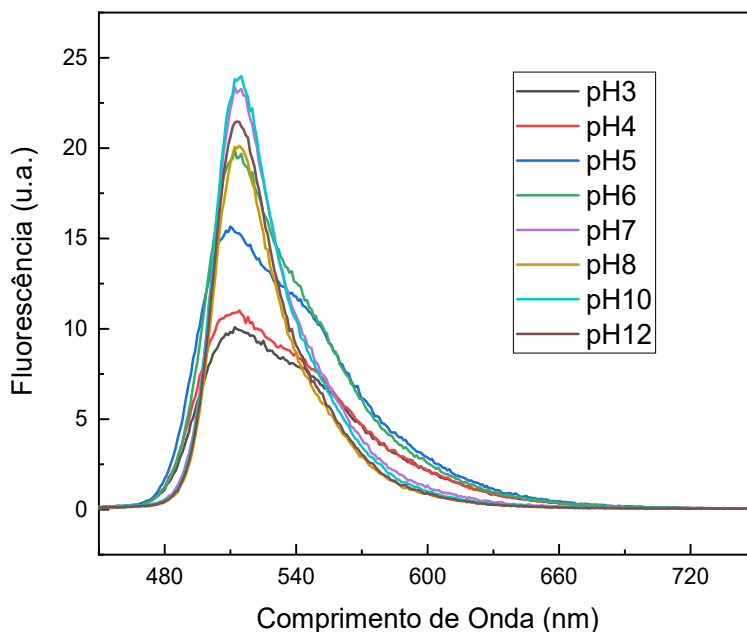


Figura 13. Espectro de fluorescência para 182 μ L de fluoresceína inserida em 14 mL de saliva artificial (concentração 0,3 mg/mL).

Nas Figuras 12 e 13 são apresentados os espectros de absorção e fluorescência (excitação em 460 nm), respectivamente, das amostras de fluoresceína inseridas em saliva artificial ($L = 1$ cm). Na Figura 12, nota-se que o pico de absorção à esquerda diminui conforme o pH da saliva aumenta, enquanto um novo pico de absorção surge à direita com o aumento do pH. Os valores de pico máximo de absorbância para cada amostra de fluoresceína são resumidos na Tabela 2, evidenciando que em geral há um aumento na absorção conforme o pH se torna mais alcalino. Portanto, é perceptível que os espectros de absorção e fluorescência da fluoresceína são dependentes dos valores do pH da saliva.

Amostras (pH)	Picos de Absorbância
3,2	0,123
4,4	0,118
5,17	0,189
6,74	0,408
7,83	0,583
9,11	0,538
10,82	0,573
11,53	0,616

Tabela 2. Valores de pH e picos de absorção fluoresceína inseridas em salivas (concentração de 0,3 mg/mL).

Na Tabela 3 são apresentados também, os valores de coeficiente de absorção em 460 nm, comprimento efetivo e comprimento de onda de emissão média, obtidos usando as Equações (11) e (12), respectivamente. Lembrando que todos os espectros apresentados já foram normalizados por α_{Leff} , presente na tabela a seguir. O valor médio de comprimento de onda de emissão ($\langle \lambda_{\text{em}} \rangle$) é de (535 ± 2) nm para todas as amostras de fluoresceína em saliva artificial, independentemente do pH.

Amostras (pH)	$\alpha(\text{cm}^{-1})$	$\text{Leff}(\text{cm})$	$\langle \lambda_{\text{em}} \rangle (\text{nm})$
3,20	0,14	0,13	542,17
4,40	0,23	0,21	540,91
5,17	0,42	0,34	539,80
6,74	0,50	0,39	537,69
7,83	0,51	0,40	531,57
9,11	0,46	0,37	530,08
10,82	0,49	0,39	529,84
11,53	0,53	0,41	530,07

Tabela 3. Propriedades ópticas de 182 μL fluoresceína diluída em 14 mL de saliva artificial em diferentes pHs (concentração 0,3 mg/mL, $\lambda = 460 \text{ nm}$).

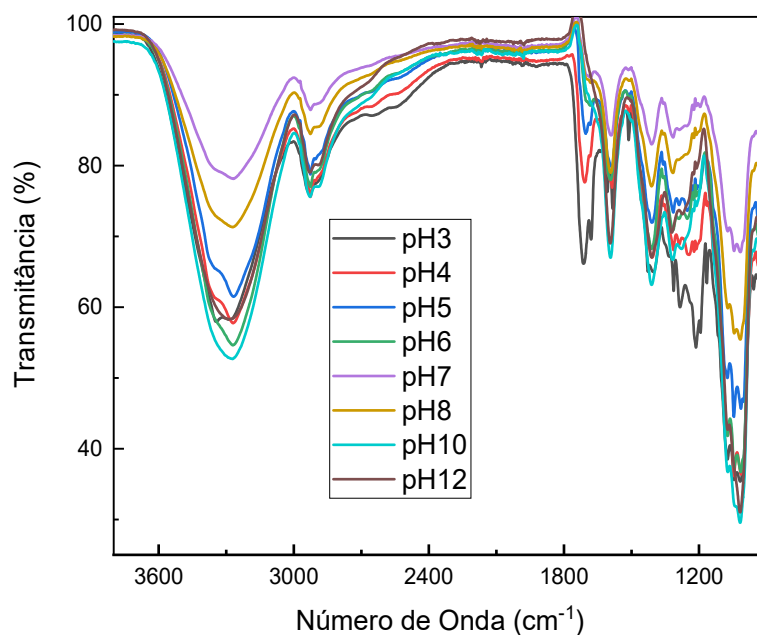


Figura 14. Espectro de FTIR para 182 μL de fluoresceína inserida em 14 mL de saliva artificial (concentração 0,3 mg/mL).

Analisando os espectros de FTIR (Figura 14), observa-se que os principais modos vibracionais foram identificados na faixa de 900 a 3500 cm^{-1} , destacando-se picos em 1710, 1594, 1397, 1277 e 1211 cm^{-1} . Nessas amostras, observaram-se picos significativos em 1710 cm^{-1} , relacionados à deformação do grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$); 1594 cm^{-1} , à deformação angular assimétrica do grupo metila ($\text{C}-\text{H}$), 1397 cm^{-1} , relacionados à deformação angular simétrica do grupo metila ($\text{C}-\text{H}$); 1277 cm^{-1} , à deformação axial de éster ($\text{C}(=\text{O})-\text{O}$); e 1211 cm^{-1} está relacionada a deformação axial de $\text{O}-\text{C}-\text{C}$. Estas bandas obtidas vão de acordo e são próximas com as encontradas pela literatura [28].

4.1.3 Antocianina

Na Figura 15 são apresentados os frascos de antocianina inserida em saliva com diferentes valores de pH. Foram inseridos 1050 μL de antocianina (concentração de 0,4 g/mL) em 14 mL de saliva artificial. É possível observar a modificação de

coloração da fluoresceína em diferentes pHs, indicando também a possibilidade de utilização do mesmo como indicador de pH.

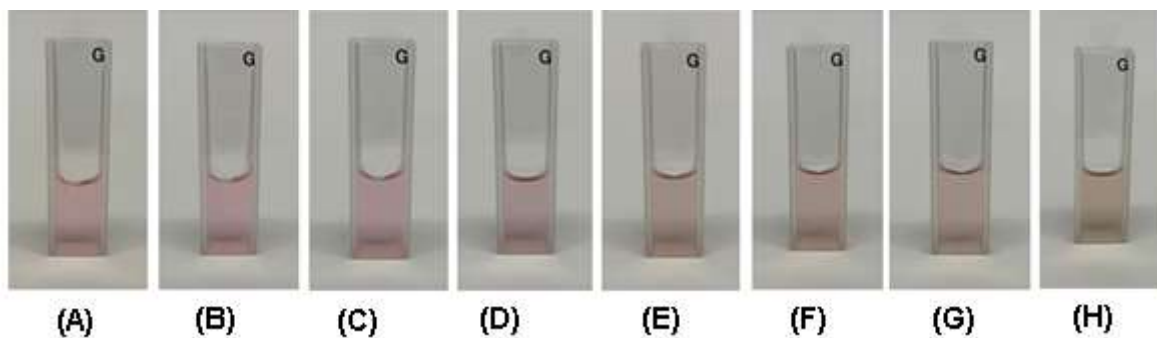


Figura 15. Salivas artificiais com Antocianina, no qual o frasco (A), (B), (C), (D), (E), (F), (G) e (H) correspondem aos valores de pH nominal 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 12, respectivamente.

Nas Figuras 16, 17 e 18 são apresentados os espectros de absorção, fluorescência e FTIR respectivamente, para as amostras de antocianina inseridas em saliva artificial (L= 1cm).

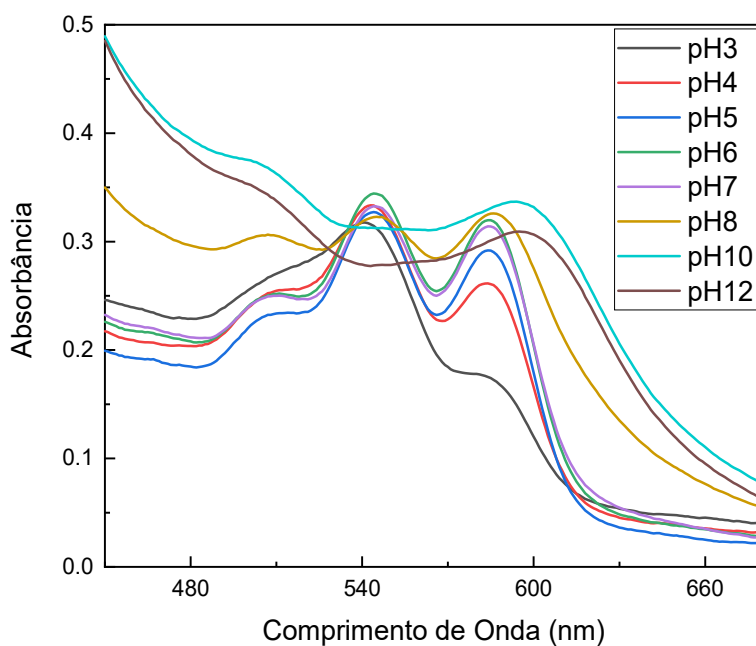


Figura 16. Espectro de absorção para 1050 μ L de antocianina inserida em 14 mL de saliva artificial (concentração 0,4 g/mL).

A Figura 16 apresenta o espectro de absorção na região do visível da antocianina inserida em saliva artificial para diferentes valores de pH (concentração 0,4 g/mL). É possível observar a presença de 3 picos de absorção e que há uma diferença entre as alturas das bandas. Percebe-se que a banda mais à direita aumenta em relação à banda do meio, e que dentre todas as amostras investigadas, a antocianina inserida em saliva com pH 5,17 foi a que teve uma maior diferença entre a altura dos picos. Analisando por exemplo a solução com saliva de pH 5, o espectro característico de absorção, apresenta bandas em 511, 544 e 574 nm. Essas bandas estão em acordo com os obtidos por Lima et al. [29] para a antocianina extraída das folhas de *Tradescantia pallida* cv. purpúrea. Também, é possível observar nos espectros apresentados na Figura 10, que na faixa entre 500 e 800 nm, as salivas artificiais puras não apresentaram sinais de absorbância.

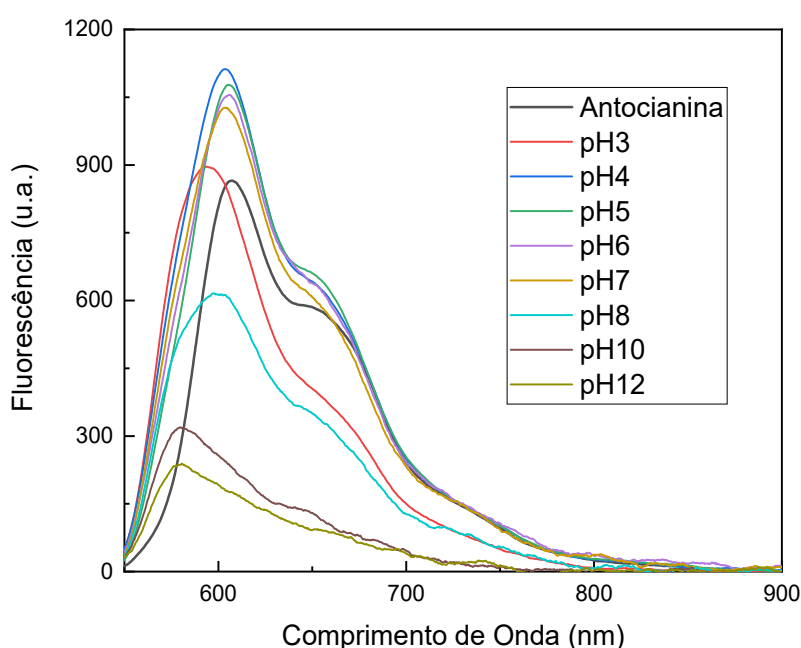


Figura 17. Espectro de fluorescência para 1050 μ L de antocianina inserida em 14 mL de saliva artificial (concentração 0,4 g/mL).

Os espectros de fluorescência da antocianina inserida em salivas artificiais com diferentes valores de pH são mostrados na Figura 17. Observa-se que quando

substâncias fluorescentes são adicionadas à saliva, eles obtêm seus espectros distintos. Assim, chega-se à conclusão de que a ausência de espectros de absorbância e fluorescência na saliva artificial pura é algo benéfico, pois quando outras substâncias são diluídas nas mesmas, o sinal será obtido da substância que foi diluída nela. Isso permite observar como esses materiais fluorescentes se comportarão ao ser adicionada a um fluido, e se haverá mudanças no comportamento quando adicionada a salivas em diferentes valores de pH.

Na Tabela 4 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. Lembrando que todos os espectros apresentados já foram normalizados por αL_{eff} , presente na tabela a seguir.

Amostras (pH)	$\alpha(cm^{-1})$	$L_{eff}(cm)$	$\langle \lambda_{em} \rangle (nm)$
3,20	0,70	0,50	623,60
4,40	0,67	0,49	635,08
5,17	0,62	0,46	638,31
6,74	0,67	0,49	639,30
7,83	0,64	0,47	637,57
9,11	0,68	0,49	631,93
10,82	0,67	0,49	613,11
11,53	0,74	0,52	608,40

Tabela 4. Propriedades ópticas de 1050 μ L antocianina diluída em 14 mL de saliva artificial em diferentes pHs (concentração 0,4 g/mL, $\lambda = 532 nm$).

Na Figura 18 são apresentados os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para soluções de saliva contendo antocianina.

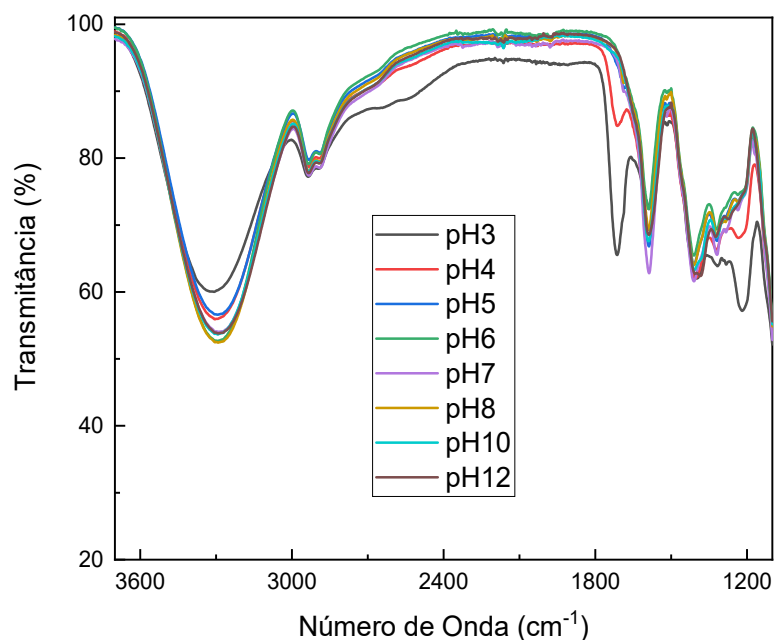


Figura 18. Espectro de FTIR para 1050 µL de antocianina inserida em 14 mL de saliva artificial (concentração 0,4 g/mL).

Analisando os espectros de FTIR (Figura 18), observa-se que os principais modos vibracionais foram identificados na faixa de 900 a 3500 cm^{-1} , destacando-se picos em 3297, 1590, 1397 e 1018 cm^{-1} . Nessas amostras, observaram-se picos significativos em 3297 cm^{-1} , relacionados ao estiramento dos grupos hidroxila (-OH); 1590 cm^{-1} , associados ao estiramento nos anéis aromáticos dos grupos carbonilas C=C ou C=O; e 1018 cm^{-1} , relacionados à vibração C-O-C. A presença desses grupos funcionais, como anel de benzeno, ligação dupla, grupo carbonila, ligação C-H e grupo OH, confirma a estrutura da antocianina [30]. A banda discreta em 2927 cm^{-1} , atribuída a um grupo metila (C – H₃) representa vibrações de CH alifáticos. Notavelmente, à medida que o pH das amostras diminuiu, houve um aumento nos picos a partir de 3000 cm^{-1} [31]. Essas observações fornecem informações sobre as interações moleculares e a estrutura das amostras de saliva contendo antocianina em diferentes condições de pH. Todas essas análises estão em acordo com as bandas obtidas por Lima et al. [32].

4.1.4 Nanopartículas de Carbono

Na Figura 19 são apresentados os frascos de nanopartículas de carbono inserida em saliva com diferentes valores de pH. Foram inseridos 200 μL de nanopartícula (concentração de 0,4 g/mL) em 10 mL de saliva artificial.

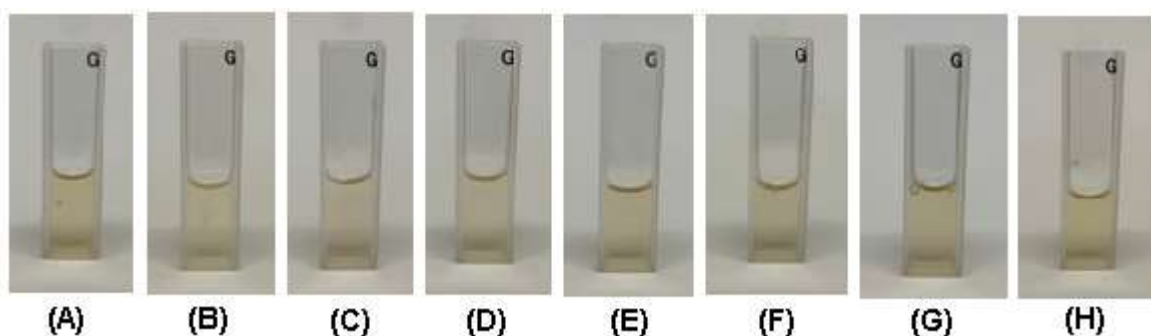


Figura 19. Salivas artificiais com Nanopartículas de Carbono, no qual o frasco (A), (B), (C), (D), (E), (F), (G) e (H) correspondem aos valores de pH nominal 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 12 respectivamente.

Primeiramente para apresentar a topografia, ou um mapa da configuração microscópica da nanopartícula de carbono, na Figura 20 é apresentada uma imagem de AFM para esse material. Inserido, observa-se a distribuição de tamanho da nanopartícula cujo valor máximo ocorre em 6 nm. A dispersão de tamanhos das nanopartículas sugere uma possível origem em processos complexos de crescimento ou nucleação durante a síntese das nanopartículas.

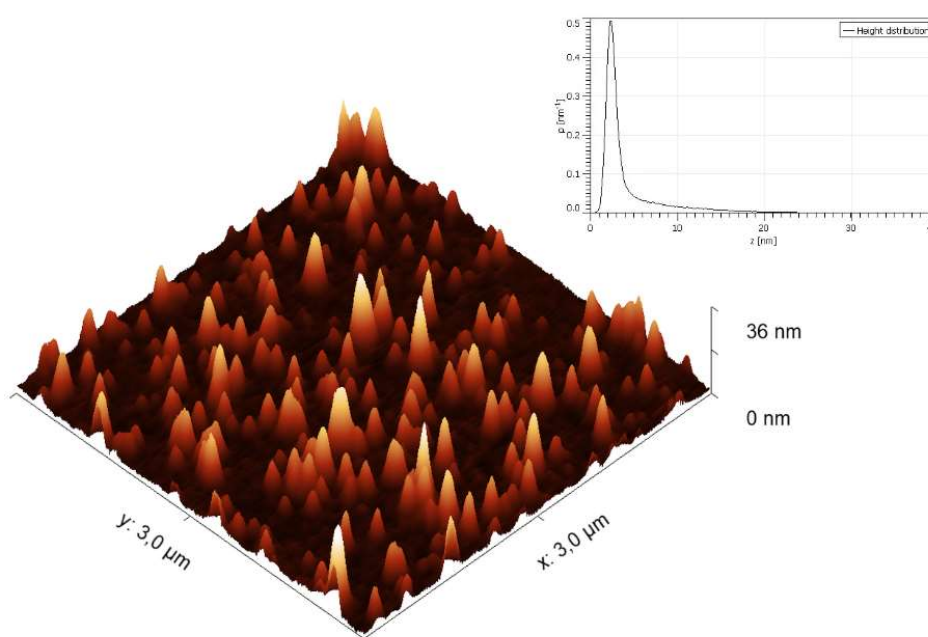


Figura 20. Imagem topográfica de AFM da nanopartícula de carbono.

Nas Figuras 21, 22 e 23 são apresentados os espectros de absorção, fluorescência e FTIR respectivamente, para as amostras de nanopartículas inseridas em saliva artificial (L = 1cm).

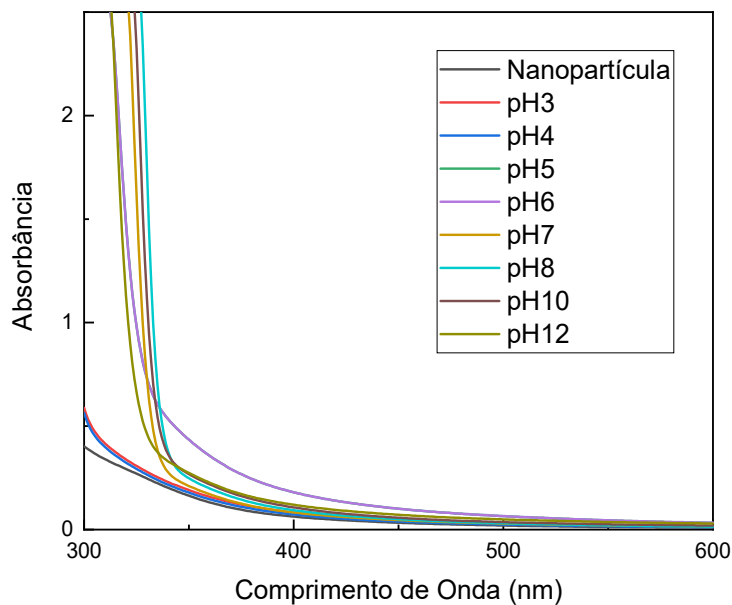


Figura 21. Espectro de absorbância para as salivas artificiais com Nanopartículas de Carbono com concentração de 0,4 g/mL diluída em 10 mL de saliva.

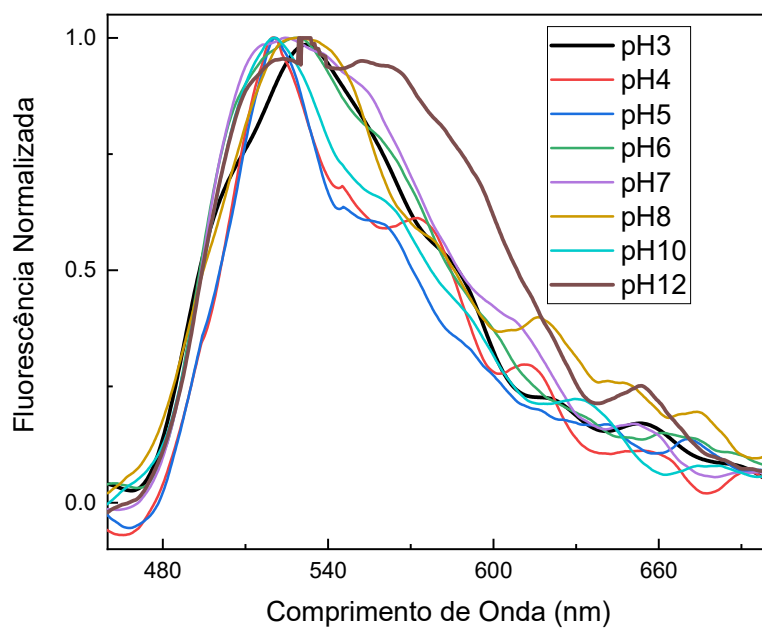


Figura 22. Espectro de Fluorescência para as salivas artificiais com Nanopartículas de Carbono com concentração de 0,4 g/mL diluída em 10 mL de saliva.

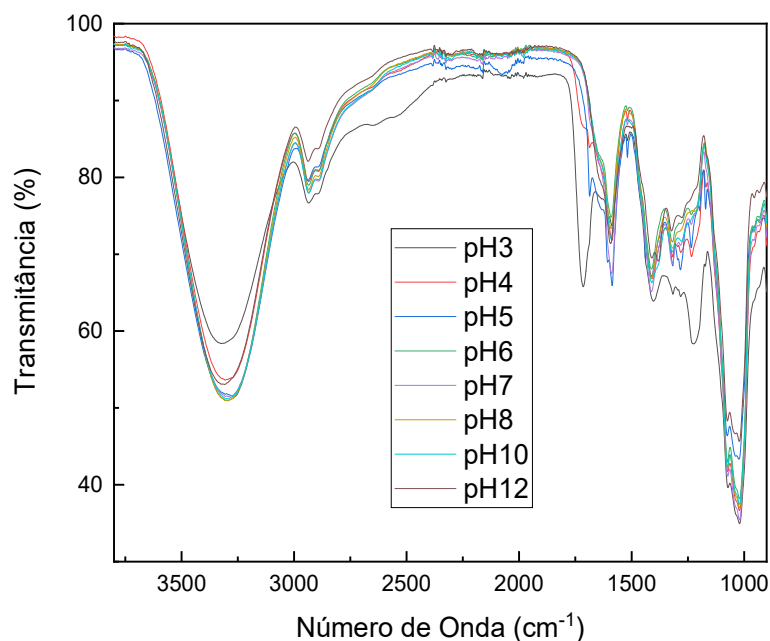


Figura 23. Espectro de FTIR para as salivas artificiais com Nanopartículas de Carbono com concentração de 0,4 g/ml diluída em 10 mL de saliva.

Análises dos espectros de absorção e fluorescência serão realizados posteriormente, comparando com a Lima et al. [32]. As bandas de absorção e fluorescência são características que fornecem informações sobre a composição das nanopartículas de carbono estudadas.

Para as medidas de FTIR (Figura 23), a banda de absorção em torno de 1715 cm^{-1} sugere a presença de grupos carbonila ($\text{C}=\text{O}$), indicando possíveis funcionalidades como cetonas, aldeídos ou ácidos carboxílicos. Observou-se também bandas de absorção em torno de 2925 cm^{-1} , indicativas de estiramentos de C-H alifáticos, e em torno de 3015 cm^{-1} , sugerindo estiramentos de C-H aromáticos, o que reforça a presença de grupos C-H nas amostras [33, 34]. A banda em aproximadamente 1588 cm^{-1} pode ser atribuída à presença de ligações C-C, indicando possíveis estruturas carbonáceas, como grafeno ou fulerenos [33]. Além disso, foram identificadas bandas em torno de 1000 -1100 cm^{-1} , caracterizando estiramentos de C-O, o que sugere a presença de funcionalidades como álcoois, éteres ou ésteres. Por fim, a presença de bandas em torno de 1400 cm^{-1} indica ligações C-N, sugerindo possíveis funcionalidades como aminas ou nitrilas nas amostras analisadas [35].

Essas características espectrais fornecem informações valiosas sobre a composição e estrutura das nanopartículas de carbono, auxiliando na compreensão de suas propriedades e potenciais aplicações [32].

Na Tabela 5 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. Lembrando que todos os espectros apresentados já foram normalizados por α_{Leff} , presente na tabela a seguir.

Amostras (pH)	$\alpha(cm^{-1})$	$Leff(cm)$	$\langle \lambda_{em} \rangle (nm)$
3,20	7,42	0,99	554,48
4,40	7,06	0,99	554,46
5,17	6,93	0,99	561,01
6,74	6,93	0,99	561,79
7,83	6,82	0,99	555,60
9,11	6,87	0,99	562,27
10,82	6,93	0,99	579,88
11,53	6,97	0,99	551,61

Tabela 5. Propriedades ópticas de 200 μ L antocianina diluída em 10 mL de saliva artificial em diferentes pHs (concentração 0,4 g/mL, $\lambda = 532 nm$).

4.1.5 Tempo de vida

A seguir são apresentados os parâmetros de tempo de vida obtidos para as substâncias inseridas nas salivas artificiais. Todas as medidas foram ajustadas usando uma única exponencial com valores de $\chi^2 < 1.2$. Para a fluoresceína e antocianina os dados foram obtidos pelo grupo de pesquisa (GPOTM), descritos em [36]. Para assim, posteriormente comparar com os parâmetros obtidos para as nanopartículas de carbono de carbono inseridas em saliva artificial, Tabela 8.

pH nominal	pH medido	τ_1 (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	$0,99 \pm 0,03$

Tabela 6. Tabela com os respectivos parâmetros de ajustes 130 μ L de fluoresceína inserida em 10 mL de saliva artificial (concentração $3,9 \times 10^{-3}$ mg/mL). Medido pelo grupo GPOTM.

pH nominal	pH medido	τ_1 (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	$1,12 \pm 0,03$

Tabela 7. Tabela com os respectivos parâmetros de ajustes para 300 μ L antocianina diluída em 4 mL de saliva artificial em diferentes pHs (concentração 50 mg/mL). Medido pelo grupo GPOTM.

Analisando a Tabela 7 é possível observar que a antocianina inserida na saliva artificial apresenta uma diminuição no tempo de vida conforme o pH aumenta. Em contraste, os valores de tempo de vida de fluorescência para a fluoresceína aumentam à medida que o pH se eleva. Na literatura, foi constatado que as nanopartículas de carbono, com diferentes tamanhos de núcleos, aumentam a eficiência quântica da fluorescência conforme o pH da saliva aumenta [37]. Estes achados estão alinhados com o aumento do tempo de vida observado para a fluoresceína, ressaltando a possibilidade de utilizar este cromóforo fluorescente como indicador de pH em salivas artificiais.

pH nominal	pH medido	$\tau_1(ns)$	A1 (u.a)	$\tau_2(ns)$	A2 (u.a)	χ^2
5	5,17	$7,51 \pm 0,06$	$683,51 \pm 12,37$	$1,94305 \pm 0,02$	$2310,12 \pm 9,35$	$1,042 \pm 0,020$
6	6,74	$7,55 \pm 0,03$	$580,26 \pm 7,15$	$2,10 \pm 0,01$	$2410,88 \pm 9,89$	$1,003 \pm 0,001$
7	7,83	$7,23 \pm 0,05$	$505,05 \pm 7,98$	$2,05 \pm 0,01$	$2110,80 \pm 3,50$	$1,006 \pm 0,001$
8	9,11	$6,21 \pm 0,20$	$442,47 \pm 36,02$	$1,83 \pm 0,07$	$1473,83 \pm 12,34$	$1,003 \pm 0,003$
10	11,53	$5,20 \pm 0,60$	$648,83 \pm 188,14$	$2,58 \pm 0,80$	$1153,86 \pm 194,39$	$1,046 \pm 0,020$

Tabela 8. Tabela com os respectivos parâmetros de ajustes para 200 μ L nanopartícula diluída em 10 mL de saliva artificial em diferentes pHs (concentração 0,4 g/mL).

Na Tabela 8 são apresentados os resultados obtidos de tempo de vida para as nanopartículas de carbono inseridas em saliva, observa-se que os valores de tempo de vida (τ), apresenta uma discreta diminuição com o aumento do pH. Destacando assim a possibilidade de utilizar essas nanopartículas como biossensores de pH.

Por outro lado, a nanopartícula revelou-se um biossensor mais eficiente nas medidas de tempo de vida de fluorescência, devido sua possível dependência com o valor de pH. Nas medidas espectroscópicas de absorção e fluorescência medidas complementares serão necessárias em outras concentrações de nanopartículas de carbono, para possível observação de dependência com as modificações de pH. Por outro lado, a utilização de corantes fluorescentes pode ser limitada, pelo processo de extração, devido à necessidade de ser usado em concentrações mais elevadas, e a baixos volumes que podem ser adicionados à saliva sem alterar o pH da amostra analisada.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo, foram investigadas as propriedades ópticas de dois corantes fluorescentes (fluoresceína e antocianina), e nanopartículas de carbono inseridas em saliva artificial com diferentes valores de pH (pH $\sim$ 3,2 - 11,5). O objetivo central foi avaliar sua viabilidade como sensores de pH salivar, utilizando saliva artificial para simular um ambiente biológico.

Os resultados revelaram que as amostras de antocianina e fluoresceína inseridos nas salivas, mudaram de cor em diferentes pHs da saliva artificial, sugerindo seu potencial como indicador de pH. Além de possuírem padrão de aumento e/ou diminuição de valores de absorção e fluorescência ao serem analisadas em relação a variação de pH. Além disso, notou-se que o tempo de vida da fluorescência da

fluoresceína aumentou com o aumento do pH, resultados similares aos encontrados na literatura para as nanopartículas semi-condutoras [37]. No entanto, para a antocianina e as nanopartículas de carbono, observou-se uma diminuição no tempo de vida com o aumento do pH. Essa diminuição foi discreta para a antocianina e mais significativa para as nanopartículas de carbono. Porém, esses biomateriais por serem obtidos por extração e/ou síntese de plantas, se destacam por não gerarem produtos tóxicos e serem ecologicamente viáveis.

Os resultados desse trabalho sugerem que a antocianina e a nanopartícula de carbono poderiam ser candidatos eficazes de biossensores de pH em saliva artificial. Novos estudos são necessários com diferentes concentrações de nanopartículas de carbono para evidenciar sua potencialidade de possível aplicação como biossensor de pH em salivas. No entanto, a fluoresceína e nanopartículas de carbono apresentam potencial, como sensor de pH, devido à necessidade de concentrações mais altas e volumes menores de amostra para evitar alterações no pH. Portanto, estudos futuros podem explorar o potencial das nanopartículas como sensores de pH para diagnóstico e prevenção de doenças, considerando a variação do pH da saliva humana em casos patológicos.

REFERÊNCIAS

- [1] LORENZEN, A. Mundo da Educação, 2024. Conteúdos escolares. Disponível em: <<https://mundoeducacao.uol.com.br/quimica/voce-sabe-que-significa-ph-.htm>>. Acesso em: 03 jan. de 2024.
- [2] BATISTA, C. Website Toda Matéria, 2024. Disponível em: <<https://www.todamateria.com.br/o-que-e-ph/>>. Acesso em: 02 de janeiro de 2024.
- [3] CHAVES. C. Síntese, Silanização e Caracterização de Pontos Quânticos de CdTe/CdS e Cds/ Cd(OH)₂ Para Aplicações em Sistemas Biológicos. Tese (Tese de Doutorado). [S. I.], 2011.
- [4] GUELLIS, C. Eletrofição 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.
- [5] BITENCOURTT, Rogério; GIOSTRINI, Giana Silveira; DONOSO, Carolina Paz Munhoz. Fluoresceína na avaliação da viabilidade tecidual em fraturas expostas graves, Revista de ortopedia, vol 23, n°2, fev,1997, p.12 7-132.
- [6] J. B. Harborne and R. J. Grayer., “The Anthocyanins,” In: Harborne Although the Hemical Structure of Anthocyanins. The flavonoids: Advances in Research since 1980, Chapman and Hall, London, 1988, pp. 1-20.
- [7] 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>.
- [8] GAO, L.; MAZZA, G., Extraction of anthocyanin pigments from purple sunflower hulls, Journal of Food Science, v.61, p.600–603, 1996.

- [9] LENZ, G. Métodos Fotométricos. Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.
- [10] 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>.
- [11] SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Fundamentos de Química Analítica. 8ª edição, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2005.
- [12] 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>.
- [13] 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.
- [14] R. Silverstein, F. Webster, and D. Kiemle, Spectrometric Identification of Organic Compounds. 7th edn John Wiley & Sons. 2005.
- [15] P. R. Griffiths and J. A. De Haseth, Fourier Transform Infrared Spectrometry. John Wiley & Sons, 2007. doi: Disponível em: <https://doi.org/10.1002/047010631X>.
- [16] B. Stuart, "Analytical techniques in the sciences," Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications, vol. 8, 2004. doi: Disponível em: <https://doi.org/10.1002/0470011149>.
- [17] J. R. Ferraro, Introductory raman spectroscopy. Elsevier, 2003.

- [18] Binnig, Gerd, et al. "Surface studies by scanning tunneling microscopy." *Physical review letters* 49.1 (1982): 57.
- [19] 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>.
- [20] 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.
- [21] LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd. ed. New York, NY: Springer, 2010.
- [22] 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.
- [23] KAPUSTA, P.; WAHL, M.; ERDMANN, R. Advanced Photon Counting: Applications, Methods, Instrumentation. 15th. ed. Springer International Publishing, 2015.
- [24] 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>.
- [25] WAHL, M. Time-Correlated Single Photon Counting. Berlin: PicoQuant GmbH, 2014.

- [26] 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>.
- [27] MAYWORM, C. et. Al. Influence of artificial saliva on abrasive wear and microhardness of dental composites filled with nanoparticles. *Journal of dentistry* 36 (2008) 703–710. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300571208001553>.
- [28] SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C., *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5ª Edição, John Wiley & Sons, Singapura, 1991.
- [29] 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>.
- [30] H. Munawaroh, L. Saputri, Q. Hanif, R. Hidayat, S. Wahyuningsih, et al., “The co-pigmentation of anthocyanin isolated from mangosteen pericarp (*Garcinia mangostana* L.) as natural dye for dye-sensitized solar cells (dssc),” in *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, vol. 107, p. 012061, IOP Publishing, 2016. doi: <https://doi.org/10.1088/1757-899X/107/1/012061>.
- [31] Lima, L. R. Lourenço, M. Thomaz, D. N. Messias, A. A. Andrade, and V. Pilla, “Fluorescence quantum yields and lifetimes of aqueous natural dye extracted from *Tradescantia pallida purpurea* at different hydrogen potentials,” *Photochem*, vol. 3, p. 1, 2023. doi: <https://doi.org/10.3390/photochem3010001>.
- [32] LIMA, S. R. de. et al. Caracterização termo-óptica de corante natural e pontos de carbono (CDs) fluorescentes para bioaplicações. 2023. Tese (Doutorado em Física) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia 2023.

- [33] G. Ge, L. Li, M. Chen, X. Wu, Y. Yang, D. Wang, S. Zuo, Z. Zeng, W. Xiong, and C. Guo, "Green synthesis of nitrogen-doped carbon dots from fresh tea leaves for selective Fe^{3+} ions detection and cellular imaging," *Nanomaterials*, vol. 12, p. 986, 2022. doi: <https://doi.org/10.3390/nano12060986>.
- [34] H. Ding, J.-S. Wei, and H.-M. Xiong, "Nitrogen and sulfur co-doped carbon dots with strong blue luminescence," *Nanoscale*, vol. 6, p. 13817, 2014. doi: <https://doi.org/10.1039/C4NR04267K>.
- [35] M. M. Costa, E. C. Cabral-Albuquerque, T. L. Alves, J. C. Pinto, and R. L. Fialho, "Use of polyhydroxybutyrate and ethyl cellulose for coating of urea granules," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 61, p. 9984, 2013. doi: <https://doi.org/10.1021/jf401185y>.
- [36] Lana, K. Caracterizações Espectroscópicas e de Tempo de Vida em Soluções Fluorescentes Inseridas em Saliva Artificial em Função do Ph. Monografia (Monografia de TCC). Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2021.
- [37] 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.