



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE LICENCIATURA PLENA EM QUÍMICA



ANÁLISE DE PARABENOS EMPREGANDO *QUANTUM DOTS*

ARTHUR LUÍS SILVA DE ARAÚJO

RECIFE/PE - 2019

ARTHUR LUÍS SILVA DE ARAÚJO

ANÁLISE DE PARABENOS EMPREGANDO *QUANTUM DOTS*

Monografia apresentada como pré-requisito de conclusão do Curso de Licenciatura Plena em Química, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, tendo como orientador o Professor André Fernando Lavorante

RECIFE/PE - 2019

Ficha Catalográfica

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

A663a Araújo, Arthur Luís Silva de
 Análise de parabenos empregando quantum dots / Arthur Luís
 Silva de Araújo. – 2019.
 55 f. : il.

 Orientador: André Fernando Lavorante.
 Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade
 Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Química, Recife,
 BR-PE, 2019.
 Inclui referências.

 1. Cosméticos 2. Semicondutores 3. Química ambiental
 4. Química analítica I. Lavorante, André Fernando, orient. II. Título

CDD 540

ARTHUR LUÍS SILVA DE ARAÚJO

ANÁLISE DE PARABENOS EMPREGANDO *QUANTUM DOTS*

Monografia apresentada como pré-requisito de conclusão do Curso de Licenciatura Plena em Química, da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

MONOGRAFIA APROVADA EM ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Fernando Lavorante – UFRPE

Orientador

Prof^a. Dr^a. Maria José de Filgueiras Gomes – UFRPE

Primeira Examinadora

Prof. Dr. Jandyson Machado Santos – UFRPE

Segundo Examinador

RECIFE/PE – 2019

Resumo

Os cosméticos são produtos amplamente presentes no cotidiano da sociedade moderna. Devido a este fato, as políticas públicas e privadas enfatizam a necessidade da geração de insumos de qualidade, baixo custo e principalmente, com formulações atóxicas. O alto rigor no controle de qualidade dos cosméticos, vem injetando capital no setor, transformando-o no “topo” da Química fina. Esse *status* vem se mantendo, para os produtores que seguem principalmente os princípios da Química Verde, onde, a matéria prima deve ser aproveitada por completo durante o processo de produção, gerando o menor resíduo possível. Dentre os principais impasses neste setor, estão o uso de conservantes (naturais ou sintéticos) nos produtos de forma geral, que podem apresentar efeitos colaterais em alguns casos. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi propor um método alternativo para análise de um grupo de conservantes orgânicos (parabenos), potencialmente tóxicos, em cosméticos e similares distribuídos no Estado de Pernambuco. Seu alto poder de inibição microbiana, faz com que, as dosagens destes conservantes sejam administradas em concentrações traços. Atualmente, o método oficial para a quantificação dos parabenos é por meio da cromatografia gasosa (técnica laboriosa e de alto custo de manutenção). Como alternativa, opta-se pelo uso dos *quantum dots* (QD) para a determinação espectrofluorimétrica destes analitos. Esse tipo de metodologia é rápida, sensível, seletiva, reprodutível e mostra-se promissora para a detecção dos parabenos. O trabalho proposto, apresentou uma revisão sobre cosméticos, parabenos e nanopartículas. Na parte experimental, realizou-se a síntese dos parabenos, bem como sua caracterização e testes preliminares de análise empregando QDs. Na caracterização dos parabenos, observou-se que os mesmos foram sintetizados com eficiência. Posteriormente, empregou-se o AgInS₂-GHS para a obtenção da curva analítica baseada na supressão da luminescência do fluóforo, variando a concentração dos parabenos entre 0,0 e 50,0 mg L⁻¹, obtendo um resultado satisfatório [$y_{APHB} = 0,0030(\pm 0,005)x + 0,9825(\pm 0,0002)$; $R = 0,9932$ / $y_{MetPa} = 0,0049(\pm 0,0003)x + 0,9407(\pm 0,0116)$; $R = 0,9925$], demonstrando a viabilidade do método proposto para a análise de parabenos.

Palavras-Chave: Quantum Dots; Parabenos; Cosméticos; Conservantes; Espectrofluorimetria

Abstract

Cosmetics are products widely present in daily life of modern society. Because of this fact, public and private policies emphasize a necessity of great quality input generation, low cost, and mainly, nontoxic formulations. The high strict on cosmetics quality control has injected capital in sector, becoming the “top” of Fine Chemistry in several regions. This status has keeping itself up, for products which follow mainly Green Chemistry principles, where the masterpiece must be completely used during production process, making the smallest residue as possible. Among the most stuck-level inside sector, are use of preservatives (natural or synthetic) on products in general, which could show side effects somehow. Therefore, the work’s goal was propose an alternative method to analyze an organic preservatives group (parabens), potentially toxic, in cosmetics e suchlike products distributed in Pernambuco State. Its high microbial inhibition power makes these preservatives doses have been administered in traces-concentration. Currently the only method of parabens quantification is by Gas Chromatography (laborious technique and elevated maintenance cost). As an alternative, choose quantum dots (QDs) use to spectrofluorimetric determination of the analytes. This type of methodology is fast, sensible, selective, reproductive and has shown itself promising to parabens detection. The proposed work shows a review about cosmetics, parabens and nanoparticles. In the experimental stage, the parabens synthesis was accomplished, their description as well and analyze preliminary tests with quantum dots. On parabens description realized that those were synthesized with success. Posteriorly, employed AgInS₂-GHS to obtain an analytical curve based on fluorophore’s luminescence quenching, varying parabens concentration between 0,0 and 50,0 mg L⁻¹, making satisfactory results [$y_{\text{APHB}} = 0,0030(\pm 0,005)x + 0,9825(\pm 0,0002)$; $R = 0,9932$ / $y_{\text{MetPa}} = 0,0049(\pm 0,0003)x + 0,9407(\pm 0,0116)$; $R = 0.9925$) demonstrating the feasibility of the proposed method for parabens analysis.

Keywords: Quantum Dots; Parabens; Cosmetics; Preservatives; Spectrofluorimetry

Agradecimentos

À minha família pelo suporte e apoio incondicional;

Ao Professor André Fernando Lavorante, pela orientação e paciência;

Aos meus amigos da graduação (Danylo, Rapha, Camila, Maria, Natan, Líba, Carol e André) que me aguentaram reclamar do meu projeto quando nada dava certo

Aos amigos que fiz no Laboratório de Análise Química, Inorgânica e Sensores (LAQIS) que me ajudaram da forma que podiam quando precisei: Bia, Julyana, Nattany, Larissa, Zé, Nathália, Nayara, Lidi, Brother, Mirella, Gabriel, Moara, Reobe, Aline, Flor e Dani.

Aos profissionais que operaram algumas análises de Espectroscopia na Central Analítica (LABMAQ)

Aos envolvidos nas sínteses dos QDs no Laboratório de Eletrossíntese

À FACEPE pelo financiamento do projeto

“A vitória hoje tem sabor de mel”

- Damares

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	1
2.0	OBJETIVOS	3
2.1	OBJETIVO GERAL	3
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3.0	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1	COSMÉTICOS	4
3.1.1	Relevância Econômica	4
3.1.2	Toxicidade	5
3.1.3	Formulação	5
3.2	PARABENOS	6
3.3	MÉTODOS ANALÍTICOS	10
3.3.1	Espectrofluorimetria	10
3.3.1.1	Fotoluminescência	12
3.4	QUANTUM DOTS	16
4.0	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	20
4.1	MATERIAIS E REAGENTES	20
4.2	SÍNTESE DOS PARABENOS	21
4.3	TESTE DE SOLUBILIDADE	22
4.4	QUANTUM DOTS TERNÁRIOS	22
4.5	SOLUÇÕES TAMPÃO	24
4.6	CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA	24
4.7	ANÁLISE INSTRUMENTAL	24
4.7.1	Espectroscopia de Infravermelho (IV)	24
4.7.2	Espectroscopia de Absorção Eletrônica (UV-Vis)	25
4.7.3	Espectroscopia de Fluorescência	25
5.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	26
5.1.1	Parabenos	26
5.1.1.1	Espectroscopia na Região do Infravermelho	26
5.1.1.2	Espectroscopia de Absorção Eletrônica	28

5.1.1.3	Teste de Solubilidade	29
5.1.1.4	Rendimento das Sínteses orgânicas	29
5.1.2	Seletividade dos QDs	30
5.1.3	<i>Quantum Dot</i>: AgInS₂-GHS	31
5.1.3.1	Espectroscopia de Fluorescência e Absorção Eletrônica	31
5.2	TESTES FÍSICO-QUÍMICOS	32
5.2.1	Estudo da Influência do pH sobre o QD	32
5.2.2	Estudo da Estabilidade do QD.....	33
5.2.3	Construção da Curva Analítica.....	34
5.2.3.1	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico.....	34
5.2.3.2	Metilparabeno	35
6.0	CONCLUSÃO.....	36
7.0	PERSPECTIVAS.....	37
8.0	REFERÊNCIAS.....	38

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura dos principais parabenos usados como conservantes.....	07
Figura 2 - Esquema dos componentes de um espectrofluorímetro.....	11
Figura 3 - Diferenciação de processos fluorescentes e fosforescentes.....	12
Figura 4 - Diagrama de energia parcial de um sistema fotoluminescente.....	14
Figura 5 - Emissão de um QD em função do diâmetro da partícula.....	17
Figura 6 - Metodologia sintética do MetPa e EtPa.....	21
Figura 7 - Espectros de vibracionais do MetPa e EtPa.....	27
Figura 8 - Espectros de absorção do APHB, MetPa e EtPa.....	28
Figura 9 - Esquema de interação entre os analitos e os QDs.....	30
Figura 10 - Espectros de absorção, excitação e emissão do AgInS ₂ -GHS.....	31
Figura 11 - Influência do pH na fluorescência do QD.....	32
Figura 12 - Estudo do tempo reacional entre o QD e os analitos	33
Figura 13 - Curva analítica do APHB.....	34
Figura 14 - Curva analítica do MetPa.....	35

Lista de Quadros

Quadro A - Concentrações dos parabenos nas diferentes matrizes biológicas humanas.....	08
Quadro B - Materiais e Reagentes.....	20
Quadro C - Variações nos valores dos principais estiramentos das estruturas propostas.....	26
Quadro D - Teste de Solubilidade do APHB e dos Parabenos.....	27

Acrônimos, Siglas e Símbolos

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APHB – Ácido *p*-hidroxibenzóico

ATP – Adenosina trifosfato

ButPa – Butilparabeno

CCD – Cromatografia de camada delgada

CG – Cromatografia gasosa

cm – Centímetros

DMSO – Dimetilsulfóxido

EtPa – Etilparabeno

F₀/F – Sinal do branco/ponto da curva

GHS – Glutathione

IV – Região do infravermelho

K_f – constante de velocidade de 1ª ordem

K_{nr} – velocidade de relaxamento não radiativo

L – Litros

LES – Laboratório de Eletrossíntese

M – mol.L⁻¹

MetPa – Metilparabeno

mg – Miligramas

min – Minutos

mL – Mililitros

mmol – Milimols

n – Par Não-Ligante

ng – Nanogramas

nm – Nanômetros

PIB – Produto Interno Bruto

PropPa – Propilparabeno

QD – *Quantum Dot*

R – Coeficiente de correlação

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

s – Segundos

THF – Tetraidrofurano

UV – Ultravioleta

UV-Vis – Região do ultravioleta-visível

u.a. – Unidades arbitrárias

π – Elétron Pi

π* – Elétron Pi excitado

Φ – Rendimento Quântico

λ_{EX} – Comprimento de Onda de Excitação

λ_{EM} – Comprimento de Onda de Emissão

ν – Número de Onda

τ – Deformação Fora do Plano

2_{si} – Deformação Angular Simétrica

® – Marca Registrada

° – Graus

@ – Dopamento

1.0 INTRODUÇÃO

Os cosméticos são produtos presentes no cotidiano de nossa sociedade, devido à grande abrangência e aplicabilidade, seja para uso pessoal ou como ferramenta de trabalho. Esse grupo de insumos está relacionado com aspectos estéticos, medicinais e/ou terapêuticos. Por tal motivo, a indústria dos cosméticos é considerada o topo da pirâmide das aplicações químicas, porque requer estudos avançados e metodologias minuciosas para a produção destes materiais¹.

A indústria dos cosméticos vem apresentando grande força no mercado interno brasileiro, sendo expressa por uma fração relevante tanto em relação ao patrimônio quanto ao mercado de trabalho. Esse impacto econômico acarreta uma injeção de capital no setor, que por sua vez, visa cada vez mais à produção e disseminação destes cosméticos de origem natural ou sintética².

Por causa do seu alto valor agregado e pesquisas no ramo sobre suas potenciais toxicidades, os cosméticos vêm sendo produzidos com um rigoroso controle de qualidade, para aumentar a vida útil do material e o custo-benefício para o consumidor. Contudo, as políticas públicas e privadas do setor têm exigido uma produção com baixos impactos ambientais, com os princípios da Química Verde e, principalmente, a fabricação de produtos livres de conservantes.

Uma das classes de conservantes presentes nos cosméticos são os parabenos. A presença desses ésteres está associada à intoxicação de pessoas, e em casos mais graves, com a deformação no feto de mulheres grávidas que entram em contato com o industrializado que esteja fora dos parâmetros

¹ FURLANI, D.; SILVA, N.; NETZ, D. J. A. **Uso Cosmético de Patches**: um artigo de revisão. Florianópolis, 2012

² DIAS, L. L. **Os Benefícios Da Economia Compartilhada Para Grandes Grupos Industriais De Cosméticos No Brasil**, 2018, p. 30-38. Monografia (Bacharelado em Economia), Universidade Federal do Rio de Janeiro

aceitos³. Os parabenos possuem um poder conservativo muito destacado devido à sua grande estabilidade em faixas largas de pH, tendo ação bactericida e fungicida dos respectivos pHs ideais para cada agente deteriorante no cosmético. O método atual de detecção e quantificação desses ésteres é por meio da cromatografia gasosa (CG), uma técnica que requer boas instalações para operar, manuseio laborioso e qualificado, além de preço elevado⁴.

Devido à complexidade da matriz cosmética, foi necessário aplicar uma metodologia sensível, rápida, reprodutível e seletiva para a determinação dos parabenos. Os métodos espectrofluorimétricos apresentam todos os requisitos necessários para esse tipo de análise. Essa metodologia se baseia na excitação e emissão de luz por meio de compostos químicos e por suas interações com a radiação eletromagnética. A natureza da interação pode aumentar ou suprimir a emissão luminosa.

Os *Quantum Dots* (QD) são nanopartículas metálicas luminescentes que possuem aplicação como marcadores, biossensores e serão utilizadas nesse estudo⁵. Por meio da supressão luminescente dos QDs causada pela interação com os parabenos, será possível quantificar esses analitos nas matrizes cosméticas.

Toma-se como objetivo desse trabalho o desenvolvimento de uma metodologia alternativa à CG para a determinação espectrofluorimétrica de parabenos em matrizes cosméticas empregando QD. A inovação deste trabalho está na aplicação de nanopartículas metálicas ternárias na aplicação de espécies orgânicas. Na literatura é disponível muitos artigos que empregam QDs binários na determinação de íons, mas nada que remete-se ao proposto nesta pesquisa.

³FERNANDES, J. P. S.; SAVINO, G.; AMARANTE, A. C. G. Estudo Das Relações Entre Estrutura E Atividade De Parabenos: Uma Aula Prática. **Química Nova**, vol. 36, nº 6, 2013, p. 890-893.

⁴MELO, L. P. **Desenvolvimento De Métodos Cromatográficos Para Análises De Antimicrobianos Em Amostras Complexas**. 2012, p. 25-41. Tese (Doutorado em Química), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

⁵SILVA, F. O. *et al.* O Estado Da Arte Da Síntese De Semicondutores Nanocristalinos Coloidais. **Química Nova**, vol. 33, nº9, 2010, p. 1933-1939.

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma nova metodologia para a quantificação de parabenos em cosméticos alternativa à cromatografia gasosa, empregando *quantum dots*

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar (por espectroscopia de absorção e vibração) um pequeno grupo de parabenos para testá-los com os QDs ternários;
- Diferenciar o perfil químicos das espécies sintetizadas por testes de solubilidade;
- Avaliar a seletividade de diferentes QDs para diferentes tipos de parabenos;
- Otimizar as variáveis físico-químicas para a determinação dos analitos (pH e tempo de estabilização).

3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 COSMÉTICOS

Os cosméticos são classificados como produtos cuja função é adornar, perfumar, limpar, além de alterar ou corrigir algum problema estético na parte corporal externa de interesse do consumidor. Dentre as partes abrangidas estão o sistema capilar, lábios, unhas, pele, dentes e mucosa oral. Suas composições podem variar, contudo, geralmente são encontradas vitaminas, antioxidantes, extratos vegetais e minerais na formulação destes cosméticos⁶.

Esses produtos são amplamente consumidos nas mais diversas classes sociais devido a dois principais motivos: a razão estética e a medicinal. No viés estético estão as justificativas supracitadas, enquanto no viés medicinal, os cosméticos podem agir como tratamento parcial ou interino de algumas enfermidades, como dermatites e sensibilidade aguda a luz solar. Estudos já apontam que a elevação da autoestima e diminuição no índice depressivo também se dá pelo uso de insumos desta categoria⁷.

3.1.1 Relevância Econômica

No que se refere ao *ranking* mundial de produção consumo e exportação cosméticos, o Brasil ocupa a quarta colocação, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, China e Japão. Atualmente, a produção brasileira representa metade do quantitativo dos países latino americanos. Dentre os setores produtivos nacionais, o mercado de cosméticos e higiene é um dos poucos que cresceu acima do PIB na última década, mesmo em períodos de crise econômica. No ano de 2017 a indústria dos cosméticos arrecadou em torno de 102 milhões de reais, que equivale a um crescimento 2,75% em relação ao ano anterior. Todo esse impacto econômico está associado ao investimento no

⁶BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **RDC nº.48, de 25 de outubro de 2013**, publicada no Diário Oficial da União em 19/09/2013.

⁷STREHLAU, V. I.; CLARO, D. P.; LABAN NETO, S.A. A vaidade impulsiona o consumo de cosméticos e de procedimentos estéticos cirúrgicos nas mulheres? Uma investigação exploratória. **Revista de Administração**, São Paulo, Vol. 50, nº1, 2015, p. 73-88.

controle de qualidade dos insumos, por meio das políticas públicas e privadas no setor. Esses dados expressivos têm atraído olhares mais atentos para o ramo, assim como investimento internos e externos⁸.

3.1.2 Toxicidade

Os produtos cosméticos podem estar veiculados de diferentes apresentações (gel, loção, creme, pasta etc.), tendo a forma mais apropriada para cada tipo de aplicabilidade. A princípio os cosméticos deveriam ser completamente inertes ou farmacologicamente inativos, todavia, a administração incorreta do produto pode ocasionar reações colaterais indesejadas. Por isso que estes insumos são classificados em duas categorias de risco. A primeira é a mais abrangente, onde estão agrupados os produtos que não necessitam informações detalhadas quanto ao seu modo de usar e suas restrições de uso, como perfumes ou creme de cabelo. No segundo grupo de risco estão espécies como os esfoliantes químicos, desodorantes íntimos, e filtros UV ⁹.

3.1.3 Formulação

Dependendo na natureza do cosmético (sintética ou natural), o produto pode apresentar um leve caráter perecível. Visando conter perdas econômicas, a industrial produtiva recorre muitas vezes ao uso de conservantes, que em determinadas concentrações podem trazer riscos à saúde. Substâncias como formaldeído, tensoativos e parabenos são as espécies com maior recorrência na produção dos cosméticos. Materiais como corantes ainda são tolerados, devido ao valor agregado ao insumo final, e que, dificilmente geram desconfortos aos compradores (exceto em casos de alergia)¹⁰.

⁸ ABIHPEC. Associação Brasileira De Indústria De Higiene Pessoal, Perfumaria E Cosméticos, **Panorama do Setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos**, 2017.

⁹ABIHPEC. Associação Brasileira De Indústria De Higiene Pessoal, Perfumaria E Cosméticos, 2019.

¹⁰CHORILLI, M. *et al.* Toxicologia dos Cosméticos. **Latin American Journal of Pharmacy**, vol. 26, 2007, p. 144-154.

3.2 PARABENOS

São comumente chamados de parabenos os vários ésteres derivados do ácido-4-hidroxibenzóico (APHB), usualmente utilizados como conservantes em matizes cosméticas¹¹. Os parabenos mais usados são o metilparabeno (MePa), etilparabeno (EtPa), propil e butilparabenos (PropPa; ButPa) respectivamente, devido às suas maiores polaridades (menores cadeias carbônicas substituintes) tornando-se ideais para as matrizes aquosas de formulação da maioria dos cosméticos, como ilustrado na figura 1. Fisicamente são sólidos brancos, com odor característico, com alta solubilidade em água e, principalmente, um elevado poder antimicrobiano. Seu poder de inibição aumenta ao passo do tamanho da cadeia carbônica substituinte do éster, porém mesmo sendo comprovado este estudo, o mecanismo de aniquilação fungicida e bactericida ainda é desconhecido e considerado complexo¹².

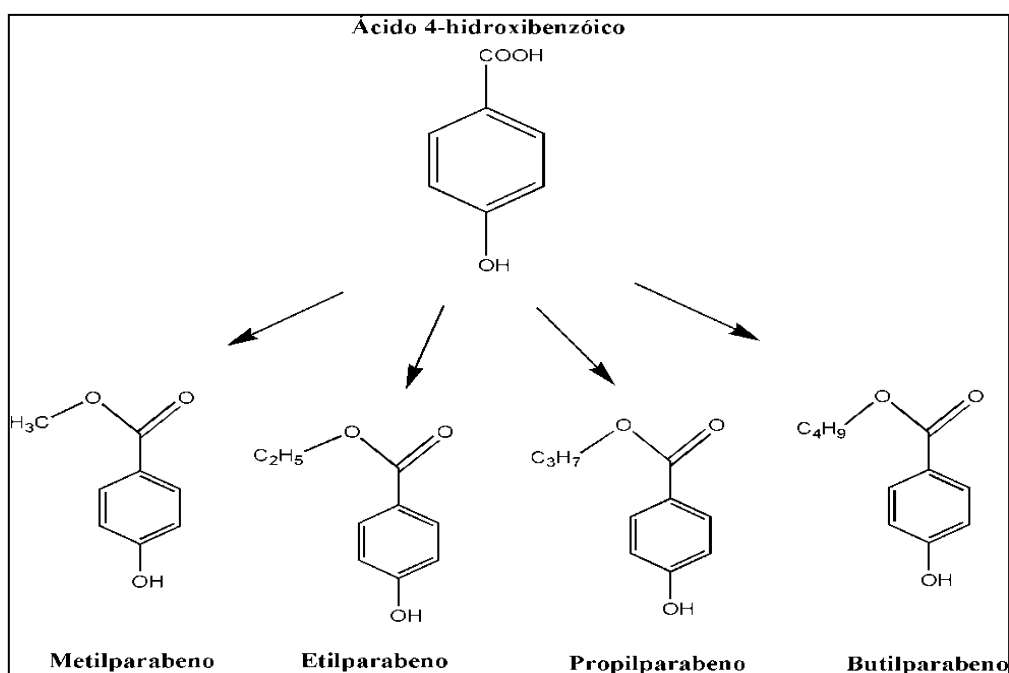
É relatado na literatura que o processo de absorção dos parabenos em humanos se dá no sistema gastrointestinal, após sua hidrólise ao ácido que lhe deu origem e que sua excreção ocorre em períodos curtos (menores que 12 horas). Contudo, estudos demonstram que em tecidos cancerígenos, principalmente de gestantes, há um alto teor de parabenos de fontes extrínsecas, depositados ali por bioacumulação¹³.

¹¹CABALEIRO, N. *et al.* An Overview Of Sample Preparation For The Determination Of Parabens In Cosmetics. **TrAC, Trends Anal. Chem.** Vol. 57, 2014, p.34-46

¹²RIBEIRO, G. L. O. **Desenvolvimento E Validação De Método Analítico Para Análise De Parabenos Em Tecido De Peixes.** 2014, p. 04-13. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade de São Carlos.

¹³NOWAK, K. *et al.* Parabens And Their Effects On The Endocrine System. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Vol. 474, 2018, p. 238-251.

Figura 1 - Estrutura dos principais parabenos usados como conservantes



Fonte: própria

O excesso de parabenos no meio biológico pode se dar ao uso de cosméticos que não estejam dentro dos padrões estabelecidos pelas instituições reguladoras. O público mais sensível a esse tipo de oscilações são as mulheres grávidas. Estudos apontam que mudanças na placenta estão associadas aos altos teores de parabenos, podendo acarretar a deformação do feto nos casos mais expressivos¹⁴. A tabela A ilustra o teor médio destas espécies em diferentes meios do corpo humano, evidenciando principalmente a presença desses conservantes nos tecidos da placenta.

Em amostras de urina humana aparece um nível razoável de ésteres, que se acredita não ter sido metabolizados pelo pouco tempo de permanência no corpo ou pela proximidade da via de entrada no mesmo (natureza do cosmético e a região de aplicação) com o sistema excretor¹⁵.

¹⁴KOLATOROVA, L. *et al.* Exposure To Bisphenols And Parabens During Pregnancy And Relations To Steroid Changes. **Environmental Research**, vol. 163, 2018, p.115-122.

¹⁵HONDA, M.; ROBINSON, M.; KANNAN, K. Parabens In Human Urine From Several Asian Countries, Greece, And The United States. **Chemosphere**, Vol. 201, 2018, p.13-19

**Quadro A - Concentrações dos parabenos nas diferentes matrizes
biológicas humanas**

Matriz Biológica	MePa (ng/mL)	EtPa (ng/mL)	PropPa (ng/mL)	ButPa (ng/mL)	Total (ng/mL)
Urina	6,58 - 64,6	0,490 - 5,35	0,850 - 14,0	0,090 – 1,01	0,090 - 64,6
Plasma	0,990 - 2,31	0,140 - 0,330	0,390 - 1,45	0,060 - 0,220	0,060 - 2,31
Soro	0,890 - 3,64	0,440	0,230 - 0,630	Não quantificado	0,230 - 3,64
Leite	0,320 - 3,04	Não quantificado	0,330	Não quantificado	0,320 - 3,04
Saliva	Não quantificado	Não quantificado	Não quantificado	Não quantificado	0,200 - 0,300
Placenta	0,200 - 10,0	0,200 - 5,30	0,200- 2,20	0,200 - 0,600	0,200 - 10,0
Tecido de câncer de Mama	Não quantificado	Não quantificado	Não quantificado	Não quantificado	1,05 - 3,75

Adaptado de [4]

No Brasil, na lista de conservantes permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da RDC 29/2012, estabelece que a concentração máxima permitida para o ácido 4-hidroxibenzóico, seus sais e ésteres (parabenos) é de 0,4 % (expresso como ácido), no uso individual, e 0,8 % (expresso como ácido), para misturas dos sais ou ésteres¹⁶.

A exposição humana aos parabenos foi estimada, em média, de 76 mg/dia, sendo 1mg/dia, aproximadamente, através dos consumos de alimentos;

¹⁶BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 29 de 01 de junho de 2012**, publicada no Diário Oficial da União em 04/16/2012.

25 mg/dia, ao ingerir medicamentos e 50 mg/dia, através do uso de cosméticos e produtos de higiene pessoal^{17,18}.

Diversos estudos têm sugerido uma atividade estrogênica dos parabenos *in vivo* e *in vitro* devido a uma propriedade de bioacumulação no meio. Pouco se sabe sobre essa hipótese, porém nota-se a necessidade de esclarecimento do comportamento destes conservantes no corpo humano¹⁹.

¹⁷OCANÃ-GONZÁLEZ, J. A. *et al.* New Developments In The Extraction And Determination Of Parabens In Cosmetics And Environmental Samples. A Review. **Analytica Chimica Acta**, Vol. 858, 2015, p. 1-15.

¹⁸JARDIM, V. C. *et al.* Determination Of Parabens In Urine Samples By Microextraction Using Packed Sorbent And Ultra-Performance Liquid Chromatography Couples To Tandem Mass Spectrometry. **Journal Of Chromatography**, vol. 974, 2015, p. 35-41.

¹⁹MOOS, R. K. *et al.* Rapid Determination Of Nine Parabens And Seven Other Environmental Phenols In Urine Samples Of German Children And Adults. **International Journal Of Hygiene And Environmental Health**, Vol. 217, n º8, 2014, p. 845-853.

3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

A Química Analítica é a subárea da ciência que se responsabiliza pelo estudo e desenvolvimento de metodologias e tecnologias para determinação qualitativa e/ou quantitativa de diferentes analitos, dispersos nas mais variadas matrizes²⁰.

Por convenção os métodos analíticos foram separados em dois grupos: clássicos e modernos. Dentre as consideradas clássicas estão as metodologias gravimétricas, volumétricas e eletroquímicas simples. No segundo grupo, estão fundamentados os diferentes tipos de microscopia, análises espectroscópicas e técnicas eletroquímicas avançadas²¹.

3.3.1 Espectrofluorimetria

A espectrofluorimetria é uma técnica espectroscópica que mede a intensidade da resposta que a radiação eletromagnética causa em determinadas espécies, ocasionando fenômenos luminescentes induzidos. Esta, por sua vez, enquadra-se nas metodologias modernas, e tem como principais características a alta sensibilidade, rapidez nas determinações, reprodutibilidade, seletividade e vasta aplicabilidade no meio químico investigativo²².

As análises espectrofluorimétricas podem ser realizadas de formas diretas ou indiretas, o critério de escolha vai depender da natureza do analito. No método direto, a espécie fluorescente já é o próprio analito, visto que sua intensidade de fluorescência é proporcional a sua concentração no meio. A quantificação fica restringida à leitura de soluções de referência e, em seguida, a construção de uma curva analítica. Durante as análises indiretas se dispõe de uma espécie luminescente já conhecida, que terá sua intensidade suprimida (*quenching*) ou realçada (*enhance*) pela analito devido às interações intermoleculares. Os métodos indiretos apresentam maior popularidade entre a

²⁰ MENDHAM, J. *et al.* **Vogel: Análise Química Quantitativa**, 6 ed., Londres: LTC, 2002, p. 001-006.

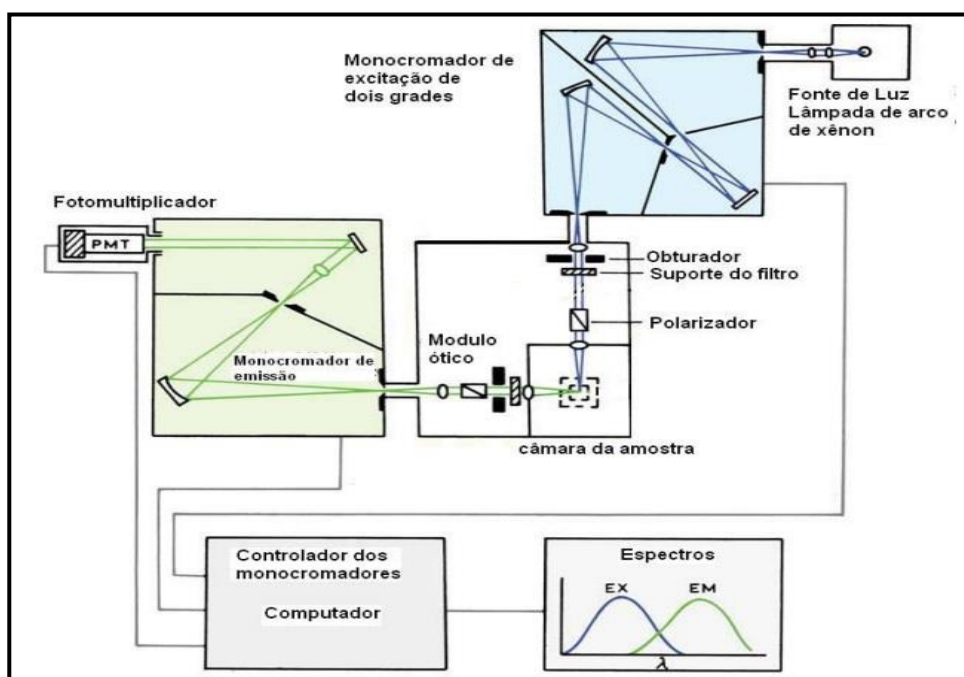
²¹ MENDHAM, J. *et al.* **Vogel: Análise Química Quantitativa**, 6 ed., Londres: LTC, 2002, p. 351-355

²² MEIRA, M. *et al.* Identificação De Adulteração De Biocombustível Por Adição De Óleo Residual Ao Diesel Por Espectrofluorimetria Total 3d E Análise Das Componentes Principais, **Química Nova**, vol. 34, nº4, 2011, p. 621-624.

comunidade científica, especificamente pelas metodologias baseadas em supressão, tendo em vista que, os fenômenos de realce são bem raros²³.

O equipamento responsável pela quantificação da energia absorvida e emitida por compostos fluorescentes é chamado de espectrofluorímetro. Ele é composto por uma fonte de radiação que varre a região do ultravioleta até o visível (geralmente lâmpada de arco de xenônio); dois monocromadores arranjados em 90° com finalidade de selecionar comprimentos de onda específicos para cada tipo de radiação (excitação e emissão); compartimento ao abrigo da luz para as amostras e, por fim, um detector. Vinculada a interface do usuário, o espectrofluorímetro é capaz de obter espectros de compostos fluorescentes e, a partir, desses quantificar a intensidade da radiação emitida e averiguar as “marcas” de cada substância pelos seus comprimentos de excitação e emissão e bandas espectrais. Os espectros obtidos relacionam o comprimento de onda (ordenadas) com a intensidade de fluorescência (abscissas). A ilustração do equipamento é vista na figura 2.

Figura 2 - Esquema dos componentes de um espectrofluorímetro



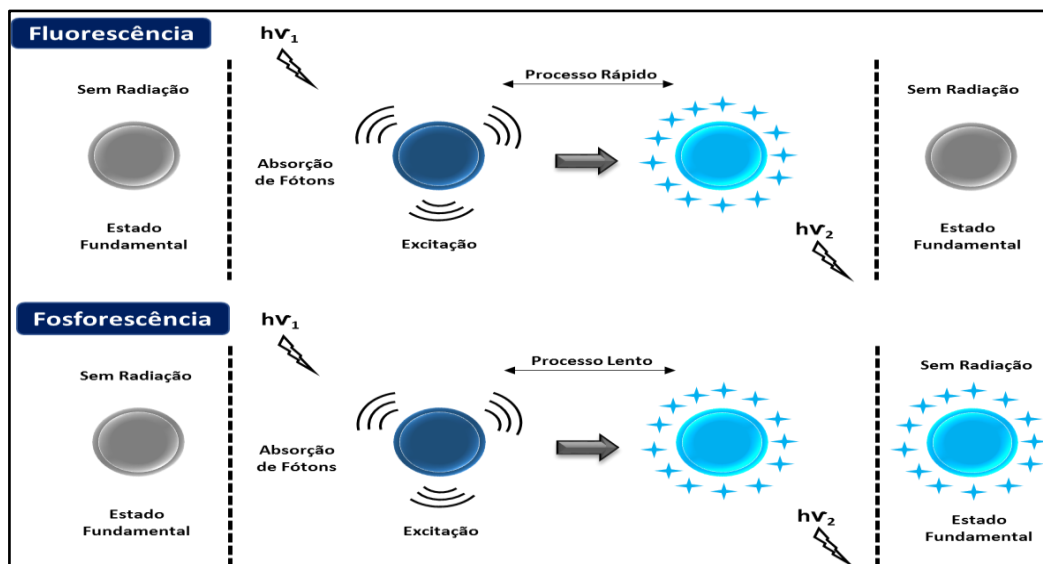
Fonte: retirado de [25]

²³VALEUR, B. **Molecular Fluorescence**: Principles and Applications, New York: Wiley-VCH, 2001, p. 03-16.

3.3.1.1 Fotoluminescência

A fotoluminescência ou luminescência molecular é um processo onde espécies químicas são excitadas e promovidas a estados de maior energia e, posteriormente, retornam ao seu estado fundamental após emissão de luz. A natureza deste fenômeno é bem peculiar, pois, difere-se dos eventos incandescentes, por estes estarem sempre vinculados ao aumento no fluxo de calor e elevação na temperatura do ambiente. Essa classe de composto pode ser dividida em dois grupos: espécies fluorescentes e fosforescentes. A diferenciação desses grupos pode ser observada pela natureza das transições eletrônicas envolvidas e o tempo que o fenômeno acontece. Em processos fosforescentes temos transições do tipo singleto \rightarrow tripleto, consideradas “proibidas”. A mudança de multiplicidade no processo cria certa repulsão entre os elétrons que retornarão estado fundamental e por isso o tempo para a emissão é longo. Em contrapartida, materiais fluorescentes apresentam transições que mantêm sua multiplicidade (singleto \rightarrow singleto), logo o tempo de emissão é muito curto²⁴ (ilustrado na figura 3).

Figura 3 - Diferenciação de processos fluorescentes e fosforescentes



Fonte: própria (adaptado do google)

²⁴GUSSO, P. K. **Caracterização Fluorimétrica Da Matéria Orgânica Dissolvida E Sua Relação Autóctone/Alóctone Na Baía De Paranaguá**, 2008, p. 08-13. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação), Universidade Federal do Paraná.

A fluorescência é caracterizada por transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ (emissão intensa de luz) ou $n \rightarrow \pi^*$ (emissão pouco intensa de luz) referentes aos possíveis singletos que a espécie apresenta. Fatores estruturais da molécula, ambiente químico (pH, concentração, tipo de solvente) e fenômenos como transferência de carga (efeito antena) também podem influenciar na resposta física do analito²⁵.

A convenção para os químicos quanto à intensidade da luminescência foi chamada de rendimento quântico (Φ). Por definição matemática, este é a razão entre a quantidade de moléculas que estão emitindo em relação as que foram excitadas (equação 01). A maioria das substâncias apresenta valores de rendimento quântico $\ll 0,1$. Ao se estudar essa classe de compostos atribuiu-se características para certas substâncias serem fluorescentes e outras não. A molécula deve apresentar os seguintes fatores: estrutura plana e rígida; ter anéis aromáticos condensados, rico em insaturações, e possuir heterocíclicos com elementos como oxigênio ou nitrogênio²⁶.

$$\Phi = \frac{K_f}{K_f + K_{nr}} \quad (1)$$

Onde:

K_f = constante de velocidade de 1ª ordem

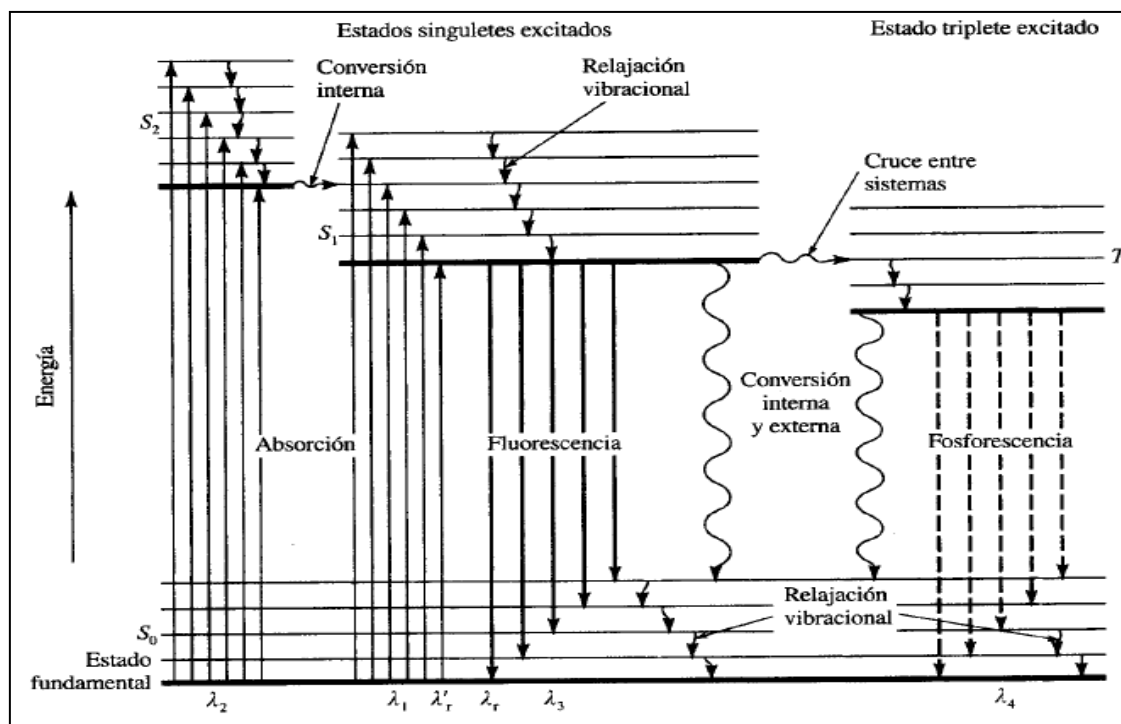
K_{nr} = velocidade de relaxamento não radiativo

Quando excitados, compostos fluorescentes perdem frações da energia por ações não radiativas (relaxamento, vibrações, colisões com as moléculas do solvente) porém, a parte remanescente desta é liberada pela emissão de radiação que pode ser observada na forma de luz^{20, 25, 26}. Na figura 4 é ilustrado como ocorrem essas etapas para cada processo.

²⁵SKOOG, D. A. *et al. Fundamentos da Química Analítica*, 9 ed., São Paulo: Cengage Learning, 2012, p. 753-763.

²⁶VALEUR, B. LERAY, I. Design Principles of Fluorescent Molecular Sensors for Cation Recognition, **Coordination Chemistry Reviews**, vol. 205, 2000, p. 03-40.

Figura 4 - Diagrama de energia parcial de um sistema fotoluminescente



Fonte: retirado de [27]

Durante o processo de absorção e emissão para a liberação de radiação, o processo de luminescência, pode haver algum tipo de retardo e o fenômeno acontece em intervalos instantâneos (fluorescência) ou até maiores que vários dias (fosforescência)²⁷.

Baseando no fenômeno da fluorescência é que se desenvolveram as análises espectrofluorimétricas. Este método é muito mais eficaz que o colorimétrico e espectrofotométrico devido a sua maior seletividade e sensibilidade²¹.

Os espectros de emissão são produzidos com a excitação em comprimento de onda fixo e o espectro é referente à intensidade da emissão em função do comprimento de onda da emissão. A diferença entre os valores de excitação e emissão chama-se deslocamento de Stokes²⁸. A partir do

²⁷SKOOG, D. A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análisis Instrumental**, 5 ed., Madrid: McGRAW-HILL, 2001, p. 381-407

²⁸SUKHORUKOV, V. L. *et al.* Many-Electron Dynamics Of Atomic Processes Studied By Photon-Induced Fluorescence Spectroscopy. **Physics Reports**, vol. 10, 2018.

comportamento de determinada espécie frente à radiação é possível quantificá-la por métodos quali e quantitativos, através de espectros de varredura e construção de curvas analíticas, respectivamente²⁹.

Existem também fenômenos de luminescência em sistemas que não contém fontes de radiação eletromagnética. Algumas reações químicas geram intermediários que possuem excesso de energia e emitem luz no final da reação. Tal caso é conhecido como quimioluminescência, sendo recorrentes em detecções de gases como ozônio e óxido nítrico. Quando reações deste tipo se procedem em meios vivos se nomeia como bioluminescência. Os principais componentes reacionais neste caso são o gás oxigênio e o ATP. Formas de vida como pepino-do-mar, lulas e o vaga-lumes são os principais representantes deste tipo de reação^{25, 26, 27}.

²⁹SCHNEIDER, L. B. **Fluoróforos Sintéticos Naturais Para Aplicações Em Diagnósticos**, 2014, p. 10-17; 78-84.

3.4 QUANTUM DOTS

Quantum dots ou nanopartículas semicondutoras coloidais emergem com uma nova classe de fluóforos (espécies fluorescentes) com produção científica significativamente ascendente na última década. Classificados como materiais em escala ≤ 10 nm que apresentam propriedades fotoquímicas em função do tamanho da espécie. São geralmente constituídos de um metal principal, dopado com algum semimetal, e em alguns casos apresentam também ametais (grupo dos calcogênios)³⁰. Algumas formulações empregam metais pesados como a prata ou o cádmio e, por tal, pode representar limitações para as suas aplicações biológicas, devido à conhecida toxicidade e potencial risco ambiental associado a este elemento³¹.

Os QDs apresentam os portadores de carga (buracos e elétrons) em um estado de forte confinamento quântico, o que faz com que estes materiais possuam propriedades ópticas apreciáveis. Quanto maior o diâmetro da partícula, maior será o comprimento de onda de emissão (figura 5), deslocando-se para a região do vermelho (*red-shift*). O motivo por trás desse fenômeno é a mudança na área superficial da nanopartícula, influenciando diretamente na aproximação do agente estabilizante, que possa, desta forma, melhorar seu desempenho emissivo. Grandes diâmetros de partícula têm menor área superficial ativa, direcionando a aplicação do material³². QDs menores, são mais difíceis de ser sintetizados e purificados, e por tal, devem ter aplicações com maior especificidade com biossensor ou marcador de fármacos. Em contrapartida, os materiais de maior raio, são mais facilmente obtidos e por isso podem ter designações mais triviais, como desenvolvimento de LEDs, por exemplo.

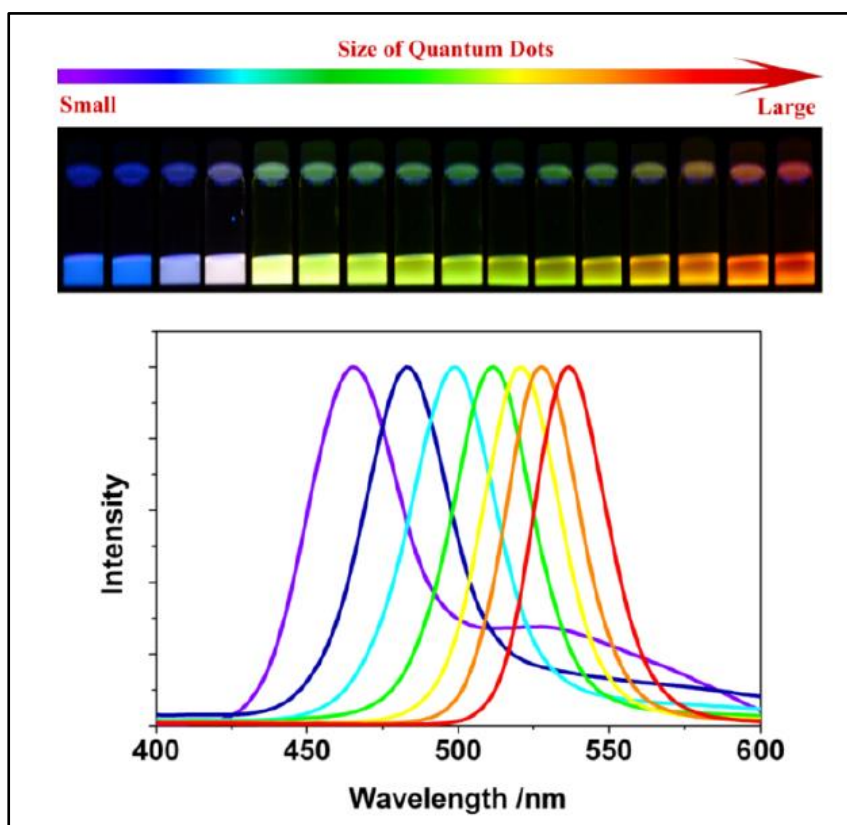
³⁰DIAS DA SILVA, L. G. G. V.; LEWENKOPF, C. H.; STUDART, N. Orbital Magnetic Properties Of Quantum Dots: The Role Of Electron-Electron Interactions. **PHYSICAL REVIEW B**, vol. 69, 2014.

³¹ MACHADO, C. E. *et al.* Carbon Quantum Dots: Chemical Synthesis, Properties And Applications. **Rev. Virtual de Química**, vol. 7, nº 4, 2015, p. 1306-1346.

³²YANG, M. *et al.* Zn/Cd Ratio-Dependent Synthesis Conditions In Ternary ZnCdS Quantum Dots. **Journal of Alloys and Compounds**, vol. 752, 2018, p. 260-266.

As sínteses destas partículas fluorescentes podem ser realizadas por dois métodos distintos: *top-down* e *bottom-up*. O primeiro utiliza técnicas físicas partindo de nanocristais que induzem a formação do agregado coloidal. Em contrapartida, o método *bottom-up* parte de soluções dos componentes metálicos e dopantes, até o ponto da nucleação, seguida da estabilização do meio causada pela adição de um agente surfactante. Os principais tensoativos utilizados são a glutatona e outros tiocompostos similares³³. Vários trabalhos na literatura definem as sínteses de QDs pouco complexas, contudo, a produção de um grande quantitativo (volume de suspensão coloidal) torna-se comprometida, devido à dificuldade de gerar partículas com o tamanho uniforme.

Figura 5 - Emissão de um QD em função do diâmetro da partícula³⁴



Fonte: retirado de [34]

³³ RAMOS, N. S. M. *et al.* Cysteamine-Cdte Quantum Dots Electrochemically Synthesized as Fluorescence Probe For Resveratrol. **Food Analytical Methods**, vol. 11, 2018, p. 3371-3379.

³⁴ BERA, D. *et al.* Quantum Dots And Their Multimodal Applications: A Review. **Materials Journal**, Vol. 3, 2010, p. 2260-2345.

É relatado na literatura o uso de recursos para aprimorar a estabilidade do sistema coloidal e sua resistência foto-oxidativa a partir do uso de semicondutores do tipo concha-núcleo (CdSe@ZnS, por exemplo). Essa modalidade é formada por uma combinação de dois semicondutores distintos, em que um deles constitui o caroço (*core*), que é recoberto por uma camada externa (*shell*) de natureza oposta. Essa combinação eleva o rendimento quântico de fotoluminescência, e vida útil do QD³⁵.

O rendimento quântico (Φ) de um QD pode oscilar de acordo com fatores internos e externos. Temperatura, pH do meio e presença de contaminantes são alguns exemplos que se enquadram no fenômeno previamente citado³⁶. Quando a intensidade de emissão não é mais proporcional a concentração do fluóforo, dizemos que isso é resultado de um fator intrínseco, chamado de efeito do filtro interno. Tal fenômeno é resultado da fuga da linearidade de um composto fluorescente devido a sua alta concentração, e por tal, não podemos afirmar mais que a fluorescência é proporcional ao teor do analito no sistema²¹.

Em casos extremos, analitos podem interagir muito intensamente com os QDs, ocasionando a supressão total de sua fluorescência (processo *turn off*). Esse tipo de interação é muito específico e, por isso, a mínima mudança na estrutura eletrônica do supressor, invalida o efeito causado no QD (processo *turn on*)³⁷. A maioria dos trabalhos publicados na área de nanopartículas semicondutoras coloidais (com espécies binárias), faz uso dos métodos fluorescentes indiretos de detecção (*quenching* / *turn on-off-on*) de diferentes substâncias. Ao tratar de QD, o tipo de supressão é um ponto crucial que se deve levar em conta na análise química. A natureza do fenômeno é caracterizada com

³⁵FREITAS, D. V. *et al.* Toward Greener Electrochemical Synthesis Of Composition-Tunable Luminescent Cdx-Based (X= Te, Se, S) Quantum Dots For Bioimaging Cancer Cells. **Sensors and Actuators B: Chemical**, vol. 250, 2017, p. 233-243.

³⁶ DE SOUZA, G. C. S. *et al.* Employment Of Eletrochemically Synthesized TGA-Cdse Quantum Dots For Cr⁺³ Determination In Vitamin Supplements. **Talanta**, vol. 144, 2015, p. 986-991.

³⁷ HUANG, S. *et al.* Graphene Quantum Dots As On-Off-On Fluorescent Probes For Chromium (VI) And Ascorbic Acid. **Microchim Acta**, 2015.

dinâmica ou estática, onde o tempo de emissão e o grau de diminuição na luminescência variam de acordo com o fator de temperatura³⁸.

³⁸ PAN, B. *et al.* Quantitative Identification Of Dynamic And Static Quenching Of Ofloxacin By Dissolved Organic Matter Using Temperature-Dependent Kinetic Approach. **Environmental Pollution**, vol. 161, 2012, p. 192-198.

4.0 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

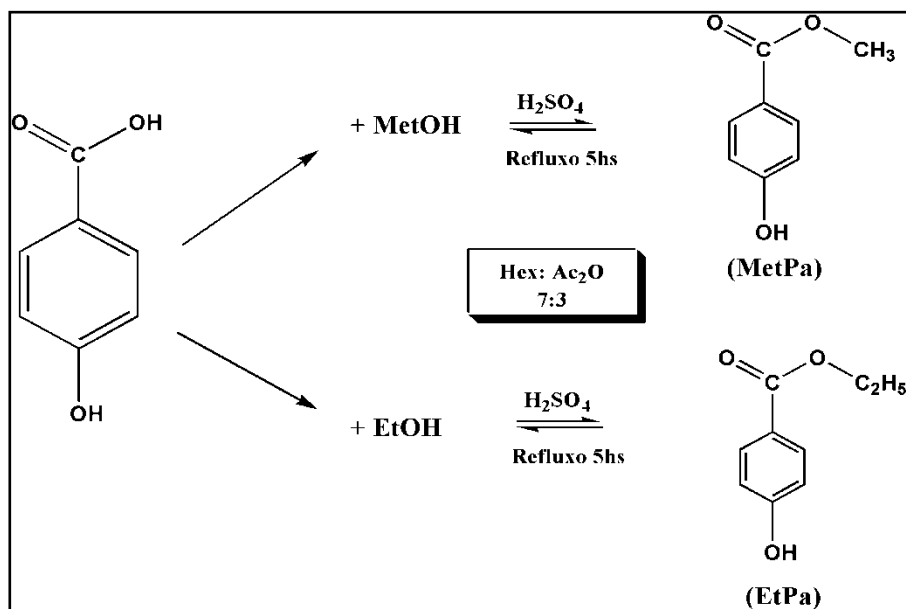
4.1 MATERIAIS E REAGENTES

Quadro B - Materiais e Reagentes	
Espécie Química	Procedência
Acetato de Etila	Anidrol
Acetona	Química Moderna
Ácido 4-hidroxibenzóico	AcrosOrganics
Ácido Acético Glacial	VWR Chemicals
Clorofórmio	Dinâmica
Dimetilsulfóxido	Vetec
EtOH Anidro	Cinética
Hexano	Dinâmica
H ₂ SO ₄	Synth
MetOH	Vetec
Na ₂ CO ₃	-
NaAc•3H ₂ O	Anidrol
QD – AgInS ₂ - GHS	LES
QD – AgInS ₂ @ZnS	LES
Tetraidrofurano	Dinâmica

4.2 SÍNTESE DOS PARABENOS

A síntese dos parabenos se baseou numa esterificação de Fischer clássica a partir do ácido 4-hidroxibenzoico, com o respectivo álcool (metílico e etílico), utilizando o H_2SO_4 como catalisador. Pesou-se 10 mmols do APHB que posteriormente foi dissolvido em 15 mL do álcool de interesse misturados a 0,5 mL do H_2SO_4 concentrado. O sistema foi deixado sob agitação por 1h. Após o tempo reacional o sistema foi neutralizado com uma solução aquosa de Na_2CO_3 1,0 mol.L⁻¹, até atingir o pH na faixa de 9,0. O meio alcalino incitou a precipitação parcial dos ésteres, que foram filtrados e secos em dessecador³. Para garantir a completa quantificação dos parabenos o meio sofreu adição de acetato de etila a fim de extrair qualquer remanescente das espécies na fase sobrenadante. Posteriormente a fase orgânica foi rotoevaporada e os sólidos obtidos foram quantificados e devidamente reservados. A reação foi acompanhada com placa CCD, num sistema de eluição 7:3 (hexano:acetato). Todo o esquema sintético é demonstrado na figura 6.

Figura 6 - Metodologia sintética do MetPa e EtPa



Fonte: própria

³FERNANDES, J. P. S.; SAVINO, G.; AMARANTE, A. C. G. Estudo Das Relações Entre Estrutura E Atividade De Parabenos: Uma Aula Prática. **Química Nova**, vol. 36, nº 6, 2013, p. 890-893.

4.3 TESTE DE SOLUBILIDADE

O teste de solubilidade consistiu na adição do 2,0 mg do respectivo composto de interesse em tubos de ensaio que contém o respectivo solvente de estudo (água destilada; etanol; acetona, DMSO, THF, clorofórmio e metanol). O sistema é agitado por 30 segundos e o perfil de miscibilidade é verificado.

4.4 QUANTUM DOTS TERNÁRIOS

Os QDs foram produzidos no Laboratório de Eletrossíntese (LES), do Departamento de Química Fundamental, da Universidade Federal de Pernambuco e, gentilmente, cedidos aos envolvidos neste projeto. Entre eles estão o AgInS₂-glutathiona e AgInS₂@ZnS testados no trabalho.

Foram utilizados sem prévio tratamento: AgNO₃ (≥ 99 %), NaClO₄ (≥ 98 %), S⁰ (pó, 99,9 %, 100 mesh), L-glutathiona (reduzida, ≥ 99,8 %), grafite (tamanho de partícula < 20 μm) obtidos pela Sigma Aldrich. In(NO₃)₃ (≥ 99,99 %) obtido pela Alpha Aesar. NaNO₃ (≥ 98 %) e NaOH (> 98 %) obtidos pela Vetec. Água deionizada grau Mili-Q (17.3 Ωcm).

As eletrorreduções dos calcogênios foram realizadas no potenciostato/Galvanostato modelo PCSTAT 30 (Metrohm Autolab), operando com o software Nova 2.2. Utilizou-se um experimento cronopotenciométrico, onde o processo de redução dos calcogênios sob a forma elementar foi controlado por corrente/carga.

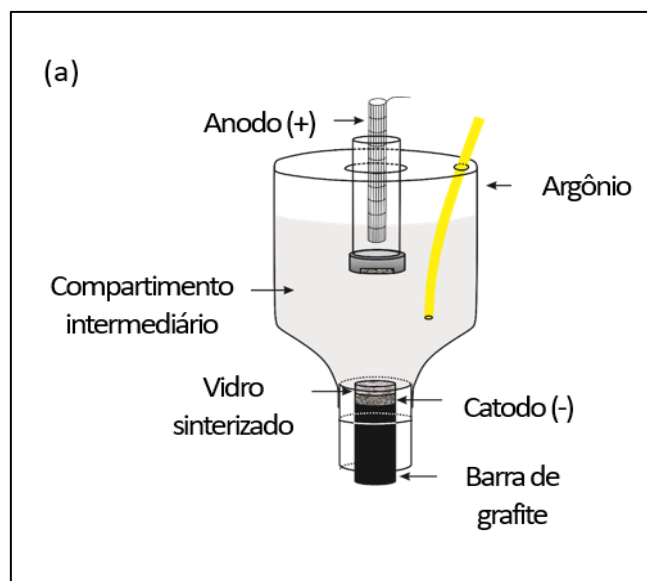
A razão entre Ag⁺:In³⁺, 0.14, foi obtida por meio da preparação de soluções contendo a estequiometria desejada, utilizando soluções estoque de (0,0084 mmol) de AgNO₃ (0.25 M) e de 0.06 mmol da solução etanoica de In(NO₃)₃ (0.25 M) e glutathiona (0.25 mmol) em 20 mL de água e pH corrigido para 9 com NaOH (1,0 M).

A eletrorredução foi realizada numa célula de cavidade seguindo o protocolo desenvolvido no grupo. No compartimento catódico (-) foi preparou-se junto a interface do eletrodo de grafite uma pastilha contendo 5 mmol de grafite e 0.06 mmol de S₈ elementar, prensados por 10 minutos a uma pressão de 3.2 kgcm⁻². A cavidade foi recoberta por um vidro sintetizado de poros de 170-220 μm, previamente sonificado em solução aquosa NaClO₄ (0.2 M) a fim de diminuir o

efeito do potencial de junção líquida. O esquema da célula eletroquímica utilizada é apresentada na Figura de Referência. Ao anodo (+) foi inserida uma solução 0.1 M NaOH a fim de fechar o ciclo oxirredutivo, separado do meio reacional por uma membrana de Nafion™. O processo eletroquímico foi conduzido por 386 s a corrente constante de 30 mA, 12 V, totalizando 11.58 C, com inserção de argônio no sistema a fim de promover a agitação do sistema e diminuir efeitos difusionais. Como o processo de redução para todos os calcogênios testados envolvem, fundamentalmente, dois elétrons, a previsão de carga, seguindo a lei de Faraday foi calculada para 2 é.

No interior da célula de cavidade, onde ocorre a liberação *in situ* de espécies X^{2-} ocorre a formação do $AgInS_2$ que é acompanhado pela mudança da coloração da solução, tornando-se de tom amarelado. Após a etapa eletroquímica faz-se o aquecimento a 100 °C por 10 minutos e armazenadas em refrigerador a 4 °C.

Figura de Referência - Célula eletroquímica de cavidade utilizada nos experimentos



Fonte: retirado de³⁹

³⁹ AREIAS, M. C. C.; *et al.* A Novel Electrosynthesis Cell with a Compressed Graphite Powder Cathode and Minimal Organic Solvent Content: Application to the Reformatsky Reaction. **Electrochimica Acta** vol.53, nº 22, 2008, p. 6477–6483.

4.5 SOLUÇÕES TAMPÃO

A solução tampão utilizada na pesquisa foi preparada seguindo o procedimento descrito a seguir. Foi dissolvido 681 mg de NaAc em escamas em um béquer de 50 mL para haver a dissolução do mesmo em água destilada. Após concluída essa etapa, o volume foi quantitativamente transferido para um balão volumétrico de 25 mL que foi aferido até o menisco, obtendo uma solução 0,20 M. A obtenção do HAc 0,20 M se deu pela diluição de 1,145 mL do ácido acético glacial num balão volumétrico de 100 mL até completar seu volume. A formação do sistema tamponado deu-se pela mistura de 20 mL de NaAc com 100 mL do HAc 0,20M, gerando um total de 120 mL de solução que foi armazenada em frascos âmbar e refrigerada.

*Quando necessário, o pH foi corrigido com um pHmetro da QUIMIS® do modelo 0400AS.

4.6 CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA

As curvas analíticas foram construídas a partir de um sistema (água/ QD/ tampão HAc:NaAc /analito) sempre mantendo um volume final fixo de 1,0 mL para as análises no espectrofluorímetro. As quantidades de QD (0,1 mL) e solução tampão (0,25 mL) eram fixas, enquanto o volume de água variava em função da concentração desejada dos analitos. A faixa de trabalho variou entre 0,0 e 50,0 mg.L⁻¹ dos analitos. Todas as soluções-estoque dos analitos (100 mg.L⁻¹) eram armazenadas em frascos âmbar e refrigeradas em geladeiras convencionais.

4.7 ANÁLISE INSTRUMENTAL

4.7.1 Espectroscopia de Infravermelho (IV)

Os espectros vibracionais obtidos neste trabalho foram realizados a partir da técnica de pastilha de KBr. O equipamento usado consistiu em um espectrofotômetro com transformada de Fourier, VARIAN®, modelo 660, abrangendo a região de 4000 - 400 cm⁻¹, com a resolução espectral de 4 cm⁻¹.

4.7.2 Espectroscopia de Absorção Eletrônica (UV-Vis)

Os espectros de absorção obtidos na pesquisa foram realizados no equipamento Agilent, modelo 8453, munido de fontes de radiação lâmpadas de deutério e tungstênio, utilizando cubetas de quartzo de 10 mm, como intervalo de varredura de 190-700 nm.

4.7.3 Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de excitação e emissão envolvidos na pesquisa foram realizados no equipamento FF-5301 PC da Shimadzu®, utilizando cubetas de plástico, com fendas de excitação e emissão 10:05; $\lambda_{EX} = 344$ nm e $\lambda_{EM} = 571$ nm; velocidade do scanner: *fast*, intervalo de varredura: 220-700 nm.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização Química

5.1.1 Parabenos

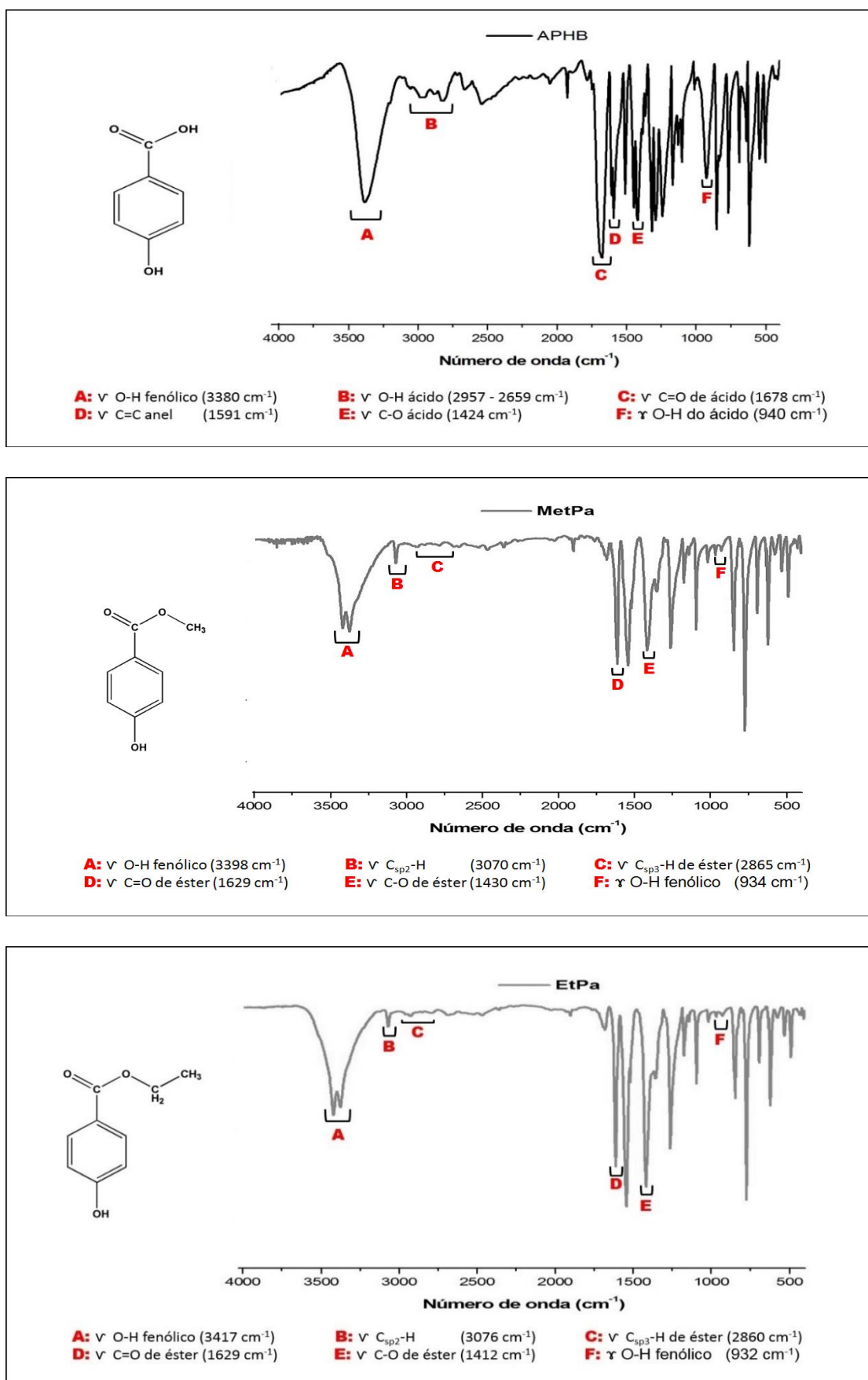
5.1.1.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho

A figura 7 mostra os espectros de infravermelho que comparam o composto de partida (APHB) com seus ésteres derivados. O ácido apresentou uma banda observável referente ao grupo carboxílico na sua estrutura ($\nu = 2957 - 2659 \text{ cm}^{-1}$) que corresponde ao intervalo disponível na literatura. Esta por sua vez, é sobreposta pelo sinal do grupo funcional fenólico que possui atribuição na mesma faixa ($\nu = 3380 \text{ cm}^{-1}$), contudo com absorção mais forte. Em $\nu = 1678$, temos um pico característico do grupo cetônico pertencente a ácidos, além do sinal característico do estiramento C-O ($\nu = 1424 \text{ cm}^{-1}$) presente no espectro. Outros sinais que servem como indicativos da estrutura como o estiramento C=C ($\nu = 1591 \text{ cm}^{-1}$), e a deformação angular fora do plano da ligação O-H ($\tau = 940 \text{ cm}^{-1}$), estão condizentes com os valores comparativos.

Quando observamos o espectro do MetPa, vemos que o valor para o estiramento C=O decresce ($\nu = 1629 \text{ cm}^{-1}$). Derivados de ácidos carboxílicos aromáticos com grupo hidroxila na posição *orto*, sofre um decréscimo de 50 cm^{-1} , que reforça a formação do éster de interesse. Nota-se também o aparecimento do estiramento C-H do carbono sp^3 ($\nu = 2865 \text{ cm}^{-1}$) no espectro, relacionada com a metila adicionada à estrutura. Houve a variação no valor de estiramento C-O do éster que é visto na faixa em $\nu = 1430 \text{ cm}^{-1}$. Mudanças bem similares a estas destacadas anteriormente também são percebidas no espectro do EtPa (com pequenas oscilações nos valores). Esse fato pode ser um forte indicativo do êxito das sínteses propostas.

Os deslocamentos nos principais estiramentos das ligações que nos interessam para comprovar a mudança de ácido carboxílico para função éster são comparados no quadro C.

Figura 7 - Espectros vibracionais do APHB, MetPa e EtPa



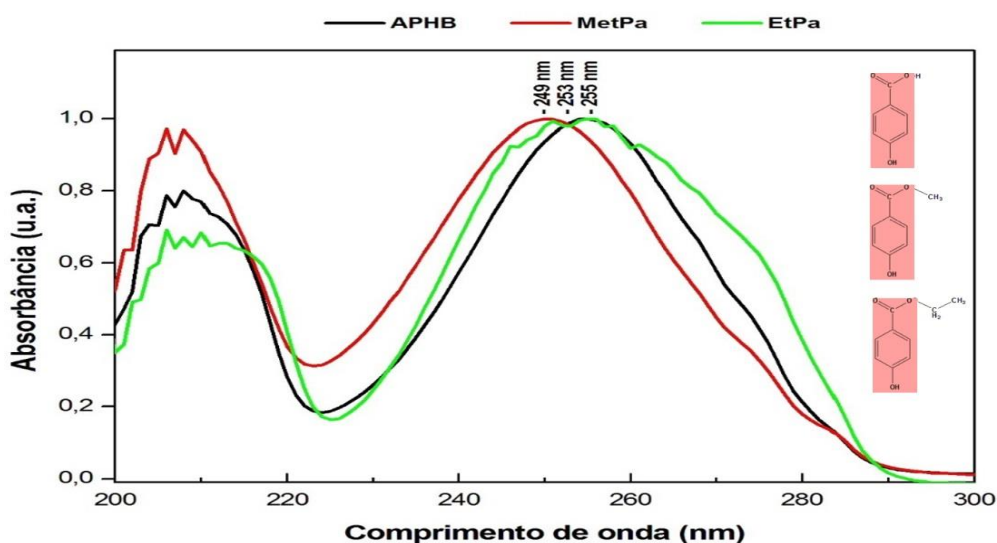
Quadro C - Variações nos valores dos principais estiramentos das estruturas propostas

Espécie	ν O-H _{carboxílico}	ν C=O	ν C-O	ν Csp ³ -H
APHB	2957 – 2659 cm ⁻¹	1678 cm ⁻¹	1424 cm ⁻¹	-
MetPa	-	1629 cm ⁻¹	1430 cm ⁻¹	2865 cm ⁻¹
EtPa	-	1629 cm ⁻¹	1412 cm ⁻¹	2860 cm ⁻¹

5.1.1.2 Espectroscopia de Absorção Eletrônica

A fim de confirmar as sínteses dos parabenos foi realizado o estudo da absorção dos compostos orgânicos envolvidos na pesquisa. A figura 8 mostra os espectros do APHB, MetPa e EtPa na região do ultravioleta. Percebe-se um pequeno deslocamento das bandas dos parabenos frente à do ácido precursor. Os valores são bem similares tendo em vista que o grupo cromóforo é o mesmo nas três estruturas (o anel aromático e a hidroxila fenólica). Após a esterificação, substituintes alquila foram adicionados às estruturas do APHB, contudo, suas influências sobre o fenômeno de absorção de radiação eletromagnética são mínimas. O deslocamento de bandas é um indicativo qualitativo da formação de novas espécies químicas, contudo um veredito mais correto seria a partir dos valores de absorvidade molar.

Figura 8 - Espectros de absorção do APHB, MetPa e EtPa



5.1.1.3 Teste de Solubilidade

Os resultados obtidos neste teste (quadro D) ajudam a confirmar a formação dos parabenos de interesse. Sabendo que o APHB é polar, seus derivados teriam caráter mais apolar tendo em vista que há um aumento da cadeia carbônica substituinte. Percebemos mudanças no perfil de solubilidade do MetPa e Etpa em solventes de polaridade intermediária como DMSO e acetona, sendo um indício da formação de espécies distintas, onde o EtPa apresenta maior caráter apolar.

Quadro D – Teste de Solubilidade do APHB e Parabenos

Espécie	APHB	MetPa	EtPa
Água	S	S	S
Metanol	S	S	S
Acetona	S	PS	PS
Etanol	S	PS	PS
DMSO	S	PS	In
THF	S	PS	In
Clorofórmio	In	In	In



Onde: S– solúvel; PS- parcialmente solúvel; In- insolúvel

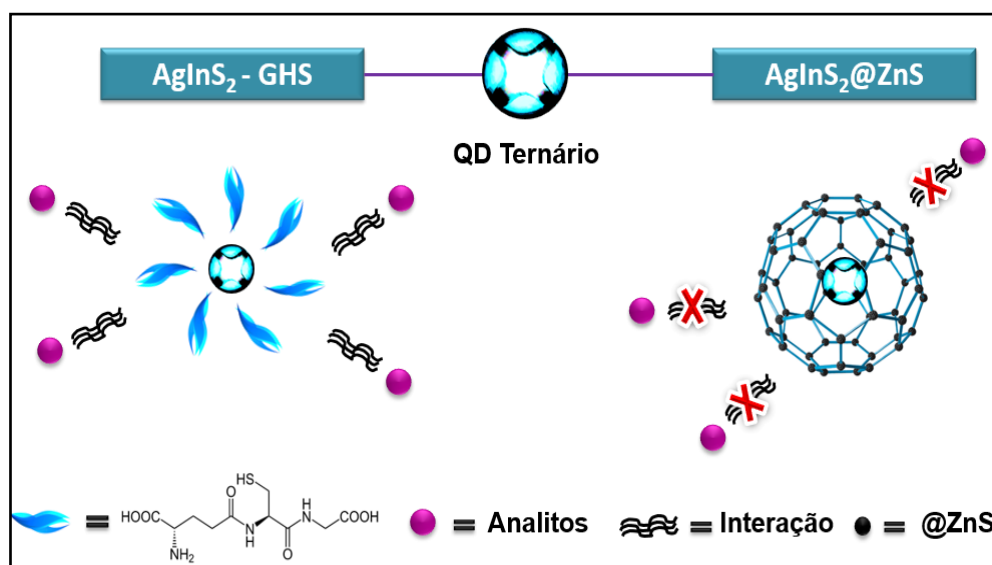
5.1.1.4 Rendimento das Sínteses orgânicas

Após a obtenção do MetPa e Etpa seus montantes foram quantificados totalizando um rendimento de 22,1 e 34,0% respectivamente. Os valores são considerados baixos, porém aceitáveis para sínteses orgânicas. Acredita-se que as condições seguidas pela referência não favoreceram a formação dos ésteres de interesse. Novos parâmetros serão testados em etapas futuras como condicionamento em sistema de refluxo sob aquecimento e teores mais elevados de ácido sulfúrico.

5.1.2 Seletividade dos QDs

Neste trabalho tínhamos posse de dois tipos de QD ternário ($\text{AgInS}_2\text{-GHS}$; $\text{AgInS}_2@\text{ZnS}$) e avaliamos suas sensibilidades em relação ao APHB e seus parabenos derivados. Nos testes preliminares, observou-se que o QD dopado com ZnS não respondia linearmente à concentração do analito adicionado, dificultando assim sua quantificação. Devido à fuga de proporcionalidade linear entre a espécie fluorescente e seu supressor (efeito de filtro interno) foi que optou-se pelo $\text{AgInS}_2\text{-GHS}$ para realização da pesquisa. Acredita-se que a maior afinidade verificada se dá pelas interações intermoleculares dos analitos com a estrutura estabilizante da glutatona (rica em sítios de interação). A camada de ZnS dificulta de certa forma a interação com o centro metálico do QD, causando menor desativação energética. Todo o esquema é ilustrado na figura 9.

Figura 9 - Esquema de interação entre os analitos e os QDs



Fonte: própria

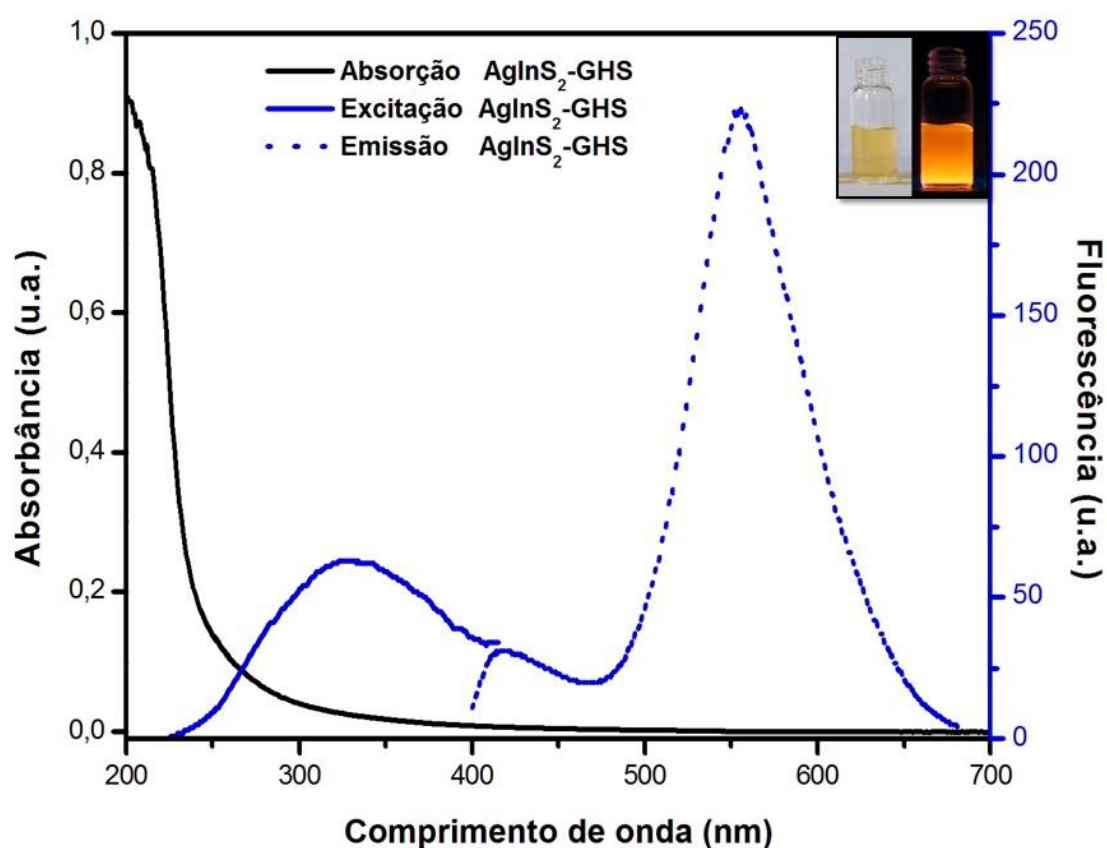
5.1.3 Quantum Dot: AgInS₂-GHS

5.1.3.1 Espectroscopia de Fluorescência e Absorção Eletrônica

Na figura 10 são ilustrados os espectros de absorção, excitação e emissão do AgInS₂-GHS, com máximos em 203, 344 e 571 nm respectivamente, que servem para caracterizar a suspensão coloidal. Os valores máximos de excitação e emissão foram utilizados como os parâmetros para as análises fluoriméricas neste trabalho.

O QD possui uma coloração amarelada que muda para um tom mais alaranjado quando submetido à radiação excitante. O valor de excitação máxima na região do ultravioleta mostra que o fenômeno de promoção dos elétrons seguida de emissão luminosa necessita de grande energia irradiada.

Figura 10 - Espectros de absorção, excitação e emissão do AgInS₂-GHS

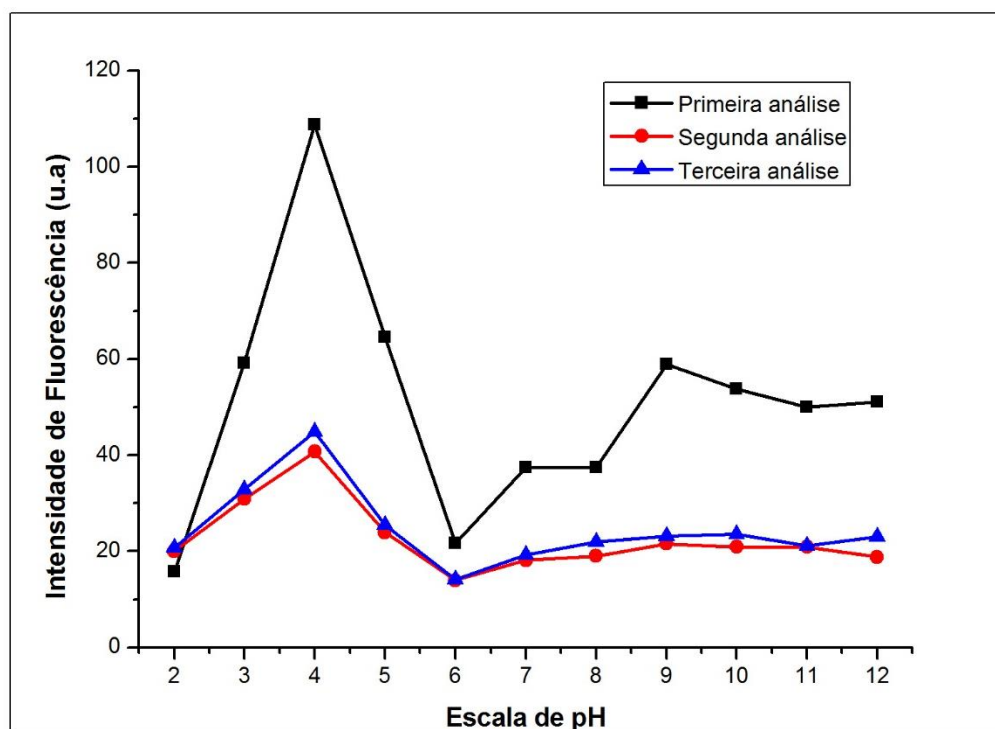


5.2 TESTES FÍSICO-QUÍMICOS

5.2.1 Estudo da Influência do pH sobre o QD

O pH do meio é um dos fatores que podem influenciar no rendimento quântico de um fluóforo, e por esta razão sua ação deve ser averiguada. Neste estudo (figura 11) percebeu-se que o pH 4,0 foi o que proporcionou maior fluorescência do QD. Acredita-se que a causa deste fenômeno seja a protonação completa de todos os sítios ácidos de glutatona, potencializando-a como o estabilizante da solução coloidal.

Figura 11 - Influência do pH na fluorescência do QD



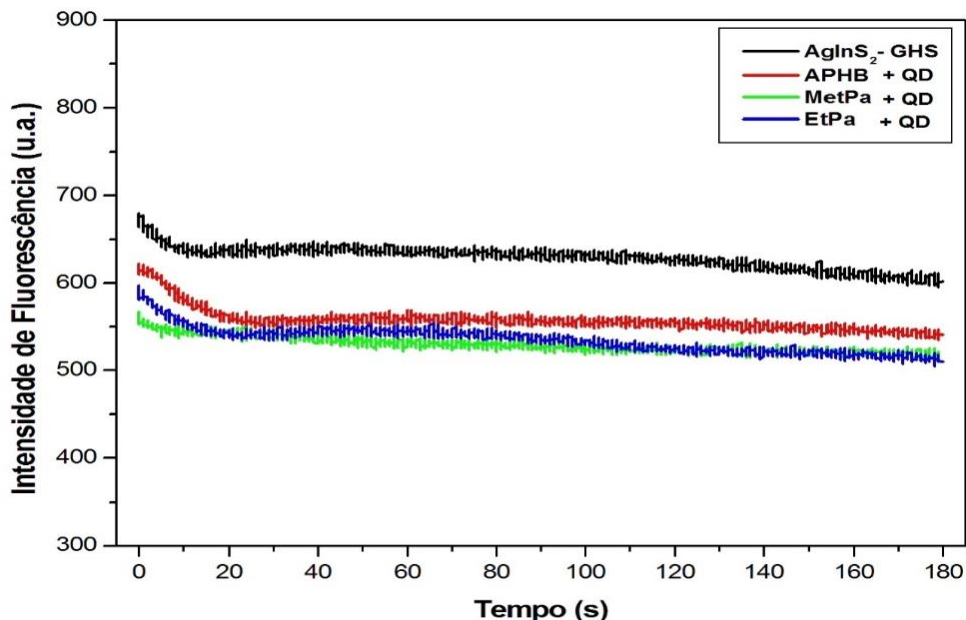
A discrepância entre os valores da primeira análise em relação as demais se dá devido a um problema estrutural do nosso laboratório. O local vivenciou uma queda de energia que perdurou por mais de 48 horas, o que influenciou na refrigeração da solução contendo as nanopartículas, logo a segunda e terceira análises (vermelha e azul) foram feitas com um QD degradado (em relação ao gráfico preto) e por isso mostrou valores de intensidade bem mais discretos.

5.2.2 Estudo da Estabilidade do QD

O tempo reacional é um aspecto crucial na análise de parabenos neste trabalho, pois, a coleta dos dados deve ser precisa e equivalente para todos os pontos da curva. A diferença temporal na coleta dos dados pode ocasionar numa oscilação do valor real de intensidade referente a concentração de analito adicionada. Por estes motivos é que se estuda o comportamento da reação química, observando se ela se mantém estável durante um determinado período, e se existe o equilíbrio químico (tendência de formação dos reagentes).

Na figura 12 temos o *time course* do QD isolado, e das misturas com os potenciais analitos a fim de verificar a estabilidade da reação conforme o passar do tempo. Nota-se que já na fase inicial do teste (~15s), ocorre a estabilização da reação entre o QD e o analito. Logo, conclui-se que a leitura da amostra deve ser realizada após um curto período de adição dos reagentes (a pequena oscilação observada ao longo do intervalo pode ser desconsiderada).

Figura 12 - Estudo do tempo reacional entre o QD e os analitos



Tendo em mente que o processo de emissão do QD é muito rápido e que o analito consegue suprir parte de radiação que seria emitida, conclui-se que pelo gráfico temporal a interação entre o fluóforo e o supressor é muito específica

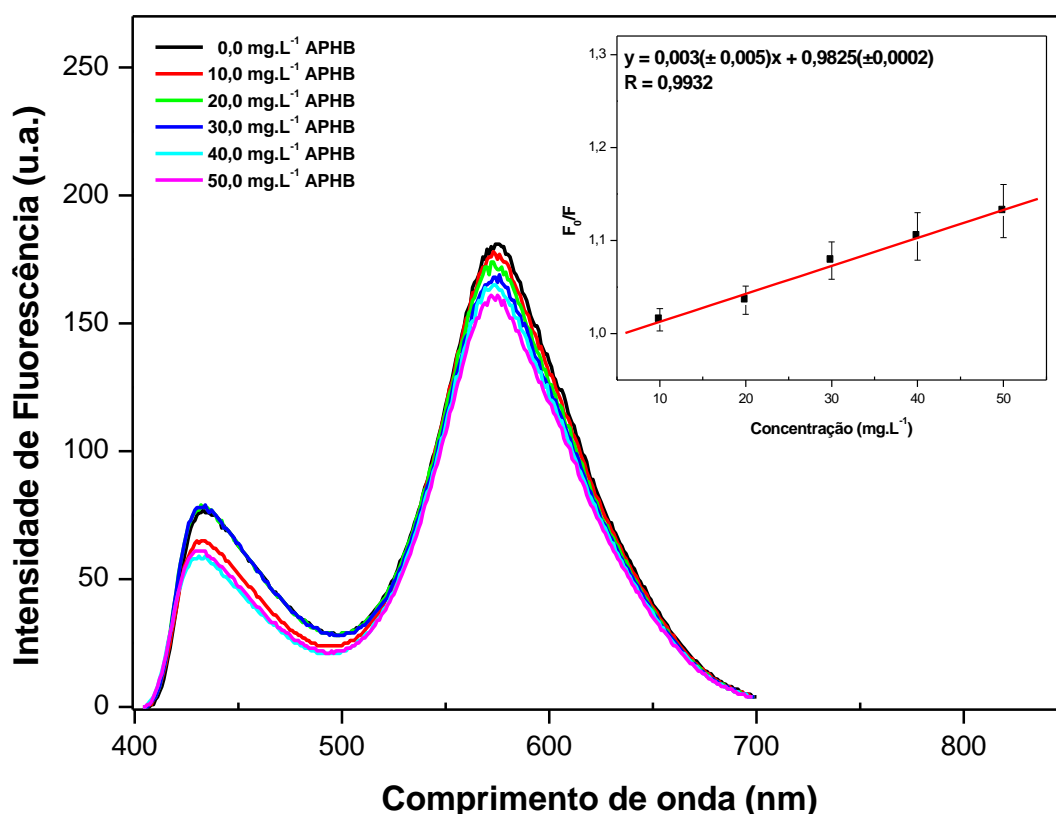
e seletiva e irreversível no intervalo avaliado (a mistura não tende a restabelecer a intensidade do AgInS₂-GHS quando isolado). A extensão da sensibilidade desta relação será estudada em fases futuras do trabalho.

5.2.3 Construção da Curva Analítica

5.2.3.1 Ácido *p*-hidroxibenzoico

A curva analítica foi construída variando-se a concentração do APHB entre 0,0 a 50,0 mg.L⁻¹, em meio de tampão acetato em pH 4,0 por triplicata obtendo uma linearidade satisfatória ($y = 0,0030(\pm 0,0050)x + 0,9825(\pm 0,0002)$; $R = 0,9932$). O resultado obtido é ilustrado na figura 13.

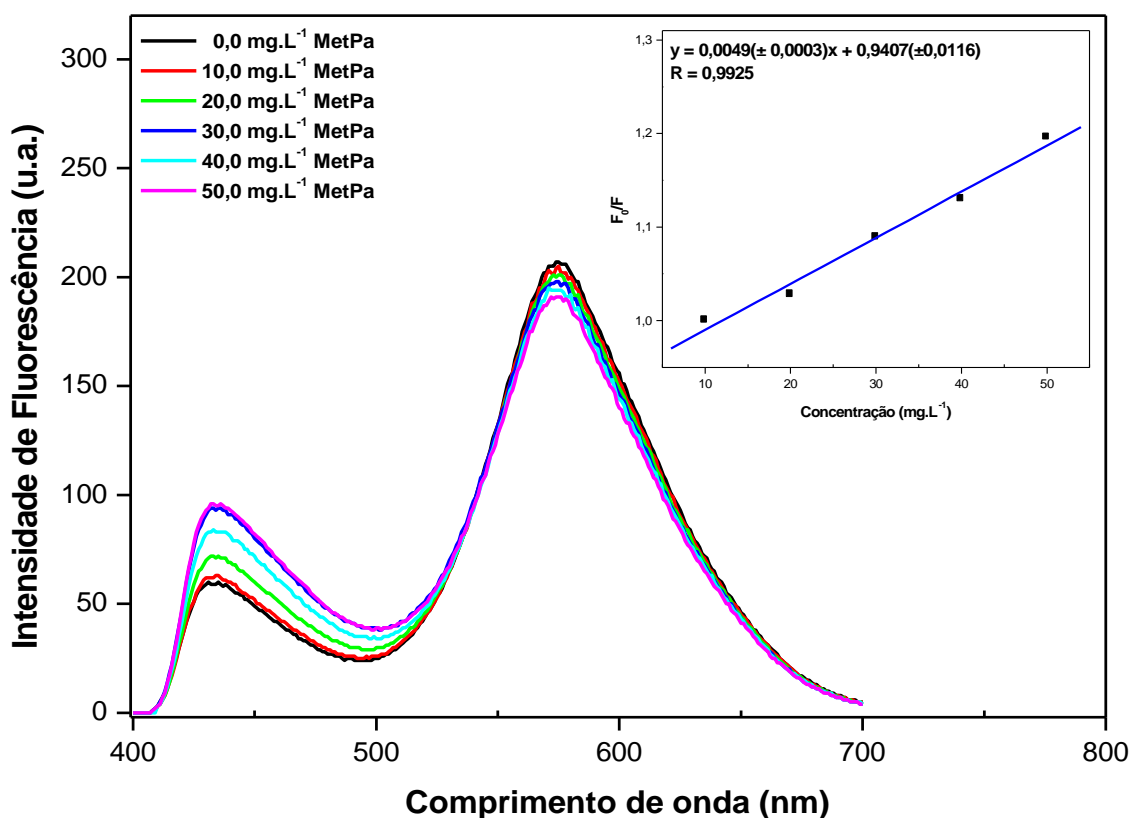
Figura 13 - Curva analítica do APHB



5.2.3.2 Metilparabeno

A curva analítica foi construída variando-se a concentração do MetPa entre 0,0 a 50,0 mg.L⁻¹, em meio de tampão acetato em pH 4,0 por método univariado obtendo uma linearidade satisfatória ($y = 0,0049(\pm 0,00033)x + 0,9407(\pm 0,0116)$; $R = 0,9925$). O resultado obtido é visto na figura 14.

Figura 14 - Curva analítica do MetPa



Ambas curvas analíticas mostram a partir dos seus adequados coeficientes de correlação ($R_{\text{APHB}} = 0,9932$ / $R_{\text{MetPa}} = 0,9925$), que o método proposto é viável e que a faixa de trabalho está bem adequada, sabendo que os limites aceitos variam de 4000 à 8000 mg.L⁻¹ (ver seção 3.2).

6.0 CONCLUSÃO

- Houve-se êxito na síntese acordo com os espectros vibracionais;
- O teste de solubilidade indicou a formação de espécies menos polares que o APHB, sendo um indício da formação dos parabenos;
- Ao observar o espectro de absorção eletrônica, pode-se comprovar a formação qualitativa de novas espécies derivadas do APHB;
- O efeito do pH influenciou na resposta física do QD utilizado no trabalho, onde o pH 4 foi o que se sobressaiu no estudo;
- Com o auxílio do diagrama de *time course* foi possível perceber que a reação se instabiliza em poucos segundos (~15) e não tende a ser reversível;
- O método demonstrou linearidade significativa e sensibilidade para o APHB e MetPa.

7.0 PERSPECTIVAS

- Construir curvas analíticas para o EtPa;
- Realizar estudos sobre fatores físicos que impactarão na sensibilidade do método proposto como: volume do QD, razão entre os componentes da mistura (QD, tampão, analito e água) e temperatura;
- Estudar os parâmetros químicos como natureza e concentração da solução tampão e interferentes;
- Obter os valores dos limites de quantificação e detecção;
- Caracterizar os parabenos sintetizados por RMN ^1H e ^{13}C ;
- Construir uma curva de adição de padrão, para constatar a presença ou não de efeito de matriz;
- Quantificar parabenos em amostras reais;
- Validar os resultados obtidos com o método comparativo.

8.0 REFERÊNCIAS

1. FURLANI, D.; SILVA, N.; NETZ, D. J. A. **Uso Cosmético de Patches:** um artigo de revisão. Florianópolis, 2012.
2. DIAS, L. L. **Os Benefícios Da Economia Compartilhada Para Grandes Grupos Industriais De Cosméticos No Brasil**, 2018, 65 f. Monografia (Bacharelado em Economia), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Disponível em: <<https://pantheon.ufjf.br/handle/11422/4691>>. Acesso em: 28 dez, 2018.
3. FERNANDES, J. P. S.; SAVINO, G.; AMARANTE, A. C. G. Estudo Das Relações Entre Estrutura E Atividade De Parabenos: Uma Aula Prática. **Química Nova**, vol. 36, nº 6, 2013, p. 890-893.
4. MELO, L. P. **Desenvolvimento De Métodos Cromatográficos Para Análises De Antimicrobianos Em Amostras Complexas**, 2012, 189 f. Tese (Doutorado em Química), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://scholar.google.com.br/scholar?q=Desenvolvimento+de+m%C3%A9todos+cromatogr%C3%A1ficos+para+an%C3%A1lises+de+antimicrobianos+em+amostras+complexas.&hl=pt-BR&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholar>. Acesso em: 28 dez, 2018.
5. SILVA, F. O. *et al.* O Estado Da Arte Da Síntese De Semicondutores Nanocristalinos Coloidais. **Química Nova**, vol. 33, nº9, 2010, p. 1933-1939.
6. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Resolução nº.48, de 25 de outubro de 2013**. Diário Oficial da União. Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0048_25_10_2013.pdf>. Acesso em: 03 jan, 2019.
7. STREHLAU, V. I.; CLARO, D. P.; LABAN NETO, S.A. A vaidade impulsiona o consumo de cosméticos e de procedimentos estéticos cirúrgicos nas mulheres? Uma investigação exploratória. **Revista de Administração**, São Paulo, Vol. 50, nº1, 2015, p. 73-88.
8. ABIHPEC. Associação Brasileira De Indústria De Higiene Pessoal, Perfumaria E Cosméticos, **Panorama do Setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos**, 2017

9. ABIHPEC. **Associação Brasileira De Indústria De Higiene Pessoal, Perfumaria E Cosméticos**. Disponível em: [HTTP://www.abihpec.org.br/](http://www.abihpec.org.br/). Acesso em: 02 jan. 2019.
10. CHORILLI, M. *et al.* Toxicologia dos Cosméticos. **Latin American Journal of Pharmacy**, vol. 26, 2007, p. 144-154.
11. CABALEIRO, N. *et al.* An Overview Of Sample Preparation For The Determination Of Parabens In Cosmetics. **TrAC, Trends Anal. Chem.** Vol. 57, 2014, p.34-46
12. RIBEIRO, G. L. O. **Desenvolvimento E Validação De Método Analítico Para Análise De Parabenos Em Tecido De Peixes**. 2014, 65 f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade de São Carlos. Disponível em: http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/USP_1e29384096997d53a96d37c1fa4a15cb . Acesso em: 28 dez, 2018.
13. NOWAK, K. *et al.* Parabens And Their Effects On The Endocrine System. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Vol. 474, 2018, p. 238-251.
14. KOLATOROVA, L. *et al.* Exposure To Bisphenols And Parabens During Pregnancy And Relations To Steroid Changes. **Environmental Research**, vol. 163, 2018, p.115-122.
15. HONDA, M.; ROBINSON, M.; KANNAN, K. Parabens In Human Urine From Several Asian Countries, Greece, And The United States. **Chemosphere**, Vol. 201, 2018, p.13-19
16. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 29 de 01 de junho de 2012**, publicada no Diário Oficial da União de 04/16/2012. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3285739/RDC_29_2012.pdf/c74fbb1a-c98b-4899-81ae-7ad9e18d807e . Acesso em: 03 jan, 2019.
17. OCAÑÁ-GONZÁLEZ, J. A. *et al.* New Develoments In The Extraction And Determination Of Parabens In Cosmetics And Environmental Samples. A Review. **Analytica Chimica Acta**, Vol. 858, 2015, p. 1-15.
18. JARDIM, V. C. *et al.* Determination Of Parabens In Urine Samples By Microextraction Using Packed Sorbent And Ultra-Performance Liquid

- Chromatography Couples To Tandem Mass Spectrometry. **Journal Of Chromatography**, vol. 974, 2015, p. 35-41.
19. MOOS, R. K. *et al.* Rapid Determination Of Nine Parabens And Seven Other Environmental Phenols In Urine Samples Of German Children And Adults. **International Journal Of Hygiene And Environmental Health**, Vol. 217, n º8, 2014, p. 845-853.
20. MENDHAM, J. *et al.* **Vogel: Análise Química Quantitativa**, 6 ed., Londres: LTC, 2002, p. 001-006
21. MENDHAM, J. *et al.* **Vogel: Análise Química Quantitativa**, 6 ed., Londres: LTC, 2002, p. 351-355
22. MEIRA, M. *et al.* Identificação De Adulteração De Biocombustível Por Adição De Óleo Residual Ao Diesel Por Espectrofluorimetria Total 3d E Análise Das Componentes Principais, **Química Nova**, vol. 34, nº4, 2011, p. 621-624.
23. VALEUR, B. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**, New York: Wiley-VCH, 2001, p. 03-16.
24. GUSSO, P. K. **Caracterização Fluorimétrica Da Matéria Orgânica Dissolvida E Sua Relação Autóctone/Alóctone Na Baía De Paranaguá**, 2008, 106 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação), Universidade Federal do Paraná. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/16707>>. Acesso em: 28 dez, 2018.
25. SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentos da Química Analítica**, 9 ed., São Paulo: Cengage Learning, 2012, p. 753-763.
26. VALEUR, B. LERAY, I. Design Principles Of Fluorescent Molecular Sensors For Cation Recognition, **Coordination Chemistry Reviews**, vol. 205, 2000, p. 03-40.
27. SKOOG, D. A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análisis Instrumental**, 5 ed., Madrid, , 2001, p. 381-407.
28. SUKHORUKOV, V. L. *et al.* Many-Electron Dynamics Of Atomic Processes Studied By Photon-Induced Fluorescence Spectroscopy. **Physics Reports**, vol. 10, 2018.
29. SCHNEIDER, L. B. **Fluoróforos Sintéticos Naturais Para Aplicações Em Diagnósticos**. 2014, 152 f., Tese (Doutorado em Física) Universidade Federal do Paraná. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/48459>>. Acesso em: 28 dez, 2018.

30. DIAS DA SILVA, L. G. G. V.; LEWENKOPF, C. H.; STUART, N. Orbital Magnetic Properties Of Quantum Dots: The Role Of Electron-Electron Interactions. **PHYSICAL REVIEW B**, vol. 69, 2014.
31. MACHADO, C. E. *et al.* Carbon Quantum Dots: Chemical Synthesis, Properties And Applications. **Rev. Virtual de Química**, vol. 7, nº 4, 2015, p. 1306-1346.
32. YANG, M. *et al.* Zn/Cd Ratio-Dependent Synthesis Conditions In Ternary ZnCdS Quantum Dots. **Journal of Alloys and Compounds**, vol. 752, 2018, p. 260-266.
33. RAMOS, N. S. M. *et al.* Cysteamine-Cdte Quantum Dots Electrochemically Synthesized As Fluorescence Probe For Resveratrol. **Food Analytical Methods**, vol. 11, 2018, p. 3371-3379.
34. BERA, D. *et al.* Quantum Dots And Their Multimodal Applications: A Review. **Materials Journal**, Vol. 3, 2010, p. 2260-2345.
35. FREITAS, D. V. *et al.* Toward Greener Electrochemical Synthesis Of Composition-Tunable Luminescent Cdx-Based (X= Te, Se, S) Quantum Dots For Bioimaging Cancer Cells. **Sensors and Actuators B: Chemical**, vol. 250, 2017, p. 233-243.
36. DE SOUZA, G. C. S. *et al.* Employment Of Eletrochemically Synthesized TGA-Cdse Quantum Dots For Cr⁺³ Determination In Vitamin Supplements. **Talanta**, vol. 144, 2015, p. 986-991.
37. HUANG, S. *et al.* Graphene Quantum Dots As On-Off-On Fluorescent Probes For Chromium (VI) And Ascorbic Acid. **Microchim Acta**, 2015.
38. PAN, B. *et al.* Quantitative Identification Of Dynamic And Static Quenching Of Ofloxacin By Dissolved Organic Matter Using Temperature-Dependent Kinetic Approach. **Environmental Pollution**, vol. 161, 2012, p. 192-198.
39. AREIAS, M. C. C.; *et al.* A Novel Electrosynthesis Cell with a Compressed Graphite Powder Cathode and Minimal Organic Solvent Content: Application to the Reformatsky Reaction. **Electrochimica Acta** vol.53, nº 22, 2008, p. 6477–6483.