

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA
DO RIO DE JANEIRO



RELATÓRIO TÉCNICO-CIENTÍFICO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
CNPq

**Melhoria do efeito de supressão de fluorescência de pontos quânticos
utilizando meio organizado: um estudo com as naftoquinonas objetivando
análises de extratos de plantas**

Aluna: Juliana Teles Real

Orientadores: Ricardo Queiroz Aucélio
Andrea Rosane da Silva

INSTITUIÇÃO DE ENSINO

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Rua Marquês de São Vicente, 225, Gávea - Rio de Janeiro, RJ - Brasil - 22453-900

Cx. Postal: 38097 - Telefone: (55 21) 3527-1001

**Rio de Janeiro,
Julho de 2013**

RESUMO

O efeito de supressão de fluorescência (quenching) gerado pelas naftoquinonas lapachol, β -lapachona, α -lapachona e β -lapachona sulfonada na nanosonda 3-MPA-CdTe foi estudado em sistemas organizados. O uso de CTAB nas dispersões de trabalho promoveu diversas vantagens tais como a rápida estabilização do sinal da sonda fluorescente, o aumento no efeito de supressão de fluorescência provocado pelas naftoquinonas (quando comparado com meio não organizado) e a dispensa da correção da contribuição de efeito de filtro interno na diminuição total de sinal. O surfactante catiônico facilitou a solubilidade das naftoquinonas no meio e minimizou a variação no sinal da sonda causada pela presença de diferentes alíquotas de solventes orgânicos. As dispersões de trabalho (6.0×10^{-8} mol de 3-MPA-CdTe em 1 L de solução aquosa) foram preparadas em solução aquosa de CTAB (9.0×10^{-4} mol L⁻¹), contendo tampão fosfato de sódio pH 7.4. A fim de estabelecer uma relação entre a fluorescência ($\lambda_{\text{ex/em}}$ 380/560 nm) e a concentração das naftoquinonas foi utilizado o modelo de Stern-Volmer. A faixa de resposta linear obtida foi de 5.0×10^{-7} a 1.0×10^{-5} mol L⁻¹. O método foi aplicado na determinação de lapachol em extratos de *Tabebuia impetiginosa* (Ipê Rosa). A possibilidade de se utilizar cromatografia de camada fina com sonda fluorescente de pontos quânticos (quantum dots ou QDs) foi demonstrada.

INTRODUÇÃO

Nanopartículas semicondutoras também chamadas de pontos quânticos (quantum dots ou QDs) apresentam um elevado confinamento quântico que resulta em propriedades ópticas que podem ser alteradas em função do tamanho das nanopartículas. O perfil de luminescência dependente do tamanho dos nanocristais é um grande atrativo para utilização de nanosondas como sensores ópticos. Por exemplo, CdSe e CdTe QDs foram recentemente explorados na detecção de diferentes espécies químicas [1, 2]. Particularmente, estes QDs têm sido muito estudados, uma vez que podem ser facilmente sintetizados em meio aquoso e em condições reacionais moderadas. As nanopartículas semicondutoras são normalmente revestidas com substâncias orgânicas para evitar a oxidação e a agregação da nanoestrutura; por outro lado, é muito importante revestir os QDs a fim de melhorar suas propriedades ópticas, produzindo perfis mais nítidos e simétricos devido à diminuição dos defeitos de superfície [3]. A literatura indica que o 3MPA (ácido 3-mercaptopropiônico) promove excelentes efeitos estabilizadores aos QDs em sistemas aquosos, aumentando a sua fotoestabilidade e a intensidade da luminescência [4].

Um dos métodos mais eficazes para melhorar a medição da fotoluminescência de um luminóforo consiste no uso de sistemas micro heterogêneos. O termo "sistema micro

heterogêneo" muitas vezes refere-se a um pequeno sistema agregado de moléculas (por exemplo, moléculas de surfactantes ou de lipídios), envolvidos em um solvente [5]. A maioria desses agregados apresentam microfases hidrofóbicas e hidrofílicas distintas com interfaces associadas com natureza dinâmica em sua agregação. Estes conjuntos organizados podem apresentar diversas propriedades peculiares que trazem vantagens significativas para medições analíticas de fotoluminescência. Por exemplo, a inclusão em micelas melhora a solubilidade, estabilidade e rendimento quântico de um luminóforo [6]. Um agente comum usado para esses fins é o surfactante catiônico brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB), que é capaz de formar micelas normal e reversa [7].

A estabilização das nanopartículas hidrofóbicas em água depende da interdigitação termodinamicamente favorável entre surfactantes e ligantes estabilizadores da nanopartícula. O encapsulamento de nanopartículas em micelas não envolve nenhuma reação química de substituição e, portanto, geralmente não afeta significativamente as propriedades de energia e de vida útil da luminescência da nanopartícula [8].

Lapachol (LAP), mostrado na Figura 1, é uma naftoquinona que apresenta diversas atividades biológicas, tais como antiinflamatórias, analgésicas, antineoplásica e tripanocida [9]. LAP (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona) é encontrado em plantas da família Bignoniaceae (vulgarmente conhecida como "Pau d'arco"), principalmente nas espécies *avellanadae*, *serratifolia*, *pentaphylla*, *heptaphylla* e *impetiginosa*. LAP é a naftoquinona mais abundante sendo facilmente extraído da madeira do ipê, que pode conter até 7% de LAP, dependendo da espécie da planta. No Brasil, *Tabebuia impetiginosa* também é chamada de Ipê Roxo ou Lapacho Roxo (entre outros nomes) [10-13]. Estas plantas possuem usos medicinais e estão disponíveis comercialmente sob a forma de um pó feito da entrecasca (extrato seco) ou sob a forma de extrato hidroalcoólico.

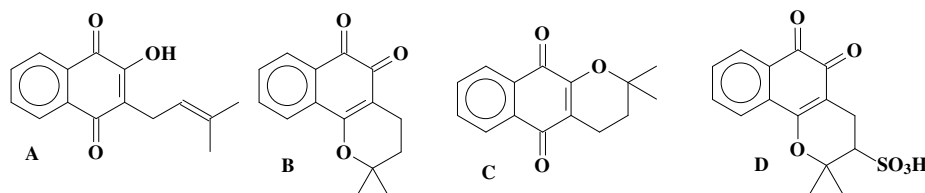


Figura 1: Estruturas das naftoquinonas lapachol (A), β-lapachona (B), α-lapachona (C) e β-lapachona sulfonada (D).

As naftoquinonas bioativas β -lapachona (β -LAP) e α -lapachona (α -LAP), mostradas na Figura 1, são isômeros do lapachol, e até podem estar presentes nas fontes naturais citadas, porém em quantidades insignificantes.

Dados da literatura indicam abordagens para converter quinonas não fluorescentes em espécies químicas altamente fluorescentes. No entanto, poucos métodos quantitativos têm sido relatados para a determinação do LAP e seus isômeros. O procedimento clássico consiste em reduzir LAP com hidrossulfito de sódio para formar um produto fluorescente, instável na presença de oxigênio [14]. A redução também foi alcançada utilizando-se ditionito de sódio ou boroidreto de sódio em soluções etanólicas. A reação pode gerar produtos diferentes, que por sua vez afetam a precisão do método. O método foi aplicado em análise de formulações farmacêuticas com limite de detecção (LD) na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ [15]. Steinert *et al.* utilizaram HPLC com molecular detecção de absorção na gama de UV para determinar naftoquinonas em extratos de plantas; no entanto, os autores não conseguiram detectar LAP nos extratos de plantas analisados [16]. Fonseca e colaboradores validaram um método de HPLC para quantificar LAP na presença de β -LAP, com um LD de $0.318 \mu\text{g mL}^{-1}$ (6.4 ng de LAP com injeção 20 μL) [17]. Mais recentemente, a determinação da LAP em meio aquoso pela extinção de fluorescência de 3MPA-CdTe QDs foi conseguida com um limite de detecção de $8.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($1.9 \mu\text{g mL}^{-1}$) [18].

No presente trabalho, o efeito de quatro naftoquinonas (lapachol, β -lapachona, α -lapachona e β -lapachona sulfonada) em dispersões aquosas organizados contendo um surfactante e 3MPA-CdTe QDs foi avaliado. O método foi aplicado na análise de extratos de *Tabebuia impetiginosa* e em amostras simuladas. A abordagem de cromatografia em camada fina foi utilizada com o intuito de melhorar a seletividade das determinações.

PROPOSTA DE TRABALHO

Este trabalho baseou-se na síntese de pontos quânticos de CdTe revestidos com ácido 3-mercaptopropiônico (3MPA) como sonda fluorescente para a determinação de lapachol em extratos *Tabebuia impetiginosa* utilizando-se meio organizado. Um estudo comparativo do quenching de fluorescência gerado por quatro naftoquinonas em meio organizado e não organizado também foi realizado.

- Síntese de 3MPA-CdTe QDs.
- Preparo das soluções estoque e dispersões de trabalho.
- Estudo da estabilidade dos nanocristais frente a tipo de surfactante, tampão, pH e solvente orgânico.
- Verificação da interação (quenching) entre 3MPA-CdTe e as naftoquinonas em meio organizado (micelar).
- Monitoramento da absorção dos analitos (a fim de evitar contribuição de efeito filtro).
- Comparação do quenching de fluorescência causado pelas naftoquinonas em meio organizado e não organizado, utilizando a abordagem de Stern-Volmer.
- Obtenção das curvas analíticas.
- Testes de interferência.
- Abordagem de cromatografia em camada fina (TLC) para separação de lapachol e lapachonas em amostras simuladas, e posterior determinação de lapachol na sonda 3MPA-CdTe.
- Aplicação do método desenvolvido na determinação de lapachol em um extrato de *Tabebuia impetiginosa* (Ipê Roxo) e comparação através de dosagem por HPLC.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Instrumentação

Os espectros de absorção no UV-vis foram obtidos através do espectrômetro de feixe duplo Perkin-Elmer Lambda 19, utilizando cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Os espectros de fluorescência foram obtidos em um espectrômetro de luminescência Perkin-Elmer modelo LS45 com banda espectral de passagem 10 nm e velocidade de varredura de 1500 nm min^{-1} , utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. A excitação foi realizada a 380 nm e a medição de sinal foi feita em 540 nm (meio não-organizado) e em 560 nm (sistema organizado). Os espectros de fluorescência com variação de temperatura foram obtidos em um espectrômetro Peltier PTP-1 acoplado a um sistema Peltier PCB1500, Perkin Elmer. As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo Gilson equipado com detector de arranjo de fotodiodo para medições por absorção, e uma coluna Phenomenex C18 column (250 x 4.6 mm com diâmetro médio de partícula de 5 μm).

Reagentes

Ácido 3-mercaptopropiônico (3MPA), $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (98%), Telúrio em pó (99%), borohidreto de sódio (98%), tris(hidroximetil)aminometano, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico heptaidratado, dodecil sulfato de sódio (SDS), brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB), Triton X-100, Triton X-114, HCl, e Na_2CO_3 foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Os surfactantes CTAB e SDS foram recristalizados duas vezes em etanol a fim de eliminar as impurezas. Placas de sílica gel de TLC (60 F254) foram compradas da Merck. Extratos comerciais de Pau d'arco (*Tabebuia impetiginosa*) foram comprados em drogarias e a madeira de *Tabebuia impetiginosa* (Ipê Roxo) foi adquirida no comércio local.

Todos os solventes de grau analítico foram comprados da Tedia (Brasil). Água ultrapura foi purificada em um sistema Milli-Q da Millipore (Simplicity model 185, EUA). Lapachol (LAP) foi extraída de acordo com o procedimento descrito na literatura [11]. β -lapachona (β -LAP), α -lapachona (α -LAP) e β -lapachona sulfonada (β -LAPSUL, Fig. 1D) foram sintetizadas seguindo procedimentos descritos na literatura [19, 20]. Todas as naftoquinonas foram purificadas e caracterizadas por técnicas espectroscópicas e os resultados estavam de acordo com dados da literatura [21-23]. Gás nitrogênio foi obtido da Linde-gases (Brasil).

Síntese dos pontos quânticos de telureto de cádmio (CdTe)

Os CdTe QDs foram preparados como descrito na literatura e o diâmetro das nanopartículas foi estimado em cerca de 2,8 nm [18]. O rendimento quântico de 24% foi estimado pela abordagem comparativa com um fluoróforo padrão (emissão de fluorescência de rodamina B em etanol [24]).

Preparação de soluções padrão, dispersões e amostras

As soluções padrão estoque de 1.0×10^{-2} a 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ foram preparadas dissolvendo quantidades apropriadas das naftoquinonas (LAP, α -LAP, β -LAP ou β -LAPSUL) em metanol. As soluções estoque de surfactantes (de 1.0×10^{-4} a 5.0×10^{-3} L mol⁻¹) foram preparadas dissolvendo quantidades apropriadas de CTAB, SDS, Triton X-100 ou Triton X-114 em água ultrapura.

As dispersões de trabalho de 3MPA-CdTe QDs foram preparadas em balões volumétricos de 10 mL pela adição de 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 mol L⁻¹ (pH 7.4), 40 μ L de dispersão estoque de 3MPA-CdTe QDs e volumes apropriados de soluções estoque de naftoquinona (1.0×10^{-3} mol L⁻¹ em metanol). O volume final foi atingido adicionando solução estoque de CTAB 1.0×10^{-3} mol L⁻¹. As medições de sinal das dispersões foram feitas após 5 min, a fim de que o sistema organizado atingisse a condição de equilíbrio.

As dispersões de trabalho de 3MPA-CdTe QDs em meio não organizado foram preparadas como descrito em estudos anteriores [18], através da adição de volumes apropriados de soluções estoque de naftoquinona (1.0×10^{-2} mol L⁻¹ em metanol) em dispersões tamponadas de 3MPA-CdTe QDs.

Amostras de Pau d'arco (250 mg da entrecasca) foram extraídas com etanol em um banho de ultrassom durante 10 min. Em seguida, estas misturas foram filtradas com seringas de plásticos acopladas a filtros PTFE de 0.45 μ m, coletadas em balões volumétricos de 10 mL e armazenadas sob refrigeração, no escuro. Uma amostra de madeira de *Tabebuia impetiginosa* (Ipê Roxo) foi finamente moída (cerca de 1 g) e, então, porções de 125 mg do pó resultante foram extraídos com etanol (como descrito acima) e as frações coletadas em balões volumétricos de 10,00 mL. As extrações foram efetuadas em triplicata. Finalmente, as amostras madeira de *Tabebuia impetiginosa* foram diluídas (75 vezes) em metanol e armazenadas sob refrigeração, no escuro.

Alíquotas de 20, 40, 80 μL e 1.00 mL dos extratos foram evaporados para eliminar o solvente, e reconstituídos nas dispersões de trabalho de 3MPA-CdTe QDs (meio organizado). Todas as medições foram realizadas em triplicata.

Análises utilizando cromatografia em camada fina (TLC)

Os testes de inferência da sílica em gel sobre a sonda fluorescente foram feitos com quantidades variadas de sílica em gel (de 0.1 a 1.0 g) retiradas de placas de TLC e colocadas em copos Becker, em seguida foram adicionados 3 mL de metanol. Estas misturas foram mantidas em um banho de ultrassom durante 5 min, após este período fez-se a filtração em seringas de plásticos acopladas a filtros (PTFE de 0,45 μm), os filtrados foram coletados em balões volumétricos de 10,00 mL. Em seguida solvente orgânico foi evaporado sob um fluxo de nitrogênio e as amostras foram redissolvidas nas dispersões organizadas de 3MPA-CdTe QDs. Alíquotas de 10, 20, 30 e 40 μL de solução padrão de LAP ($1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em metanol) foram adicionadas (spots) em placas de TLC. Depois de secas, as placas foram colocados em uma câmara para eluição do analito utilizando como mistura eluente clorofórmio:hexano 80:20% v/v.

Amostras simuladas contendo LAP, α -LAP, β -LAP nas proporções molares 1:1:1 e 1:2:2, foram aplicadas sobre as placa de TLC para separação o analito de interesse (LAP) das outras naftoquinonas. As amostras foram reconstituídas na dispersão organizada de 3MPA-CdTe QDs. Todas as medições foram realizadas em triplicata.

Análises cromatográficas por HPLC

Os extratos das amostras de madeira também foram analisados por HPLC (com detecção por absorção fotométrica a 278 nm). A cromatografia em regime isocrático foi feita utilizando-se como fase móvel uma solução metanol/ácido acético 5% (80/20 %v/v) [17], com fluxo 1 mL min^{-1} e volume de injeção 15 μL . Sob estas condições, o tempo de retenção do lapachol foi de 5.45 min. As curvas analíticas foram construídas através da injeção de 15 μL de soluções padrão de LAP de 1.0×10^{-5} a $8.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (2.42 a 19.36 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Todas as medições foram feitas em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Otimização do sinal da sonda em meio organizado

Estudos anteriores demonstraram que a fluorescência da sonda 3MPA-CdTe QDs é proporcionalmente extinta com o aumento das concentrações de LAP (no range de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) em sistemas aquosos tamponados [18]. Dando-se continuidade ao trabalho foram realizados testes com a mesma sonda fluorescente (3MPA-CdTe QDs) em sistemas organizados não tamponados. Foram testados quatro surfactantes diferentes (os não-iônicos Triton X-100 e Triton X-114, o aniônico SDS e o catiônico CTAB), na concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Estes foram utilizados para avaliar o efeito causado sobre a magnitude do sinal fluorescente e na estabilidade da sonda. Volumes de 40 µL da dispersão de estoque de 3MPA-CdTe QDs foram adicionados às soluções aquosas de surfactantes, e a fluorescência destas dispersões foi medida a cada 10 min, durante 60 min. Sob estas condições a concentração final de sonda foi de $6,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Os resultados indicaram que o SDS suprimiu completamente o sinal fluorescente da sonda (Figura 2A, linha a). Com Triton X-100, a fluorescência oscilou continuamente ao longo do tempo (Figura 2A, linha b), tornado o sinal da sonda inadequado para realização de medições confiáveis. Por outro lado, na dispersão contendo Triton X-114 (Figura 2A, linha c), a estabilidade do sinal foi alcançada após 20 min, mas a fluorescência foi relativamente fraca. Finalmente, observou-se que na presença do surfactante catiônico CTAB o sinal da sonda permaneceu estável e intenso ao longo do tempo, habilitando a utilização da sonda em meio organizado para futuras aplicações (Figura 2A, linha d).

A fluorescência da sonda 3MPA-CdTe QDs foi avaliada como uma função da concentração de CTAB em soluções não tamponadas. Nas dispersões com concentrações mais baixas de CTAB, tais como $1,0 \times 10^{-4}$ e $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (Figura 2B, linhas a e b, respectivamente), observou-se uma diminuição do sinal ao longo do tempo, provavelmente devido à falta de organização no sistema. Quando se utilizou uma solução de CTAB na concentração de $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (Figura 2B, linha c), o meio promoveu a estabilização da fotoluminescência da sonda após 10 min, o que se traduz em um início de organização do sistema, ajudando a estabilizar o sinal dos pontos quânticos. Dados da literatura indicam que a concentração micelar crítica (CMC) é obtida quando a concentração de CTAB é cerca de 0.7 a $9,4 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ [25]; portanto, a estabilização do sinal da sonda foi obtida em condições próximas à CMC. Os melhores resultados estabilidade do sinal luminescente foram obtidos utilizando-se concentrações de $1,0 \times 10^{-3}$ e $2,0 \times 10^{-3}$ de CTAB (Figura 2B, linhas d, e). Para

concentrações maiores (por exemplo, $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), o sinal emitido pela sonda foi estável apenas durante 30 min, decrescendo continuamente após este período (Figura 2B, linha f).

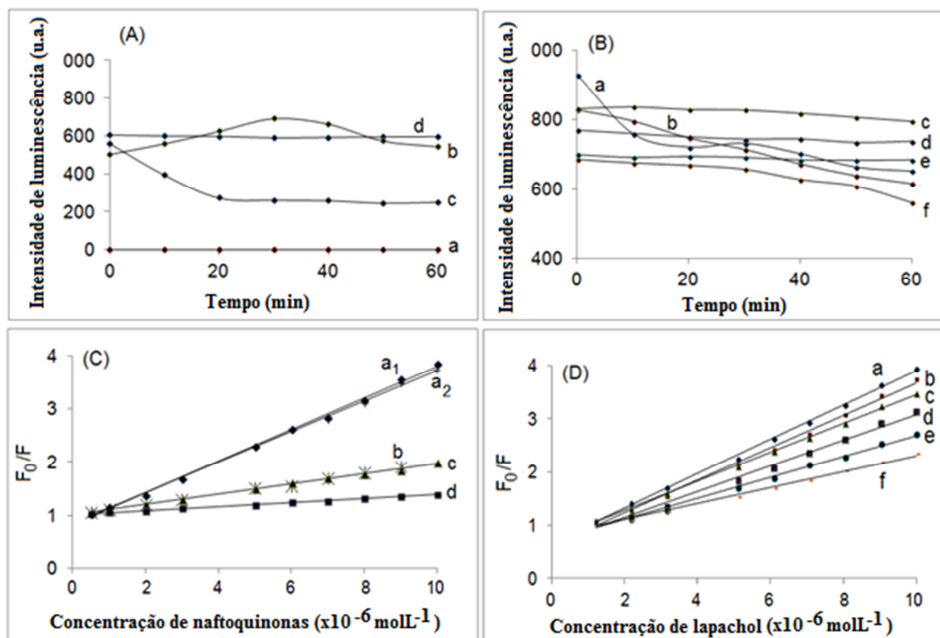


Figura 2. Intensidade de fluorescência de 3MPA-CdTe ($6.0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) em (A) SDS $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (a), Triton X-114 (b), Triton X-100 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (c), e CTAB $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (d), e (B) CTAB $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (a), CTAB $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (b), CTAB $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (c), CTAB $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (d), CTAB $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (e), e CTAB $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (f). Curvas de quenching de fluorescência do 3MPA-CdTe em presença de (C) lapachol sem correção de absorção (a₁) lapachol com correção de absorção (a₂), β -LAP (b), α -LAP (c) e β -LAPSULF (d), e (D) LAP à temperatura de 18°C (a), 20°C (b), 22°C (c), 26°C (d), 28°C (e) e 30°C (f).

A fim de se evitar possíveis variações no valor do pH da dispersão devido à adição de naftoquinonas, dois tampões diferentes (Tris-HCl e tampão fosfato de sódio) foram testados nos sistemas organizados contendo CTAB. Ambos os tampões foram testados em uma faixa de pH variando de 7.0 a 7.4, em 0.01 mol L^{-1} (adição de 1 ml). Os melhores resultados de tamponamento foram obtidos com tampão fosfato de sódio, que também não afetou a estabilidade da sonda no intervalo de pH testado. Em tais condições, a fotoluminescência medida a partir dos pontos quânticos no sistema tamponado (concentração final de CTAB igual a $9.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) manteve-se estável por mais de 60 min.

O uso de CTAB melhorou a solubilidade das naftoquinonas em meio aquoso, fato que permitiu eliminar a inclusão de quantidades significativas de solventes orgânicos nas dispersões dos pontos quânticos. O efeito provocado pela adição de pequenas alíquotas de solventes orgânicos à sonda fluorescente em meio organizado foi avaliada. Foram testados volumes até 150 μL de metanol e etanol, onde volume máximo de solvente orgânico

representa 1,5% do volume total da dispersão de trabalho do QDs. Esta quantidade é compatível com pequenos volumes de amostras (até 100 μL) adicionados às dispersões QDs em abordagens analíticas ultra-traço. Observou-se que não houve variação significativa do sinal de fluorescência (uma vez que desvio padrão relativo foi inferior a 3%), e, portanto, nenhum efeito sobre a sensibilidade ou a robustez da sonda foi encontrado quando o sistema é estabilizado com CTAB.

Extinção de fluorescência de QDs 3MPA-CdTe causado por naftoquinonas

Em um meio não organizado (pH 7.4), LAP e outras naftoquinonas (1.0×10^{-5} e 1.0×10^{-4} mol L^{-1}) promoveram a supressão de fotoluminescência da sonda 3MPA-CdTe. No entanto, o perfil de absorção na região do UV-vis (Tabela 1) indicou a necessidade de correção do efeito filtro, a fim de se obter a extensão real do quenching estático de fluorescência. O modelo de Stern-Volmer [26] foi utilizado para estabelecer uma relação entre a fluorescência medida na dispersão de QDs após a adição das naftoquinonas (F) e a concentração de naftoquinona na dispersão [*naftoq.*], como pode ser visto na Equação 1. As curvas de quenching de fluorescência (valores com correção de absorção), obtidas através adição de naftoquinonas na faixa de 1.0×10^{-5} a 1.0×10^{-4} mol L^{-1} , deram origem a constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) de 2.18×10^3 (β -LAP), 2.04×10^3 (α -LAP) e 1.92×10^3 mol L^{-1} (β -LAPSULF), como pode ser visto na Tabela 2, onde o K_{SV} do LAP foi de (3.97×10^3 L mol^{-1}), Estas constantes foram obtidas nas mesmas condições para fins de comparação.

$$F_0/F = 1 + K_{sv} [\text{naftoq.}] \quad (1)$$

Tabela 1: Valores de absorvância das naftoquinonas: 1.0×10^{-4} mol L^{-1} em meio não organizado e 1.0×10^{-5} mol L^{-1} em meio organizado contendo CTAB.

Naftoquinona	Absorvância meio não organizado (540/380 nm)	Absorvância meio organizado (560/380 nm)
LAP	0.0174/0.1626	0.0003/0.0230
β -LAP	0.0272/0.1297	0.0007/0.0197
α -LAP	0.0311/0.1316	0.0001/0.0326
β -LAPSULF	0.0316/0.1327	0.0008/0.0329

Em sistemas organizados contendo CTAB, o efeito do quenching gerado pelo LAP e pelas outras naftoquinonas foi mais pronunciado, aumentado de 19 (β -LAPSULF) até 75 vezes (LAP), indicado pelos valores calculados de K_{SV} , que variaram de 3.70×10^4 (para β -LAPSULF) a 2.97×10^5 (para a LAP), mostrados na Tabela 2. Em outras palavras, um quenching da mesma magnitude do que os obtidos em sistemas não organizados tamponados

foi obtido com a adição de quantidades significativamente menores de naftoquinonas em dispersões aquosas da sonda em meio organizado. Outro aspecto positivo decorreu do aumento da sensibilidade da resposta do quenching: como a concentração de naftoquinonas requerida para obter a resposta analítica diminuiu, a absorção destas naftoquinonas no comprimento de onda de excitação da sonda (380 nm), e no comprimento de onda de emissão (560 nm), tornaram-se insignificantes (Tabela 1). Nenhuma atenuação relevante da sonda por efeito filtro foi encontrada. Portanto, o novo modelo de quenching para quantificação de naftoquinonas não requer nenhuma correção para o efeito de filtro, pois ele não existe. Este fato foi demonstrado pelas sensibilidades semelhantes obtidas nas duas curvas de calibração de Stern-Volmer para LAP utilizando a sonda em CTAB antes ($2.98 \pm 0,07 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$) e depois da correção da absorção ($2.88 \pm 0,12 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$), como pode ser visto na Figura 2C, curvas a_1 e a_2 .

Tabela 2: Parâmetros de Stern-Volmer, curvas em meios organizado e não organizado na presença da sonda 3MPA-CdTe QDs ($6.0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$).

Naftoquinonas	Faixa linear (mol L^{-1})	R^2	Equação da curva	K_{sv} (L mol^{-1})	LD ^{***} (mol L^{-1})
LAP ^{*(a)}	1×10^{-5} to 1×10^{-4}	0.9979	$3996,8X - 0.9600$	3.97×10^3	8.0×10^{-6}
β -LAP *	1×10^{-5} to 1×10^{-4}	0.9967	$2184X + 0.9496$	2.18×10^3	2.9×10^{-5}
α -LAP *	1×10^{-5} to 1×10^{-4}	0.9968	$2077.4X + 0.9997$	2.04×10^3	4.5×10^{-5}
β -LAPSULF *	1×10^{-5} to 9×10^{-5}	0.9932	$1968.7X + 0.8231$	1.92×10^3	4.0×10^{-5}
LAP **	5×10^{-7} to 1×10^{-3}	0.9980	$298740X + 0.8218$	2.97×10^5	1.6×10^{-7}
β -LAP **	5×10^{-7} to 9×10^{-6}	0.9960	$97989X + 1.0084$	1.00×10^5	2.8×10^{-7}
α -LAP **	1×10^{-7} to 1×10^{-5}	0.9979	$96473X + 1.0134$	9.63×10^4	6.3×10^{-7}
β -LAPSULF **	1×10^{-7} to 1×10^{-5}	0.9971	$37472X + 1.0092$	3.70×10^4	6.2×10^{-7}

^(a) referência 24

* meio não organizado

** meio organizado com CTAB

*** LD - limite de detecção

Curvas de quenching de fluorescência em meio organizado também foram obtidas na faixa linear de 5.0×10^{-7} a $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, para α -LAP e β -LAP, e para β -LAPSULF na faixa de 5.0×10^{-7} a $9.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, como mostrado na Figura 2C, linhas b, c, d respectivamente. O comportamento seguiu a mesma tendência observada em sistemas não organizados tamponados, com LAP induzindo um quenching mais eficaz do que seus isômeros α -LAP e β -LAP. β -LAPSULF gerou um quenching menos eficaz que o das demais naftoquinonas, pois o grupo sulfônico torna difícil a interação entre os QDs e o grupo quinônico. Isto dificulta a formação do complexo e a transferência de energia entre as espécies tornando o quenching estático menos intenso.

O efeito de quenchig produzido pelas naftoquinonas na sonda (dispersão organizada de 3MPA-CdTe em CTAB) é mostrado na Figura 3. A melhoria do efeito de quenching em meio organizado provavelmente foi devido a uma maior eficácia na interação entre analitos e QDs. O surfactante CTAB é susceptível a formação de um arranjo em bicamada, tal como descrito por Chang *et al.* [27], esta característica pode ter favorecido o aumento do contato entre as espécies (QDs e naftoquinonas) quando estas se encontram no interior da micela.

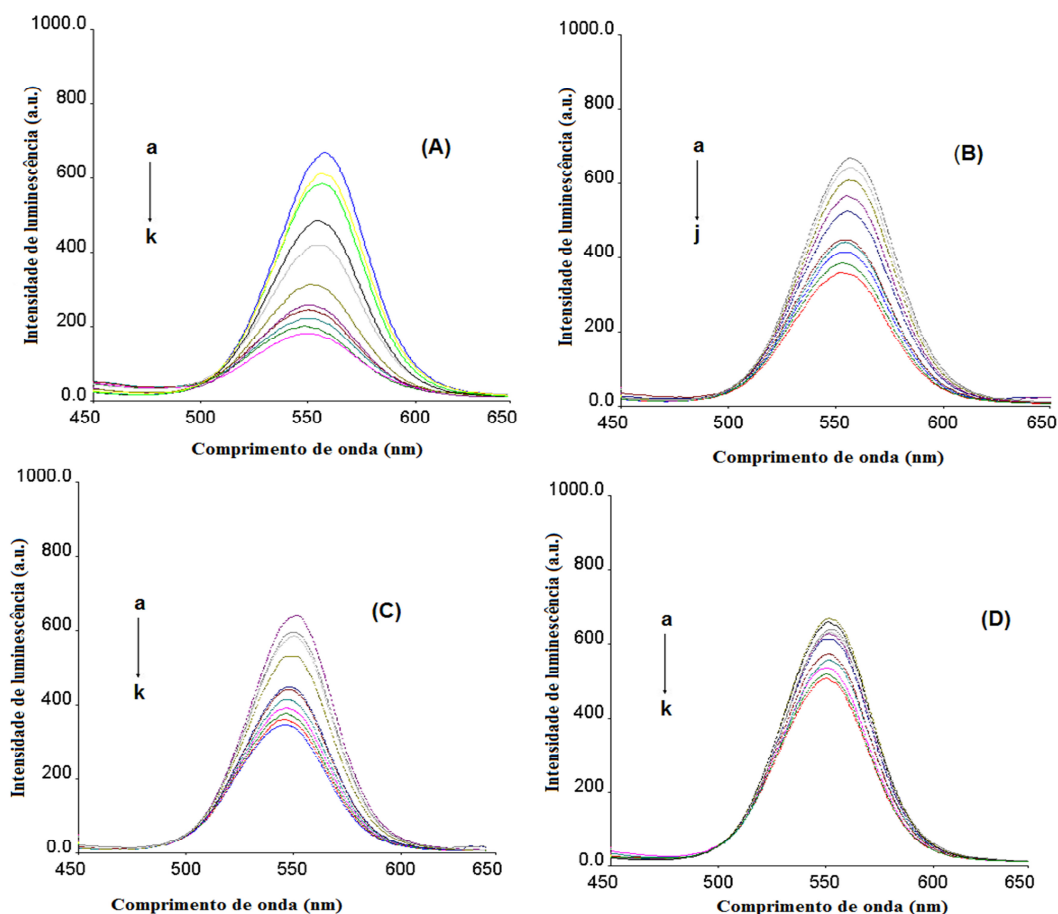


Figura 3. Efeito do quenching causado pelas naftoquinonas sobre a sonda fluorescente 3MPA-CdTe (6.0×10^{-8} mol L⁻¹); A, C e D, *a-k*: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 ($\times 10^{-6}$ mol L⁻¹) de LAP (A), α -LAP (C) e β -LAPSULF (D); B, *a-j*: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 ($\times 10^{-6}$ mol L⁻¹) de β -LAP (B).

Um estudo realizado com a sonda fluorescente (em sistema organizado) na presença de concentrações crescentes de LAP em diferentes temperaturas (18-30 °C) indicou que um tipo estático de quenching de fluorescência. Na Figura 2D, as linhas de *a* até *f*, mostram a resposta para o LAP, exemplificando a tendência geral de quenching estático para as quatro naftoquinonas.

Os estudos realizados indicaram diversas vantagens na utilização do sistema 3MPA-CdTe em CTAB. Em primeiro lugar, o sinal luminescente dos pontos quânticos foi estabilizado rapidamente no meio organizado, permitindo medições imediatamente após a preparação das dispersões, até, pelo menos, 60 min. Em contraste, nos sistemas não organizados, era necessário pelo menos 30 min para estabilização do sinal [18]. Em segundo lugar, a adição de solventes orgânicos (metanol), geralmente necessária para solubilizar as amostras em meio não organizado, não é necessária em grandes quantidades no sistema organizado. Finalmente, o meio organizado pode favorecer a diminuição das distâncias das espécies quando estas se encontram no interior das micelas, melhorando a transferência de energia e o efeito de extinção causado pelas naftoquinonas. Sob estas condições, não há contribuição de efeito de filtro interno das naftoquinonas, pois o aumento na sensibilidade da sonda habilitou a utilização de soluções estoque menos concentradas quando comparadas com meio não organizado.

Características do sistema organizado 3MPA-CdTe QDs para a determinação de naftoquinonas

LAP é a naftoquinona mais importante (e mais abundante) em fontes naturais do gênero *Tabebuia* [10]. Desta forma, a metodologia baseada no quenching de fluorescência da sonda 3MPA-CdTe QDs em sistema organizado foi aplicada na determinação desta naftoquinona. A resposta linear foi observada até $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($2.4 \mu\text{g mL}^{-1}$), de lapachol ($R^2 = 0.9980$ e $r = 0.9989$), com uma modelo de equação $(F_0/F) = 2.98 \times 10^5 [\text{LAP}] + 0.8218$. O limite de detecção (LD) foi de $1.6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (39 ng mL^{-1}). O LD foi calculado como a concentração de LAP capaz de reduzir a fluorescência média da dispersão dos QDs (x_b), também chamado branco, para um valor igual a $x_b - 3s_b$, onde s_b é o desvio padrão de 10 medições do branco.

A precisão das medições de LAP (admitindo-se $s_{(F_0/F)}$, como o desvio padrão de F_0/F) foi calculado como a variação do valor de F_0/F tendo em consideração dez soluções independentes (em dois níveis de concentração de LAP), como indicado em Aucélio *et al.* [18]. Os valores de $s_{(F_0/F)}$, em percentuais, foram de 2,0% e 1,9%, respectivamente, para os níveis de concentração $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $4.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Os limites de detecção para as outras naftoquinonas (em sistema organizado) também foram calculadas. Os valores de LD encontrados foram da ordem de $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, como indicado na Tabela 2 juntamente com outros parâmetros analíticos relevantes.

Estudo de interferência e otimização da cromatografia em camada fina (TLC) para separação de LAP

Testes de interferência foram realizados referentes a variações causadas no sinal analítico do lapachol quando este encontra-se na presença de β -LAP, α -LAP e β -LAPSULF. A resposta analítica gerada pelo LAP na sonda em sistema organizado foi obtida através da relação entre supressão do sinal fluorescente dos QDs na presença de LAP (F_{LAP}) e a fluorescência medida a partir de misturas de LAP com outras naftoquinona ($F_{LAP + naftoquinona}$). As proporções molares testadas entre LAP e as outras naftoquinonas foram: 1:0.2, 1:0.4, 1:0.6; 1:0.8 e 1:1, com a concentração de LAP igual a $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Foi estabelecido que uma diferença maior do que 3% entre F_{LAP} e $F_{LAP + naftoquinona}$ caracteriza uma interferência causada por um quenching eficaz pelas outras naftoquinonas. Na presença de α -LAP ou β -LAP, interferências são detectadas, respectivamente, nas proporções de 1:0.4 e 1:0.6. No caso de β -LAPSULF, a interferência é observada apenas na razão molar de 1:1. Como β -LAPSULF não é encontrado em fontes naturais, tais interferências não são consideradas um problema. Todavia, os isômeros β -LAP e α -LAP podem ser encontrados em fontes naturais, em geral, em quantidades insignificantes em comparação com LAP. A fim de eliminar qualquer possibilidade de interferência provocada por estes isômeros, um procedimento de separação por cromatografia em camada fina (TLC) do LAP foi desenvolvido, com posterior quantificação na sonda organizada.

Na abordagem proposta por TLC, o *spot* contendo o analito de interesse é separado e extraído com um solvente adequado antes de ser redissolvido na dispersão de trabalho QDs [28]. Nesta abordagem utilizaram-se pequenas quantidades da fase estacionária em contato com a dispersão de trabalho. Os resultados não indicaram variações de sinal da dispersão da organizada quando quantidades de sílica de até 0,6 g foram utilizadas. Esta quantidade de sílica é maior do que a necessária para a separação das naftoquinonas. A eficiência da extração de LAP das placas de TLC foi avaliada utilizando-se diferentes alíquotas de solução estoque (10, 20, 30 e 40 μL) de LAP. Nas condições mencionadas na seção experimental, o fator de retenção (RF) para LAP foi de 0.78. Os valores de RF para β -LAP e α -LAP foram respectivamente 0.52 e 0.09, o que indica a completa separação do LAP de seus isômeros. Depois da extração do analito das placas de TLC, foi realizada a quantificação usando a dispersão 3MPA-CdTe QDs em CTAB. Os resultados das recuperações variaram de 98 a 102%. Estes indicam que nos níveis testados, não houve perda de LAP durante a separação e a extração. A TLC foi aplicada a amostras simuladas contendo LAP, β -LAP e α -LAP nas

proporções 1:1:1 e 1:2:2, com a concentração de LAP fixada em 1.0×10^{-6} mol L⁻¹. As recuperações obtidas para o LAP variaram de 99 a 101%.

Análises dos extratos utilizando dispersão organizada 3MPA-CdTe QDs e HPLC

Dois tipos de amostras foram analisadas pelo método proposto: (i) três diferentes extratos de casca interna supostamente de *Tabebuia impetiginosa* (*T. impetiginosa*) disponíveis comercialmente (ii) e uma de madeira de *T. impetiginosa*.

Amostras contendo 250 mg de cada um dos extratos comerciais (dois na forma de pó e um na forma de comprimido que foi pulverizado) foram pesadas e extraídas com etanol. Este solvente é um dos indicados para os processos de extração de naftoquinonas a partir de fontes naturais [29]. Uma porção de 5.0 mL de cada solução extraída foi concentrada para 0.5 mL, e em seguida 10 µL de cada amostra foi adicionada sobre as placas de TLC. Surpreendentemente, após eluição, a presença de LAP não foi detectada (no valor R_F característico). A fim de confirmar estes resultados, as análises de HPLC destas amostras foram feitas de acordo com os procedimentos da literatura [17], e não se observou pico do LAP, o que confirma a ausência de LAP nestas amostras. Este não foi o primeiro relato de mostras com ausência de LAP em extratos de casca interna de *Tabebuia*. Em 1988 um estudo realizado com 12 extratos comerciais de casca interna revelou que apenas uma das amostras comerciais continha LAP [30]. O resultado indicou que estes produtos comerciais não eram de Pau d'arco verdadeiro.

A fim de verificar se outras substâncias presentes nos extratos poderiam interferir no método proposto, diferentes alíquotas (20, 40 e 80 µL) de cada solução extraída foram evaporadas para eliminar o solvente e em seguida reconstituídas com a dispersão de trabalho organizada de 3MPA-CdTe QDs em CTAB. Os resultados mostraram que os extratos etanólicos não causaram interferência nas medições de fluorescência, pois os valores da relação F₀/F variaram de 0.99 a 1.02.

Sabe-se que a madeira do Ipê Roxo contém LAP em abundância, portanto, cerca de 1 g de pó de Ipê roxo foi preparado pulverizando uma amostra comercial de madeira de Ipê Roxo. O diagrama da Figura 4A resume o processamento da amostra (Figura 4A, etapas 1 e 2) e as análises realizadas por dois métodos diferentes (Figura 4A, etapas 3 e 4). Para a análise por HPLC, foi necessário construir uma curva de calibração com padrões de LAP de 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ (2.42 µg mL⁻¹) a 8.0×10^{-5} mol L⁻¹ (19.36 µg mL⁻¹), seguindo as condições descritas na literatura [17]. O cromatograma (15 µL de volume de amostra injetada) indicou a presença de LAP no tempo de retenção de 5.45 minutos, como a solução estava muito concentrada, foi

necessário fazer uma diluição de 75 vezes (Figura 4A, etapa 2). Subsequentemente esta amostra diluída foi analisada (Figura 4A, etapa 3) e o resultado indicou uma concentração de LAP de $1.6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (equivalente a $3.87 \mu\text{g mL}^{-1}$).

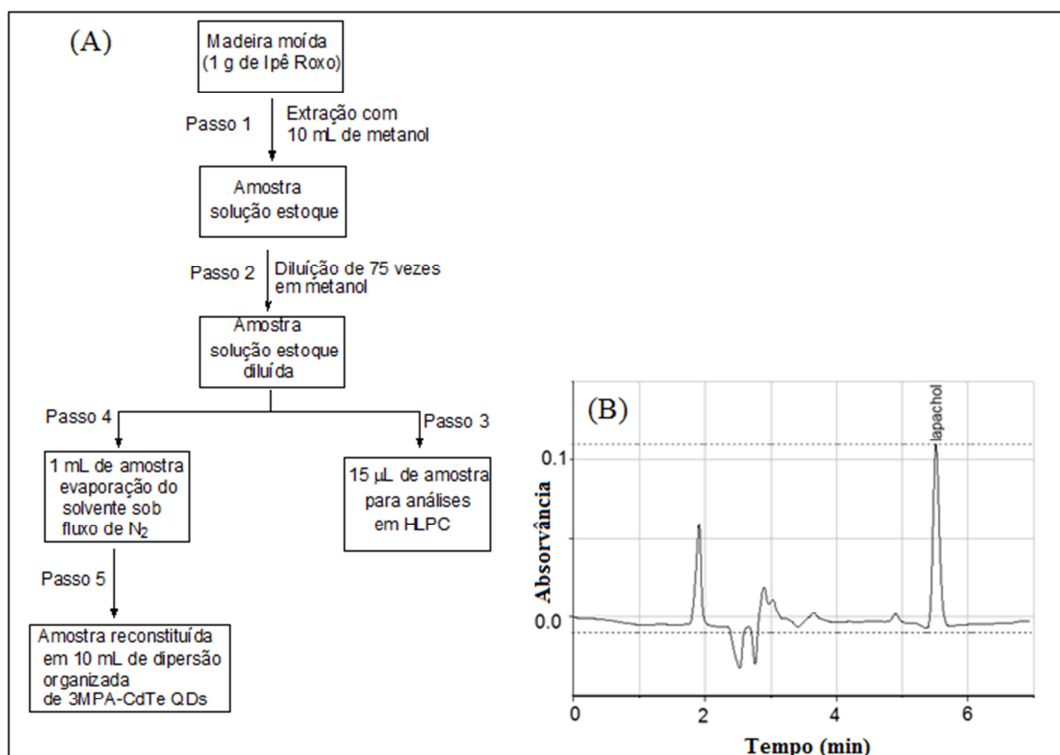


Figura 4. Diagrama de preparação de amostras e análises (A), e cromatograma (B) de determinação de LAP ($1.6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em extratos de *Tabebuia impetiginosa* (Ipê Roxo).

Alíquotas de 1.0 mL da mesma amostra diluída foram evaporadas sob fluxo de N_2 e reconstituídas com 10 mL da dispersão de trabalho organizada de 3MPA-CdTe QDs em CTAB. O resultado indicou uma concentração de LAP na dispersão reconstituída de $1.5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (equivalente a $0.36 \mu\text{g mL}^{-1}$). Na Tabela 3 encontram-se os resultados (três amostras feitas em triplicata) das determinações feitas através do método proposto e por HPLC. A concentração medida na dispersão organizada de CTAB foi dez vezes mais baixa do que a medida com o método por HPLC, devido à diluição de 10 vezes necessária para permitir a resposta analítica dentro do range linear do método (750 vezes em relação à solução estoque de amostra inicial).

Tabela 3: Dosagem de lapachol em amostras de madeira de Ipê Roxo.

Amostra	Método	Condição experimental (mol L ⁻¹)	Concentração da Solução estoque (mol L ⁻¹)	% de LAP na madeira
1	Quenching de fluorescência do 3MPA-CdTe QDs em CTAB	[*] (1.52 ±0.08) x 10 ⁻⁶	(1.14 ±0.06) x 10 ⁻³	2.20 ±0.11
2	HPLC	^{**} (1.60 ±0.01) x 10 ⁻⁵	(1.20 ±0.005) x 10 ⁻³	2.32 ±0.01

* amostra de solução estoque diluída 750 vezes.

** amostra de solução estoque diluída 75 vezes.

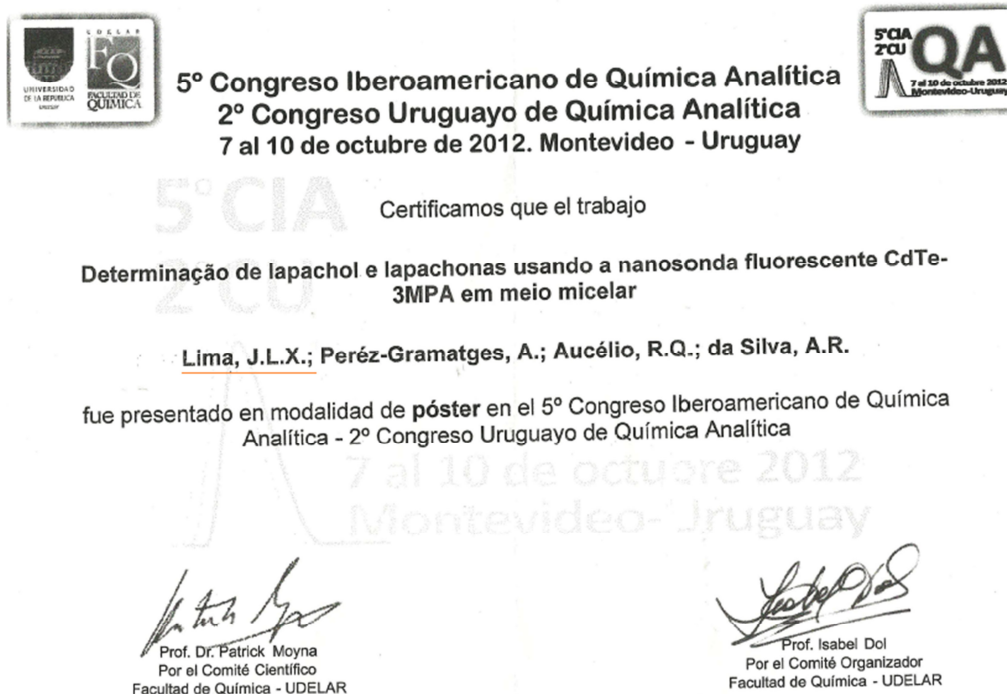
Os resultados das análises por HPLC indicaram que em 0.125 g de pó de amostra de madeira de *Tabebuia impetiginosa* haviam 2.9 x 10⁻³ g de LAP (2.32% m/m de LAP na madeira), enquanto que a análise feita com o método proposto indicou um teor de 2.7 x 10⁻³ g de LAP (2.12% m/m de LAP na madeira). Um teste estatístico comparativo (teste t de Student) revelou que não há nenhuma diferença significativa entre os resultados obtidos pelos diferentes métodos ($t_{\text{calculado}} = 1.8$ e $t_{\text{exp}} = 9.8$, com um limite de confiança de 95% para $n_1 = n_2 = 3$).

CONCLUSÃO

O uso do meio organizado com CTAB melhorou a fluorescência da sonda 3MPA-CdTe QDs em termos de estabilidade do sinal emitido pela mesma, melhorando também o efeito de quenching causado pela presença das naftoquinonas (eliminando a necessidade de correções para o efeito filtro). A presença de CTAB também melhorou a robustez das medições em amostras complexas. Para LAP, o quenching estático foi mais eficaz, o que melhorou o LD cerca de 50 vezes quando comparado com a análise feita em dispersões de pontos quânticos não organizadas [18]. O LD (1.6 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ ou 0.039 µg mL⁻¹) é o melhor relatado na literatura para o LAP, este foi melhor que os descritos até então. A abordagem acoplada a TLC foi bem sucedida em relação às separações, permitindo a detecção de lapachol em amostras simuladas. A determinação deste analito presente em amostras reais de extratos de madeira de *Tabebuia impetiginosa* também foi bem sucedida.

ANEXO

- Trabalho apresentado no 5° Congreso Iberoamericano de Química Analítica (2012), referente ao trabalho do bolsista de iniciação científica Juliano Leodônio X. Lima.



Trabalho aceito para publicação em 04/2013 no periódico Microchemical Journal.



Improved quantum dots fluorescence quenching using organized medium: A study of the effect of naphthoquinones aiming the analysis of plant extracts[☆]

Juliano L.X. Lima^a, Aurora Pérez-Gramatges^b, Ricardo Q. Aucélio^a, Andrea R. da Silva^{a,*}

^a Chemistry Department, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 22451-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21431-909, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Informo que em Janeiro de 2013 o aluno bolsista Juliano Lima Xavier Leodônio desligou-se da iniciação científica, para se dedicar ao intercâmbio acadêmico na Espanha. Desta forma a bolsa de iniciação PIBIC foi transferida para aluna Juliana Teles Real (atual bolsista).

REFERÊNCIAS

- [1] W.R. Algar, A.J. Tavares, U.J. Krull, Beyond labels: A review of the application of quantum dots as integrated components of assays, bioprobes, and biosensors utilizing optical transduction, *Anal. Chim. Acta* 673 (2010) 1-25.
- [2] A.M. Smith, S. Dave, S.M. Nie, L. True, X.H. Gao, Multicolor quantum dots for molecular diagnostics of cancer, *Expert Rev. Mol. Med.* 6 (2006) 231-244.
- [3] H.Y. Acar, R. Kas, E. Yurtsever, C. Ozen, I. Lieberwirth, Emergence of 2MPA as na Effective Coating for Highly Stable and Luminescent Quantum Dots, *J. Phy. Chem. C* 113 (2009) 10005-10012.
- [4] A. Shavel, N. Gaponik, A. Eychmüller, Efficient UV-Blue Photoluminescing Thiol-Stabilized Water-Soluble Alloyed ZnSe(S) Nanocrystals, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 5905-5908.
- [5] V.T. Liveri, *Controlled Synthesis of Nanoparticles in Microheterogeneous Systems*, Springer, New York, 2006, pp.1-74.
- [6] J.M. Lin, M. Yamada, Microheterogeneous systems of micelles and microemulsions as reaction media in chemiluminescent analysis, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 99-107.
- [7] A. Guleria, S. Singh, M.C. Rath, A.K. Singh, S. Adhikari, S.K. Sarkar, Tuning of photoluminescence in cadmium selenide nanoparticles grown in CTAB based quaternary waterin-oil microemulsions, *J. Lumin.* 132 (2012) 652-658.
- [8] H. Fan, Nanocrystal-micelle: synthesis, self-assembly and application, *Chem. Commun.* (2008) 1383-1394.
- [9] C.O. Salas, M. Faúndez, A. Morello, J. D. Maya, R.A. Tapia, Natural and Synthetic Naphthoquinones Active Against *Trypanosoma Cruzi*: An Initial Step Towards New Drugs for Chagas Disease, *Curr. Med. Chem.* 18 (2011) 144-161.
- [10] H. Hussain, K. Krohn, V.G. Ahmad, G.A. Miana, I.R. Greend, Lapachol: an overview, *Arkivoc* ii (2007) 145-171.
- [11] E. PATERNÒ, Ricerche sull'acido lapacico, *Gazz. Chim. Ital.* 12 (1882) 337-392.
- [12] J.R.G. Castellanos, J.M. Prieto, M. Heinrich. Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*)-A global ethnopharmacological commodity? *Journal of Ethnopharmacology* 121 (2009) 1-13.
- [13] S.G.C. Fonseca, R.M.C. Braga, D.P. de Santana, Lapachol, química, farmacologia e métodos de dosagens, *Rev. Bras. Farm.* 84 (1) (2003) 9-16.
- [14] J.M. Finkel, S.D. Harrison Jr., Fluorometric method for the determination of lapachol in serum, *Anal. Chem.* 41 (1969) 1854-1855.
- [15] S.K.B. Alcanfôr, S.V. Cardoso, C.G de Lima, Fluorimetric studies of some quinones and quinonoid compounds after reduction reaction, *Anal. Chim. Acta* 289 (1994) 273-290

- [16] J. Steinert, H. Khanlaf, M. Rimpler, HPLC separation and determination of naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones and related compounds in extracts of *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae), *J. Chromatogr. A* 693 (1995) 281-287.
- [17] S.G.D. Fonseca, L.B.L. da Silva, R.F. Castro, D.P. de Santana, Validação de metodologia analítica para doseamento de soluções de lapachol por CLAE, *Quim. Nova* 27 (2004) 157-159.
- [18] R.Q. Aucélio, A.I. Pérez-Cordovés, J.L.X. Lima, A.B.B. Ferreira, A.M.E. Guas, A.R. da Silva. Determination of lapachol in the presence of other naphthoquinones using 3MPA-CdTe quantum dots fluorescent probe. *Spectrochim. Acta A* 100 (2013) 155-160.
- [19] S.C. Hooker, The Constitution of Lapachol and its Derivatives. Part V. The Structure of Paternò's "Isolapachone"^{1,2}, *J. Am. Chem. Soc.* 58 (1936) 1190-1197.
- [20] L.F. Fieser, Naphthoquinone Antimalarials. XVI. Water-Soluble Derivatives of Alcoholic and Unsaturated Compounds, *J. Am. Chem. Soc.* 70 (1948) 3232-3237.
- [21] C.A.C. Ferreira, V.F. Ferreira, A.V. Pinto, R.S.C. Lopes, M.C.R. Pinto, A.J.R. da Silva, ¹³CNMR Spectra of natural products Part 5 - Naphthopyrandiones and naphthofurandiones, *An. Acad. Bras. Cienc.* 59 (1987) 5-8.
- [22] A.V. Pinto, M.C.F.R. Pinto, C.G.T. de Oliveira, Síntese das α - e β -nor-lapachonas, propriedades em meio ácido e reações com N-bromosuccinimida, *An. Acad. Bras. Cienc.* 54 (1982) 107-114.
- [23] V.F. de Andrade-Neto, M.O.F. Goulart, J.F. da Silva Filho, M.J. da Silva, M.C.F.R. Pinto, A.V. Pinto, M.G. Zalis, L.H. Carvalho, A.U. Krettli, Antimalarial activity of phenazines from lapachol, -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (5) (2004) 1145-1149.
- [24] K.G. Casey, E.L. Quitevis, Effect of solvent polarity on nonradiative processes in xanthenes dyes: Rhodamine B in normal alcohols, *J. Phys. Chem.* 92 (1988) 6590-6594.
- [25] T.J.V. Prazeres, M. Beija, F.V. Fernandes, P.G.A. Marcelino, J.P.S. Farinha, J.M.G. Martinho, Determination of the critical micelle concentration of surfactants and amphiphilic block copolymers using coumarin 153, *Inorg. Chim. Acta* 381 (2012) 181-187.
- [26] J. Lakowicz, *Principles of fluorescence Spectroscopy*, third ed., Springer, New York, 2006.
- [27] B. Chang, X. Zhang, J. Guo, Y. Sun, H. Tang, Q. Ren, W. Yang, General one-pot strategy to prepare multifunctional nanocomposites with hydrophilic colloidal nanoparticles core/ mesoporous silica shell structure, *J. Colloid Interface Sci.* 377 (2012) 64-75.
- [28] J.M. Carvalho, K.C. Leandro, A.R. da Silva, R.Q. Aucélio, Selective determination of rutin by fluorescence attenuation of the CdS-2-mercaptopropionic acid nanocrystal probe, *Anal. Lett.* 46 (2013) 207-224.

[29] R.L.R. P. Jácome, A.B. de Oliveira, D.L. Raslan, A. Müller, H. Wagner, Análise de naftoquinonas em extratos brutos de raízes de *Zeyheria Montana* M. (bolsa-de-pastor), *Quim. Nova* 22 (1999) 175-177.

[30] D.V.C. Awang, Commercial taheebo lacks active ingredient, *Can. Pharm. J.* (1888) 323-326.