



UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**Avaliação de sondas fluorogênicas baseadas no conceito *off-on*
para determinação de Al(III) em amostras biológicas e de água**

Jaelson Silva Santos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió - AL

Jaelson Silva Santos

Avaliação de sondas fluorogênicas baseadas no conceito *off-on* para determinação de Al(III) em amostras biológicas e de água

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia do Instituto de Química e Biotecnologia - IQB, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre, outorgado pela Universidade Federal de Alagoas - UFAL.

Orientador: Prof^o Dr^o Josué Carinhanha Caldas Santos

MACEIÓ/AL

2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S237a Santos, Jaelson Silva.

Avaliação de sondas fluorogênicas baseadas no conceito off-on para determinação de Al(III) em amostras biológicas e de água / Jaelson Silva Santos. – 2018.

70 f. : il. color.

Orientador: Josué Carinhanha Caldas Santos.

Coorientadora: Silvia Helena Cardozo.

Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 64-70.

1. Química analítica. 2. Sonda Al(III). 3. Sondas fluorogênicas. 4. Base de Schiff. 5. Imageamento (Química). I. Título.

CDU: 543.427.34

RESUMO

Os íons Al(III) em determinado nível de concentração no corpo humano contribuem para a incidência de doenças gastrointestinais, cardíacas, Alzheimer, Parkinson, insuficiência renal crônica, entre outros. A determinação de Al(III) é um desafio em relação a outros metais, principalmente devido à sua fraca capacidade de coordenação, capacidade de hidratação e ausência de propriedades espectroscópicas intrínsecas. As bases de Schiff possuem características adequadas para atuar como sondas analíticas em sistemas vivos e químicos. Além disso, estes compostos têm na sua estrutura pelo menos um grupo de imina (-RC=N-) e a capacidade de formar complexos com metais. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método analítico baseado na complexação de Al(III) com uma base Schiff em meio aquoso. O método é baseado na ausência de fluorescência da base de Schiff livre ou dos íons Al(III) no entanto, o complexo formado possui elevada fluorescência. Desta forma, foram avaliadas seis bases de Schiff para estabelecer qual apresentaria a melhor resposta analítica. Entre os compostos avaliados, a maior sensibilidade foi alcançada para a sonda fluorogênica 3A8 ($\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 506 \text{ nm}$). O método desenvolvido apresentou como condições otimizadas pH 5,5 em tampão MES (25 mM) e concentração de 3A8 de 40 μM . Foram avaliados diferentes solventes (água, acetona, acetonitrila, etanol e metanol), porém o método foi mais sensível em meio aquoso. A estequiometria do complexo foi definida como 3:1 (sonda:metal) considerando o método da variação contínua de Job e cálculos teóricos. A faixa linear foi de 0,1-4,0 μM (equivalente a 2,7-108 $\mu\text{g L}^{-1}$) com limite de detecção de 0,017 μM (0,45 $\mu\text{g L}^{-1}$) e RSD < 3,5% com o slit 3:5 e 0,01-2,0 μM (equivalente a 0,27-54 $\mu\text{g L}^{-1}$) com limite de detecção de 0,003 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (0,08 $\mu\text{g L}^{-1}$) e RSD < 3,5% com o slit 5:5. As espécies Na^+ , K^+ , Mg(II) , Sr(II) , Ba(II) , Ca(II) , Zn(II) , Ni(II) , Mn(II) , As(III) , SO_3^{2-} , H_2PO_4^- , SiO_3^{2-} , SO_4^{2-} , NO_3^- , Br^- , Cl^- e I^- não interferiram no método, já as espécies Cd(II) , Cu(II) , Hg(II) , Mg(II) , Ni(II) , Cr(III) e Fe(III) não interferiram a um menor nível de concentração. A sonda mostrou-se reversível, podendo ser aplicada como sensor para alumínio. O método proposto foi aplicado em amostras de água de diálise, água mineral e água potável, obtendo concentrações abaixo do estabelecido pela ANVISA (0,37 μM) e pelo CONAMA (3,7 μM). O método proposto ainda foi utilizado na marcação de alumínio em células de raízes de milho apresentando fluorescência na endoderme, e posteriormente sendo comparado com lumogallion. Por fim, o método desenvolvido utilizando a base Schiff 3A8 para a determinação de Al(III) mostrou-se sensível, simples, preciso e aplicável a diferentes amostras.

Palavras-chave: Al(III), base de Schiff, sondas fluorogênicas, imageamento, água de dialise.

ABSTRACT

Al (III) ions at a certain level of concentration in the human body contribute to the incidence of gastrointestinal, cardiac, Alzheimer's, Parkinson's, chronic renal failure, among others. The determination of Al (III) is a challenge in relation to other metals, mainly due to its poor coordination capacity, hydration capacity and absence of intrinsic spectroscopic properties. The Schiff bases have adequate characteristics to act as analytical probes in living and chemical systems. In addition, these compounds have in their structure at least one imine group (-RC = N-) and the ability to form complexes with metals. Thus, the objective of this work was the development of an analytical method based on the complexation of Al (III) with a Schiff base in aqueous medium. The method is based on the absence of fluorescence of the free Schiff base or Al (III) ions, however, the complex formed has high fluorescence. In this way, six Schiff bases were evaluated to establish which would present the best analytical response. Among the evaluated compounds, the highest sensitivity was reached for the fluorogenic probe 3A8 ($\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 506 \text{ nm}$). The developed method presented optimized conditions pH 5.5 in MES buffer (25 mM) and 3A8 concentration of 40 μM . Different solvents (water, acetone, acetonitrile, ethanol and methanol) were evaluated, but the method was more sensitive in aqueous medium. The stoichiometry of the complex was defined as 3: 1 (probe: metal) considering the continuous variation method of Job and theoretical calculations. The linear range was 0.1-4.0 μM (equivalent to 2.7-108 $\mu\text{g L}^{-1}$) with detection limit of 0.017 μM (0.45 $\mu\text{g L}^{-1}$) and RSD <3, 5% with slit 3: 6 and 0.01-2.0 μM (equivalent to 0.27-54 $\mu\text{g L}^{-1}$) with a detection limit of 0.003 μM (0.08 $\mu\text{g L}^{-1}$) and RSD <3.5% with slit 5: 5. The Na⁺, K⁺, Mg (II), Sr (II), Ba (II), Ca (II), Zn (II), Ni (II), Mn (II), As (III), SO₃²⁻, H₂PO₄ (II), Hg (II), Mg (II), Ni (II), and Cd (II), Cr (III) and Fe (III) did not interfere at a lower level of concentration. The probe was reversible and could be applied as a sensor for aluminum. The proposed method was applied in samples of dialysis water, mineral water and drinking water, obtaining concentrations below that established by ANVISA (0.37 μM) and CONAMA (3.7 μM). The proposed method was still used in the marking of aluminum in cells of corn roots showing fluorescence in the endoderm, and later being compared with lumogallion. Finally, the method developed using the Schiff 3A8 base for the determination of Al (III) was shown to be sensitive, simple, accurate and applicable to different samples.

Keywords: Al (III), Schiff' Base, Fluorogenic Probes, Aqueous medium, dialysis water.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA

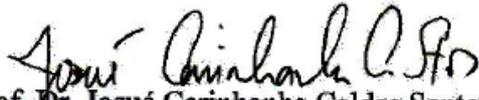


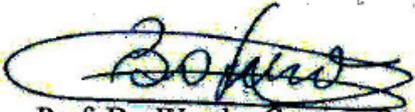
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fons/Fax: (82) 3214-1144
email: ppgqb.ufal@gmail.com

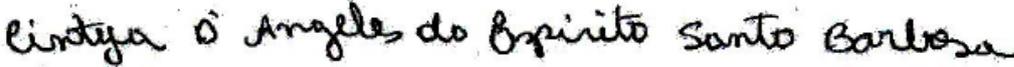
FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da comissão julgadora da defesa de dissertação de mestrado de **Jaelson Silva Santos**, intitulada: **“Avaliação de sondas fluorescentes explorando o conceito off-on para determinação de íons Al(III)”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, no dia 23 de fevereiro de 2018, às 13:30h, na sala de aulas do PPGQB.

COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos
(Orientador - PPGQB/IQB/UFAL)


Prof. Dr. Wander Gustavo Botero
(PPGQB/IQB/UFAL - Arapiraca)


Profa. Dra. Cintya D'Angeles do Espírito Santo Barbosa
(IQB/UFAL)

Dedicatória

Aos meus pais,

Sebastião Barbosa dos Santos e

Maria Abília Silva Santos

A minha esposa Josilaine Santana

A todos os meus irmãos e familiares

Sem vocês nada seria possível!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por todas as graças derramadas em minha vida, não somente nestes anos como universitário, mas em todos os momentos.

Ao meu pai Sebastião Barbosa da Silva por tudo que me ensinou e por ser um exemplo de pai e amigo sempre.

A minha Mãe Maria Abilia Silva Santos por todo amor, carinho e atenção durante toda a minha vida.

A minha esposa Josilaine Santana por todo amor, incentivo e paciência.

Aos meus irmãos que sempre estiveram ao meu lado e acreditaram em mim.

A minha sobrinha Rafaela Carvalho por sempre me incentivar e sempre me apoiar.

Ao meu Orientador, Professor Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos por me ajudar, incentivar, tirar muitas dúvidas em muitas situações e por ter me ajudado nessa etapa tão importante na minha vida.

Aos Professores Wander Gustavo Botero e Cintya D'Angeles do Espírito santo por aceitar fazer parte dessa banca.

A todos os professores que já passaram pela minha vida, tiveram sua importância e sempre terão o meu respeito e meu reconhecimento.

Aos meus amigos do LINQA, pela amizade e por serem incentivos aos meus estudos.

A todos muito obrigada!!!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática de um sensor fluorescente <i>off-on</i> . Modo desligado (<i>off</i>) o analito e o sensor separados e modo ligado (<i>on</i>) analito-sensor emitindo fluorescência.	18
Figura 2	Estruturas dos compostos bases de Schiff avaliados	32
Figura 3	Espectro no UV-visível para o composto 3A8 (20 μM) na presença de diferentes concentrações de Al(III) (0 – 75 μM) em a) tampão acetato (50 mM, pH 4,5); b) tampão tris (50 mM, pH 7,5).	39
Figura 4	a) Espectro de emissão de fluorescência do composto 3A8 (20 μM) na presença de diferentes concentrações de Al(III) (0 – 75 μM) em tampão tris (50 mM, pH 7,5), $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$; b) Perfil gráfico do valor de intensidade de fluorescência em função da concentração de íons Al(III).	40
Figura 5	Avaliação das bases de Schiff nas condições iniciais estabelecidas: solução tampão Tris (50 mM, pH= 7,5), [sonda] = 20 μM e Al(III) na faixa de 1-75 μM , comprimento de onda de excitação (nm): 3A2 = 282, 3A3 = 282, 3A5 = 400, 388 = 400, 3B7 = 350, 3B8 = 350 e 3B10 = 366.	41
Figura 6	Variação da sensibilidade do método em função de diferentes solventes orgânicos no meio. Condições: [3A8] = 20 μM , Al(III) de 1 -75 μM em solução tampão tris 50 mM.	42
Figura 7	Avaliação da sensibilidade do método em função da proporção de acetona no meio. Condições: [3A8]= 20 μM , Al(III) de 1-75 μM em solução tampão tris 50 mM.	43
Figura 8	Avaliação da sensibilidade em função do pH do meio. Condições: [3A8] = 20 μM , [Al(III)] = 1-2,5 μM , concentração da solução tampão igual a 50 mM e $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$.	45
Figura 9	Distribuição das espécies de alumínio (%) utilizando o software visual MINTEQ. Condições: Al(III) = 10 mg L^{-1} variando o pH da solução de 4 a 8.	46
Figura 10	Avaliação da sensibilidade em função do tipo de solução tampão. Condições: [3A8] = 20 μM , [Al(III)] = 0,25-2,5 μM , tampão a 50 mM (pH 5,5), $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$.	47
Figura 11	Avaliação da concentração do tampão MES (mM) na sensibilidade analítica Condições: tampão pH = 5,5; [3A8] = 20 μM , [Al(III)] = 0,25 – 2,5 μM	48
Figura 12	Avaliação da concentração da sonda na sensibilidade analítica. Condições: tampão Tris 25 mM (pH = 5,5), [3A8] = 20 μM , [Al(III)] = 0,25-2,5 μM .	49

Figura 13	Avaliação da concentração de NaCl (mM) na sensibilidade analítica. Condições [3A8] = 40 μ M, [Al(III)] = 0,05-5 μ M, tampão MES 25 mM (pH 5,5) λ_{ex} = 400 nm.	50
Figura 14	Método de Job para determinação da estequiometria do complexo em meio aquoso.	51
Figura 15	Intervalos de HOMO-LUMO calculados usando AM1/HF/3-21G(*). Em (a), sonda 3A8; (b) e (c), complexos sonda:Al(III) a proporção 2:1 e 3:1, respectivamente.	53
Figura 16	a) Espectro de RMN ^1H da sonda 3A8 em diferentes proporções com o íon Al(III) e b) expansão referente ao sinal do hidrogênio imínico. Condições: D_2O -DMSO- d_6 (8:2) em pH 5,5 ajustado com NaH_2PO_4 .	54
Figura 17	a) Avaliação da cinética da reação e b) estabilidade do complexo. Condições: Tampão MES 25 mM (pH 5,5), [3A8] = 40 μ M e [Al(III)] = 3 μ M.	56
Figura 18	a) Curva de titulação fluorimétrica analítica e b) Linearização da equação de Benesi-Hildebrand para a determinação da constante de ligação (K). Condições: [3A8] = 40 μ M, [Al(III)] = 0,05 – 40 μ M, tampão MES 25 mM (pH 5,5) e λ_{ex} = 400 nm.	57
Figura 19	Avaliação da reversibilidade da sonda (40 μ M) a partir de adições subsequentes de Al(III) (3 μ M) e de F^- (3 μ M). a) Espectros de emissão de fluorescência e b) Ciclos de reversibilidade da sonda.	60
Figura 20	Imagens fluorescente de raízes de milho tratados com a sonda 3A8 40 μ M em diferentes concentrações de alumínio (a=0 μ M, b=20 μ M e c=100 μ M). Usando microscópio de fluorescência Leica DFT 7000T, utilizando filtro FITC (λ_{ex} =450-490 nm (azul)) e (λ_{ex} =515 nm (azul)) (amarelo/verde)	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estruturas e parâmetros analíticos de alguns sensores para determinação de alumínio.	20
Tabela 2	Bases de Schiff utilizados como sondas para determinação de alumínio.	25
Tabela 3	Parâmetros do ligante (3A8) obtidos por AM1/HF/3-21G(*).	52
Tabela 4	Figuras de mérito estabelecido para o método proposto.	58
Tabela 5	Dados referentes ao estudo das espécies interferentes no método.	59
Tabela 6	Determinação de Al(III) em amostra de água de diálise e ensaio de recuperação.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado
HPLC-UV	cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica
AAS	Espectrometria de absorção atômica
GF AAS	espectrometria de absorção atômica em forno de grafite
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
TIC	Transferência de carga intramolecular
PET	Transferência de elétrons fotoinduzida
CHEF	Fluorescência de quelação melhorada
FRET	Transferência de energia de ressonância de fluorescência
ESIPT	Transferência de prótons intramoleculares de estado excitado
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
RSD	Desvio padrão relativo
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
QM-MM	<i>Quantum Mechanical - Molecular Mechanical</i>
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

1.1	Importância de quantificar alumínio	15
1.2	Sensores químicos fluorescentes	16
1.3	Sensores fluorescentes aplicados na determinação de íons alumínio	18
1.3.1	Sensores fluorescentes aplicados na determinação de íons alumínio baseados em bases de Schiff	23

2 OBJETIVOS

2.1	Objetivo Geral	29
2.2	Objetivos Específicos	29

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1	Reagentes e preparo das soluções	30
3.2	Equipamentos	31
3.3	Procedimento	31
3.3.1	Seleção da sonda modelo para estudos preliminares	31
3.3.2	Avaliação espectroscópica do complexo sonda-Al(III)	32
3.3.3	Avaliação de parâmetros químicos do método proposto	33
3.3.4	Determinação da estequiometria sonda-Al(III)	33
3.3.5	Avaliação da cinética e da estabilidade da reação	34
3.3.6	Determinação da constante de ligação e figuras de mérito	34
3.3.7	Análise dos possíveis interferentes	35
3.3.8	Avaliação da reversibilidade da sonda fluorogênica	36
3.3.9	Ensaio de adição de padrão	36
3.3.10	Marcação fluorescente da sonda 3A8 em raízes de milho previamente tratadas com alumínio.	36
3.3.11	Tratamento estatístico dos dados	37

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1	Estudos preliminares: seleção da sonda modelo e da faixa de pH	38
------------	---	----

4.2	Avaliação espectrofotométrica e espectrofluorimétrica do complexo sonda- Al (III).	38
4.3	Avaliação das bases de Schiff como sondas para Al(III)	41
4.4	Avaliação de diferentes solventes na sensibilidade do método	42
4.5	Avaliação do pH e o tipo de solução tampão	44
4.6	Avaliação da concentração do tampão	47
4.7	Avaliação da concentração da sonda	48
4.8	Avaliação da influência da força iônica	49
4.9	Determinação da estequiometria do complexo	50
4.9.1	Determinação da estequiometria do complexo pelo método de Job	50
4.9.2	Determinação da estequiometria Sonda- Al(III) por cálculos teóricos	52
4.9.3	Determinação da estequiometria Sonda- Al(III) por Ressonância magnética nuclear	54
4.10	Avaliação da cinética da reação e estabilidade do complexo	55
4.11	Determinação da constante de ligação e figuras de mérito	56
4.12	Avaliação dos possíveis interferentes	58
4.13	Avaliação da reversibilidade da sonda	59
4.14	Aplicação do método em amostras reais	60
4.15	Aplicação do método na marcação de alumínio em células vegetais	61
5	CONCLUSÃO	64
7	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância de quantificar alumínio

O alumínio é o terceiro elemento metálico mais abundante na crosta terrestre (constituindo 8,13% em massa da sua superfície) e ocorre naturalmente no solo, na água e no ar, onde é redistribuído ou transferido por atividades naturais ou antrópicas (GUPTA et al., 2013; KUMAR et al., 2014). Como resultado de sua disponibilidade, baixo custo e propriedades físicas como leveza, resistência, maleabilidade, reciclável e excelente condutor de calor e eletricidade, esse metal possui muitas aplicações, na construção civil, eletrônica, indústria de papel, produção de corantes, indústria têxtil e como componente de muitas preparações cosméticas (GUPTA et al., 2014; GUO et al., 2013).

Os íons Al(III) foram por muitos anos considerados como uma espécie não tóxica quando comparado com outros íons metálicos como o chumbo e o mercúrio, devido ao seu uso extensivo em materiais de construção, na purificação de água, em aditivos alimentares e em medicamentos (GUPTA et al., 2013; WANG et al., 2008). No entanto, estudos recentes relatam que quando o alumínio, na forma iônica, é absorvido pelo organismo e alcança altas concentrações no corpo humano, pode causar e catalisar muitas doenças (GUNDUZ et al., 2005). Neste âmbito, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem como referência uma ingestão máxima diária de íons Al(III) de 3-10 mg kg⁻¹ e para ingestão dietética semanal tolerável o valor de 7 mg kg⁻¹ em peso (FAN et al. 2014), enquanto o Conselho nacional do meio ambiente (CONAMA) estabelece o nível máximo de 0,1 mg L⁻¹ de alumínio dissolvido em águas doces para as classes 1 e 2, e de 0,2 mg L⁻¹ para a classe 3, ambas as classes destinada ao consumo humano (Resolução Conama 357/2005).

A toxicidade dos íons Al(III) nos seres humanos manifesta-se, principalmente, em pessoas com falência renal crônica, sendo que neste caso, os rins não conseguem eliminar o Al(III) absorvido, que dessa forma migra diretamente para corrente sanguínea, levando ao seu acúmulo, principalmente, nos ossos, fígado e no cérebro (HWANG et al., 2015; KARA; FISHER; HILL, 2008). O acúmulo desse íon no organismo afeta a atividade de enzimas gastrointestinais, provoca danos ao sistema nervoso central, causando alterações neurofibrilares, enzimáticas e neurotransmissoras, sendo assim, relacionado com o desenvolvimento de doenças cardíacas, osteoporose, Alzheimer, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, entre outras (FAN et al., 2014; TIAN et al., 2015).

No solo, o alumínio também é tóxico, principalmente em meio ácido ($\text{pH} \leq 5,5$) e pode ser verificado pelo baixo desenvolvimento das plantas, raízes e sementes (LI et al., 2015). Essa toxicidade em solos ácidos influencia a produção agrícola, pois aumenta a solubilidade dos minerais de alumínio causando, assim, graves anomalias ao sistema radicular das plantas, pois modifica os padrões de absorção e o metabolismo de nutrientes (SALVADOR et al., 2000; FAN et al., 2014).

Devido a essa toxicidade, a determinação desse íon torna-se cada vez mais importante. Na literatura, existe uma variedade de técnicas empregadas para determinação de alumínio, tais como: espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), espectrometria de absorção atômica com atomização em chama (FAAS) e em forno de grafite (GF AAS), cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica (HPLC-UV), espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), voltametria de redissolução catódica, potenciometria com eletrodo íon seletivo, espectrofotometria, além da espectrofluorimetria (LI et al., 2015a; SUAHI et al., 2014). A maioria dessas técnicas, embora ofereçam baixos limites de detecção, oferecem algumas desvantagens, pois envolvem instrumentações complexas, caras e caráter destrutivo das amostras para aplicação em sistemas biológicos (ERDEMIR e MALKONDU, 2015).

Devido a características como alta sensibilidade, fácil operação, caráter não destrutivo da amostra, detecção em tempo real e resposta instantânea, a técnica de fluorescência molecular recebeu atenção considerável e oferece vantagens significativas em relação a outras técnicas para detecção e quantificação de íons metálicos (LI et al., 2015b). Desta forma, torna-se importante o desenvolvimento de métodos analíticos utilizando detecção espectrofluorimétrica para a determinação e controle dos níveis de alumínio no meio ambiente e em amostras biológicas (SUAHI; AHMAD; HENG, 2014).

1.2 Sensores químicos fluorescentes

Com o desenvolvimento da técnica de fluorescência molecular, muitas moléculas fluorescentes passaram a ser utilizadas como sondas analíticas para a investigação de diferentes sistemas visando informações de natureza físico-química, bioquímica e biológica (VOLEUR, 2002). No entanto, os compostos fluorescentes que tem a capacidade de detectar quantitativamente ou qualitativamente a presença de uma substância química específica e sinalizar reversivelmente sua presença por meio de sinais que possam ser medidos, passaram a ser chamados de sensores químicos (ZIMMERMANN-DIMER; MACHADO, 2008).

Segundo a definição dada pela IUPAC, um sensor químico é um dispositivo que transforma a informação química, tanto relativa a concentração de um componente específico da amostra como de sua composição total, em um sinal analiticamente útil (PRODI, 2004). No entanto, existem na literatura outras definições mais específicas acerca de sensores químicos. Para Hulancki (1991), um sensor químico é um transdutor miniaturizado que responde seletiva e reversivelmente a íons ou compostos químicos produzindo um sinal elétrico que depende da concentração.

A partir das características específicas, como sensibilidade e seletividade, o desenvolvimento de sensores químicos está mudando dramaticamente as potencialidades da análise química (WU et al., 2009; KUMAR et al., 2014). Os sensores químicos podem ser classificados de acordo com o tipo de sinal que possa ser medido. Por exemplo, os sensores ópticos baseiam-se na medida de propriedades ópticas do analito ou do sistema analito-receptor, os sensores eletroquímicos estão associados a medida de potencial ou corrente gerada, enquanto que os sensores térmicos na medida de calor, dentre outros (PRODI, 2004).

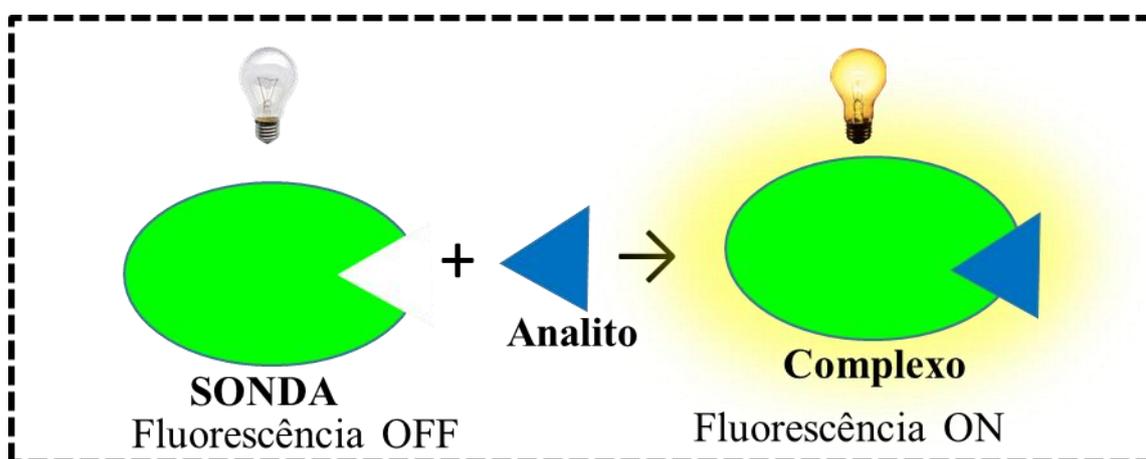
Os sensores ópticos podem ser divididos de acordo com a propriedade óptica explorada na interação do analito em questão o possível receptor, dentre essas propriedades, temos: absorvância, reflectância, fluorescência, índice de refração e espalhamento da luz. Nos últimos 20 anos, os sensores fluorescentes atraíram um interesse significativo devido à sua potencial aplicação em pesquisas biológicas e ambientais (GUPTA et al., 2014).

Dentre os sensores utilizados para a determinação de íons metálicos, se destacam os sensores fluorescentes, pois possuem propriedades adequadas para atuarem em diferentes tipos de amostras e sondas analíticas em sistemas vivos e químicos (GUPTA et al., 2014; HU et al., 2015). Dessa forma, um sensor fluorescente é, simplificadamente, um fluoróforo que está preparado para responder a um estímulo específico ou localizar uma determinada região em uma espécie biológica observando mudanças fotofísicas, como a emissão ou supressão de fluorescência (GUPTA; SINGH; KUMAWAT, 2014).

O desenvolvimento de novos sensores fluorescentes é baseado em diferentes tipos de mecanismos, os principais são: a transferência de carga intramolecular (ICT), transferência de elétrons fotoinduzida (PET), fluorescência de quelação melhorada (CHEF), transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET), e transferência de prótons intramoleculares de estado excitado (ESIPT) (FAN et al., 2014). Dentre esses mecanismos, o PET e o CHEF destacam-se como as melhores abordagens para a detecção de íons por ter uma melhor resposta *turn-on* de fluorescência (GUPTA; SINGH; KUMAWAT, 2014).

De acordo com os diferentes mecanismos de fluorescência, os sensores químicos fluorescentes baseiam-se em diferentes conceitos ou modos de ação, como o *off-on* e o *on-off*. O sensor químico baseado no conceito *off-on* ocorre devido a interação do analito com um reagente não fluorescente formando um complexo fluorescente ou provocando uma mudança na conformação da molécula receptora, esse modo de ação também é denominado como sistema “desligado-ligado” (Figura 1), já um sensor químico baseado no conceito *on-off* ocorre devido à redução de fluorescência, que é resultante da interação do analito com reagente fluorescente, o modo de ação “*on-off*” também pode ser denominado como sistema “ligado-desligado” (BONNACCHI, 2011).

Figura 1- Representação esquemática de um sensor fluorescente *off-on*. Modo desligado (*off*) o analito e o sensor separados e modo ligado (*on*) analito-sensor emitindo fluorescência.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

1.3 Sensores fluorescentes aplicados na determinação de íons alumínio

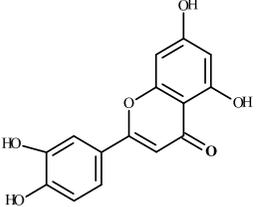
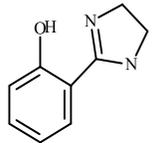
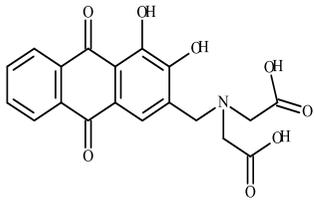
O desenvolvimento de sensores fluorescentes para a detecção seletiva de íons metálicos biologicamente e ambientalmente relevantes, como o íon de alumínio(III), atraíram recentemente grande atenção de químicos e biólogos (WU et al., 2009). A determinação de Al(III) quando comparado com outros íons metálicos, tem sido considerado um grande desafio analítico, devido principalmente a sua fraca habilidade de coordenação, facilidade de hidratação e falta de características espectroscópicas intrínsecas, características que dificultam o desenvolvimento de novos sensores para esta espécie (QIN et al., 2014).

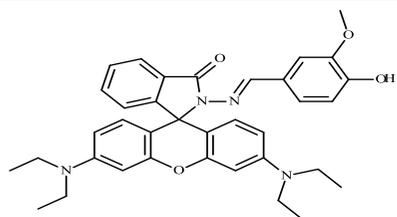
Na literatura já existem diversos sensores fluorescentes que são utilizados para determinação deste íon, com base em moléculas contendo os núcleos ou funções orgânicas, tais como: 8-hidroxiquinolina, hidrazonas, bases de Schiff, calixarenos, cumarinas,

hidroxiflavonas, oxazolinas e imidazolininas (GUPTA et al., 2014; SAHANA et al., 2011; ERDEMIR; MALKONDU, 2015).

No entanto, a maioria destes sistemas sensores apresentam desvantagens como falta de seletividade, reduzida solubilidade em água ou limitada aplicabilidade em sistemas biológicos, como células vivas, por exemplo (GUPTA et al. 2014). Na Tabela 1 são mostrados alguns sistemas sensores utilizados para a determinação de alumínio.

Tabela 1. Estruturas e parâmetros analíticos de alguns sensores para determinação de alumínio por fluorescência.

Sensor	Meio	pH	LOD (μM)	Kb (M^{-1})	Estequiometria	Amostra	Referências
 <p>2-(3,4-Di-hidroxifenil) -5,7-di-hidroxi-4H-cromen-4-ona</p>	EtOH	-	0,65	-	2:1	Água, Antiácido, Cosméticos.	SUN et al., 2013
 <p>2-(4,5-di-hidro-1,3-imidazol-2-il) fenol</p>	EtOH	4,6	0,1	$3,16 \times 10^3$	1:1	-	JEANSON; BÉREAU., 2006
 <p>Derivado de alizarina</p>	EtOH/H ₂ O (4:1, v/v)	4,6	0,52	$4,38 \times 10^7$	2:1	-	WANG et al., 2014



MeOH

-

0,14

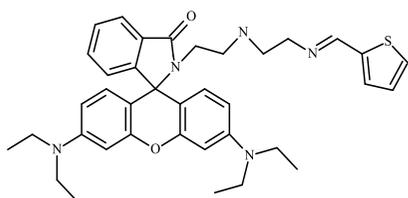
$1,0 \times 10^4$

1:1

-

GUPTA et al.,
2015a

Rodamina B funcionalizada



H₂O/EtOH,

7,0

0,04

$1,0 \times 10^5$

1:1

Água,

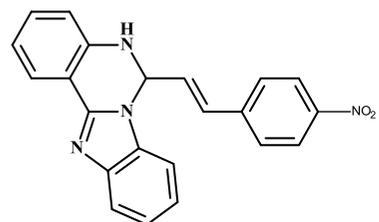
Imageamento
Celular (hela)

TANG et al.,
2015

(99:1, v/v).

Tris-HNO₃

Derivado de rodamina spirolactama



DMSO-H₂O

7,4

0,009

$2,8 \times 10^3$

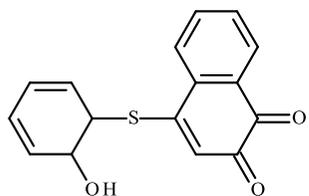
1:1

Imageamento
celular.

MUKHERJEE
et al.,2016

(1: 9, v /v)

6- [2- (4-nitrofenil) -vinil] -5,6-di-
hidrobenzo- [4,5] imidazo [1,2-c]
quinazolina



DMSO-H₂O

7,4

0,009

$2,8 \times 10^3$

1:1

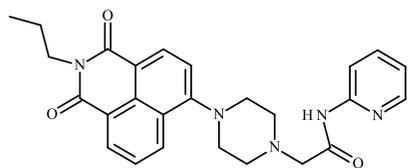
-

JALI e

(1: 9, v /v)

BARUAH, 2014

4- (2-Hidroxifeniltio) naftaleno-1,2-diona



H₂O/CH₃CN

-

0,36

$3,5 \times 10^4$

1:1

Imageamento

JANAKIPRIYA

(9 : 1, v /v)

celular.

et al., 2016

2-(4-(1,3-dioxo-2-propyl-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinolin-6-yl)piperazin-1-yl)-(pyridine-2-yl)acetamide

Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

1.3.1 Sensores fluorescentes aplicados na determinação de íons alumínio baseados em bases de Schiff

De forma geral, verifica-se que estrutura da maioria dos sensores fluorescentes para íons Al(III) contém como centro de coordenação átomos de nitrogênio e oxigênio, formando um ambiente químico base dura e ácido duro (íons alumínio) (WANG et al., 2015). Dessa forma, as bases de Schiff se destacam como sensores fluorescentes para alumínio, pois fornecem ambientes de coordenação como sítios doadores de base dura para o Al(III) que é um ácido duro necessários para a formação do complexo (QIN et al. 2014; KÖSE et al., 2015).

A necessidade de uma base dura para a formação de complexos com o alumínio pode ser explicado segundo a teoria ácido-base de Pearson, onde ácidos e bases duros são espécies pequenas e não polarizáveis, enquanto os ácidos e bases moles são espécies grandes e com um grau de polarizabilidade considerável. De acordo com essa teoria, ácidos duros se ligam preferencialmente a bases duras formando complexos iônicos, enquanto ácidos macios preferencialmente se ligam a bases macias formando complexos covalentes (VASCONCELLOS, 2014).

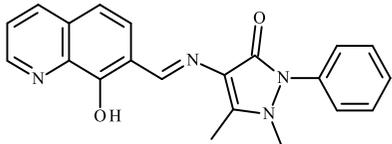
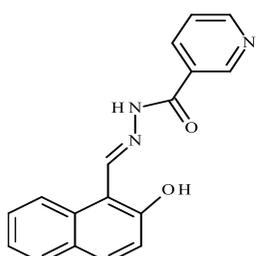
Da necessidade de sensores que se comportem como bases duras, as bases de Schiff atendem essa necessidade, pois constitui uma classe de compostos orgânicos nomeada pelo químico alemão Hugo Schiff Josef (1834-1915). Esses compostos são caracterizados pela presença de pelo menos um grupo imina ou azometano em sua estrutura (KÖSE et al., 2014). Esse grupo funcional contém uma ligação dupla carbono-nitrogênio com o átomo de nitrogênio ligado com fórmula geral ($R_1R_2C=N-R_3$), onde R_1 , R_2 e R_3 pode ser um grupo aril ou alquil. A natureza química do grupo R é determinante na estabilidade da base de Schiff (SILVA, 2011).

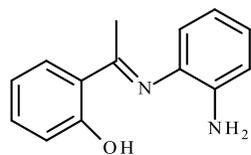
As bases de Schiff apresentam atividade antifúngica, bactericida, antiviral, (LI, et al., 2015c; GUNDUZ; MALTAS; YILDIZ, 2009), e como quimiossensor (GHORAI et al. 2015), podendo ser aplicado em áreas como na indústria farmacêutica, industrial, e principalmente na análise química. Assim, as bases de Schiff podem formar complexos com alumínio, consequentemente, aplicado como um quimiossensor para quantificação desse íon, visando analisar amostras clínicas, ambientais e biológicos, assim como, no emprego para bioimageamento deste elemento em células vivas (KÖSE et al., 2014).

Vários sensores fluorescentes têm sido desenvolvidos para a determinação de íons alumínio utilizando diferentes bases de Schiff (GUPTA; SINGH; KUMAWAT, 2014). No

entanto, a resposta analítica da maioria deles é dependente do meio contendo solventes orgânicos ou sistemas aquo-orgânicos, os quais são limitantes para a aplicação em amostras reais (QIN; YANG; YANG, 2015). Na Tabela 2 pode-se observar algumas bases de Schiff encontradas na literatura para a determinação de alumínio e os parâmetros analíticos mais importantes.

Tabela 2. Bases de Schiff utilizados como sondas para determinação de alumínio.

Sensor	Meio	pH	LOD (μM)	K_b (M^{-1})	Estequiometria Sonda-Al	Amostra	Referências
 <p>4-(8'-hidroxiquinolin-7'-il) metilenoimino-1-fenil-2,3-dimetil-5-pirazol</p>	MeOH/H ₂ O (1:9, v/v)	-	0,1	-	1:2	-	FAN et al., 2014
 <p>2-hidroxi-1-naftilaldeído nicotinoil hidrazona</p>	H ₂ O Tris-HCl	7,2	4	4×10^3	1:1	*Biológicas e Ambientais	QIN et al., 2015.



EtOH/H₂O

7,2

2,38

$7,29 \times 10^3$

1:1

*Biológicas e

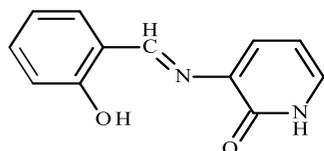
GUPTA et al.,

(4:1, v/v)

Ambientais

2015b.

(E)-2-(1-(2-aminofenilimino)etil)fenol



EtOH

-

0,52

$2,08 \times 10^6$

1:2

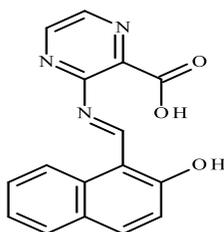
*Biológicas e

DING et al.,

Ambientais

2015.

3-[(2-hidroxi-benzilideno)-amino]-1H-piridin-2-ona



DMSO

-

2,4

$5,36 \times 10^4$

2:1

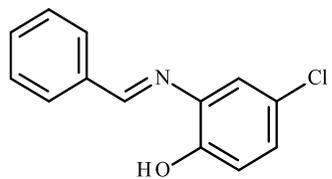
Imageamento

HUNG et al.,

celular.

2014.

Derivado do 2-hidroxi-1-naftaleno



EtOH/H₂O

10,5

1

-

1:2

Água

KIM et al.,

(9:1, v/v)

2016.

4-Cloro-2-feniliminometilfenol

*POSSIVEL APLICAÇÃO

Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Os sensores apresentados na Tabela 2, pode-se observar que a maioria dos sensores a base de Schiff são dependentes de sistemas orgânicos ou aquo-orgânicos. Dessa forma, o desenvolvimento e síntese de sensores fluorescentes para íons Al(III) que possam ser aplicados em água ou em solução aquosa com mínimo de solventes orgânicos é um grande desafio.

Nesse sentido, QIN e YANG (2015) desenvolveram uma sonda bis-base de Schiff, sensível e seletiva para íons alumínio, com um limite de detecção $\sim 0,7 \mu\text{M}$ em solução aquosa próximo a 100%, tendo a possibilidade de ser aplicado para a quantificação desse metal em sistemas ambientais e biológicos.

GUO e colaboradores (2013) sintetizaram um quimiossensor base de Schiff fluorescente *off-on*. O sensor sintetizado foi altamente seletivo e sensível, com um limite de detecção de $0,17 \mu\text{M}$, aos íons alumínio em meios aquosos e sendo aplicado também o imageamento em células vivas.

Devido ao fato do íon Al(III) está associado ao desenvolvimento de muitas doenças, dentre elas o mal de Alzheimer e o mal de Parkinson e quando, comparado com outros metais, tenha sido sempre um grande desafio por causa de algumas características oriundas do alumínio como fraca habilidade de coordenação, facilidade de hidratação e falta de características espectroscópicas. O desenvolvimento de novas metodologias para a determinação de Al(III) em amostras de alimentos, ambientais e biológicas, como também, a possibilidade de fazer o imageamento desse metal em células vegetais e humanas se faz necessário.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia analítica empregando sonda fluorogênica baseadas no conceito *off-on* para a determinação de Al(III) em amostras de água e biológicas.

2.2 Objetivos específicos

- a) Selecionar uma sonda modelo em função de diferentes bases de Schiff;
- b) Otimizar o método proposto quanto a diferentes parâmetros: sistema solvente, efeito do pH, tipo e concentração da solução tampão e concentração da sonda;
- c) Determinar a constante de ligação, estequiometria sonda-Al(III) e avaliar a influência de possíveis interferentes;
- d) Estabelecer as principais figuras de mérito e validar o método analítico;
- e) Aplicar o método otimizado em amostras de diferentes tipos de água;
- f) Aplicar a sonda otimizada no imageamento de Al(III) em células vegetais e humanas.

3 Procedimento experimental

3.1 Reagentes e preparo das soluções

Os reagentes utilizados no desenvolvimento dessa metodologia foram de grau analítico e a água utilizada no preparo das soluções foi ultrapura (condutividade $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$) obtida pelo sistema Master System- 2000 (Brasil, Gehaka).

As sondas fluorogênicas (bases de Schiff) avaliadas foram cedidas pelo grupo do Prof. Dr. Ângelo de Fátima (UFMG), sintetizadas e caracterizadas conforme descrito por SILVA et al (2011). De forma geral, preparou-se uma solução 5 mM em metanol que foi conservada sob refrigeração a 4°C. Uma segunda diluição foi realizada, preparando uma solução 0,4 mM em tampão MES (2- (*N*-morfolino) sal de sódio do ácido etanossulfônico) (25 mM, pH 5,5). As diluições subsequentes quando necessárias foram realizadas em meio tamponado. Protocolo similar foi empregado para todas as sondas.

As soluções de alumínio empregados nos estudos de otimização, foram preparadas utilizando uma solução estoque de 1000 mg L^{-1} em ácido clorídrico 1% (v/v) (QHEMIS). Dessa solução, 21,5 μL foram transferidos para um tubo de polietileno de 2 mL e avolumado com água, perfazendo uma concentração final de 0,4 mM. A partir desse estoque foram preparadas outras soluções a 5 e 50 μM em solução tampão MES (25 mM, pH 5,5) para construção das curvas analíticas.

Para o preparo da solução tampão MES (25 mM, pH 5,5), foi pesado uma massa de 0,5430 g do sal de sódio MES (Sigma). O pH da solução foi ajustado para 5,5 com solução de HCl 0,1 M (Merck). Após o ajuste do pH, cada solução separadamente foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e avolumado com água ultrapura. Para o preparo das soluções de tampão acetato (pH 4,5 e 5,0), biftalato (pH 5,5), Tris (pH 6,5; 7,0 e 7,5) foram empregados acetato de sódio (Vetec), biftalato de potássio (Vetec) e Tris cloridrato (Sigma), respectivamente. O pH das soluções foi ajustado com HCl 0,1 M (Merck) ou NaOH 0,1 M (Vetec). A concentração das soluções tampão avaliadas foram 10, 25, 50, 75 e 100 mM.

O pH dos sistemas contendo solventes orgânicos foi definido considerando a mistura entre cada solvente e as respectivas soluções tampão. Inicialmente, foram avaliados os seguintes solventes: metanol (Vetec), etanol (Vetec), acetona (JT Baker) e acetonitrila (Dinâmica) na proporção solvente e solução tampão igual a 1:1. Para a acetona, foram avaliadas adicionalmente as seguintes proporções com a solução tampão 0:1; 1:9; 1:1; 9:1.

O estudo dos interferentes foi realizado para verificar a seletividade do método quanto à presença de outras espécies. Para tal estudo foram testados vários cátions e ânions a partir

dos seguintes compostos: NaCl (Vetec), KBr (Merck), NaF (Merck), MgSO₄ (Proquimios), FeCl₃(Sigma), Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O (Reagen), ZnSO₄ (Synth), CuSO₄.5H₂O (Vetec), CaCl₂ (Synth), Na₂HPO₄.2H₂O (Vetec), Na₂SiO₃ (Vetec), BaCl₂ (Merck), NiSO₄ (Vetec), KI (Dinâmica), NaAsO₂ (Vetec), Sr(NO₃)₂ (Merck), NaNO₃ (Vetec), K₂Cr₂O₇ (Synth), Na₂B₄O₇.10H₂O (Merck), Na₂SO₃ (Vetec), MnSO₄ (Reagen). Todas as soluções estoque foram preparadas em água ultrapura. As soluções contendo as espécies Cr(III), Cd(II), Hg(II), Pb(II) e As(V) foram preparados utilizando soluções estoque 1000 mg L⁻¹ (QHEMIS).

3.2 Equipamentos

Para as medidas espectrofluorimétricas foi empregado um espectrofluorímetro Shimadzu RF (5301PC, Japão) utilizando cubetas de quartzo com 10 mm de caminho óptico. As medidas espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro de varredura com duplo feixe Micronal (AJX- 6100PC, Brasil), utilizando cubetas de quartzo com 10 mm de caminho óptico. Para os estudos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio empregou-se o espectrômetro de RMN Bruker 400 (B₀=9,4 T), operando a 400,35 MHz para ¹H e equipado com sondas de 5,0 mm para detecção indireta, instalado no Laboratório de Análises e Pesquisa em Ressonância Magnética Nuclear (NAPRMN). O imageamento em células vegetais foi realizado um microscópio de fluorescência Leica DFT 7000T utilizando filtro FITC de comprimento de onda de excitação de 450-490 nm (azul) e comprimento de onda de emissão de 515 nm (amarelo/verde). As imagens foram adquiridas utilizando o software Leica Application Suite X (LAS X) em objetiva de 10x.

As medidas de pH foram realizadas utilizando um medidor de pH Gehaka (PG 1800, Brasil) incerteza de ± 0,01 acoplado a um eletrodo combinado de vidro. As massas dos reagentes foram medidas em balanças analíticas: (i) balança analítica Gehaka (AG 200, Brasil) com precisão de 0,1 mg para medidas ≥ 10 mg ou (ii) balança analítica Mettler Toledo (AG245, Estados Unidos) com precisão de 0,01 mg (massas < 10 mg), de acordo com a necessidade do reagente que seria pesado.

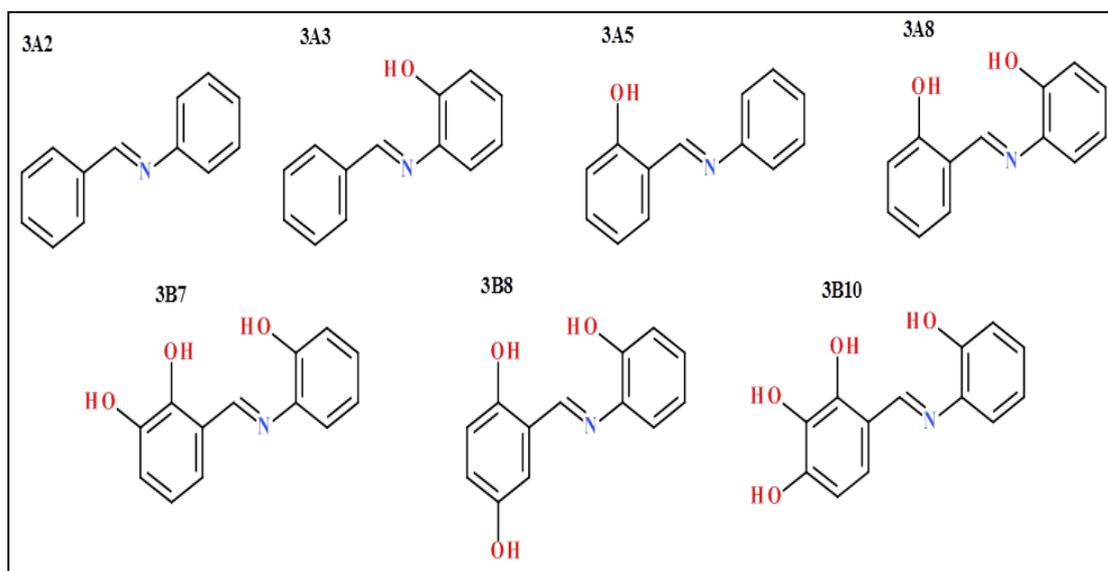
3.3 Procedimentos

3.3.1 Seleção da sonda modelo para estudos preliminares

Neste trabalho foram avaliados sete compostos (bases de Schiff) como sondas fluorogênicas visando o desenvolvimento de uma metodologia para quantificação de íons Al(III). Para os ensaios preliminares, foi selecionado um composto com características

estruturais intermediárias, em relação ao conjunto de compostos, neste caso, se considerou o número de grupos hidroxila por molécula. Para tanto o composto selecionados foi o 3A8 de acordo com a Figura 2. Os ensaios preliminares foram realizados empregando a sensibilidade analítica como critério de avaliação em pH 4,5 (tampão acetato) e pH 7,5 (tampão Tris), ambas soluções tampão a 50 mM.

Figura 2. Estruturas dos compostos bases de Schiff avaliados.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

3.3.2 Avaliação espectroscópica do complexo sonda–Al(III)

Nessa avaliação, a concentração da sonda modelo (composto 3A8) foi fixado em 10 μM de acordo com trabalhos já descritos na literatura, e avaliada frente a concentrações crescentes de Al(III) (0,5 a 100 μM). Nestas condições, foram construídas duas curvas analíticas ($n = 11$), sendo a primeira em pH 4,5 (tampão acetato, 50 mM) e a segunda em pH 7,5 (tampão Tris, 50 mM). Os valores de pH foram selecionados com base em estudos da literatura entre íons Al(III) e bases de Schiff (YAN et al., 2015). O procedimento geral ocorreu da seguinte maneira: foram adicionados 50 μL da sonda (composto 3A8) (0,4 mM) em tubos de 2 mL, perfazendo uma concentração final de 10 μM , em seguida, foram adicionados diferentes volumes da solução estoque de Al(III) a 0,2 mM, e por fim, o sistema foi completado para 2 mL com a solução tampão apropriada.

Cada sistema foi avaliado por meio de medidas espectrofotométricas na faixa de 300 a 500 nm, para determinar o comprimento de onda de máxima absorção do complexo sonda-

Al(III) e também, para verificar a viabilidade da técnica para desenvolvimento de um possível sensor colorimétrico. As medidas de fluorescência do complexo sonda-Al(III) foram realizadas com $\lambda_{\text{ex}} = 400$ nm, sendo a emissão medida na faixa de 420-650 nm e o *slit* empregado igual a 3 nm para excitação e 5 nm para emissão.

Uma vez estabelecido o valor de pH, foram preparadas curvas analíticas (n = 10) para os sete compostos avaliados aplicando procedimento descrito anteriormente para sonda modelo, utilizando tampão Tris (50 mM, pH 7,5). A seleção da sonda para os estudos posteriores foi baseada na sensibilidade analítica.

3.3.3 Avaliação de parâmetros químicos do método proposto

De forma geral para avaliação de cada parâmetro empregou-se a sensibilidade analítica como fator de comparação. A avaliação da influência de diferentes solventes foi realizada. As curvas analíticas foram preparadas de acordo com as descrições anteriores onde a partir desta etapa a concentração da sonda (3A8) passou a ser 20 μM , para aumentar a sensibilidade, e a concentração de Al(III) avaliada de 1-20 μM . As soluções foram avolumadas com solução tampão Tris a 50 mM (pH 7,5), o qual foi preparado na proporção 1:1 (v/v) com os seguintes solventes: metanol, etanol, acetona e acetonitrila. Os parâmetros empregados para as medidas fluorimétricas foram similares aos anteriormente descritos. Em estudos posteriores, a proporção de acetona foi avaliada nas seguintes razões em relação ao meio aquoso: 0:1; 1:9; 1:1; 1:9 (meio aquoso:acetona).

A avaliação de pH foi realizada no intervalo de 4,5 a 7,5, utilizando os seguintes sistemas para tamponamento: acetato (pH 4,5 e 5,0); MES (pH 5,5; 6,0 e 6,5) e Tris (pH 7,0 e 7,5). Uma vez determinado o pH com maior sensibilidade (pH = 5,5), foram testados diferentes tipos de tampão, neste caso: acetato ($\text{pK}_a = 4,75$), biftalato ($\text{pK}_a = 5,41$) e MES ($\text{pK}_a = 5,0$). Todas as soluções tampão foram preparadas a 50 mM.

A avaliação da concentração de tampão MES (pH = 5,5) foi realizada nas concentrações de 10, 25, 50, 75 e 100 mM. As concentrações da sonda fluorogênica (3A8) na condição de pH otimizada foram: 5, 10, 20, 30 e 40 μM . Para a avaliação da influência da variação da força iônica utilizou-se NaCl nas seguintes concentrações: 0, 25, 50, 100, 200 e 300 mM, além do sistema sem a presença do sal (NaCl).

3.3.4 Determinação da estequiometria sonda-Al(III)

A estequiometria do complexo sonda-Al(III) foi sugerida pelo método das variações contínuas (método de Job), por cálculos teóricos e Ressonância Magnética Nuclear. No

método das variações contínuas, foram preparadas soluções contendo a sonda e alumínio, onde variou-se a fração molar das duas espécies de 0 a 1 mantendo a soma das concentrações constante e igual 120 μM . A partir do gráfico entre a intensidade de fluorescência em função da fração molar foi estabelecida a proporção estequiométrica em função do valor máximo (JIANG et al., 2015).

Por meio de cálculos teóricos, parâmetros eletrônicos relacionados à formação do complexo entre a sonda e os íons Al(III) foram avaliados, tais como energia (E), energia no ponto zero (ZPE), energia relativa real (ΔE), energia do orbital HOMO, energia do orbital LUMO e o intervalo entre estas (Δ_{H-L}). Em seguida, diversas possibilidades de complexação da sonda (3A8) com o íon Al(III) foram investigadas aplicando-se o método *ab initio* Hartree-Fock (HF) com base funcional 3-21G(*), partindo-se de uma otimização geométrica usando o método semi empírico AM1, a partir da construção de um método híbrido QM-MM (*Quantum Mechanical - Molecular Mechanical*). Por fim, foi gerado um diagrama de HOMO-LUMO para avaliar a estequiometria energeticamente mais favorável. Para a execução de todos os cálculos teóricos foi utilizado o software Spartan '14 v. 1.1.4 (HUANG et al., 2017).

Por Ressonância Magnética Nuclear, a estequiometria do complexo foi avaliada através do espectro RMN de ^1H observando a variação dos deslocamentos químicos (δ) do complexo sonda-Al(III) em diferentes proporções (sonda livre; 1:1; 2:1 e 3:1). Para tanto, utilizou-se 0,5 mM da sonda e 0,5 mM de AlCl_3 para 500 μL de tampão fosfato 1 mM (pH = 5,5) com adição de trimetilsililpropionato de sódio (TMSP) a 2,5 mM (padrão interno), em 99,9% de água deuterada (D_2O).

3.3.5 Avaliação da cinética e da estabilidade da reação

Para análise da cinética de reação e de estabilidade do complexo formado foram realizadas medidas fluorimétricas em função do tempo nas condições otimizadas. No teste cinético, foram avaliados a solução contendo apenas a sonda (40 μM) e o complexo contendo Al(III) a 3 μM , no intervalo de 0 - 60 min, sendo as medidas registradas em intervalos de 5 min. A estabilidade do complexo formado foi realizada até 120 min com exposição direta a fonte de radiação (lâmpada de Xe de 150 W de potência) durante todo tempo de análise.

3.3.6 Determinação da constante de ligação e figuras de mérito

Para determinar a constante de ligação experimentalmente nas condições otimizadas, foi realizada uma titulação espectrofluorimétrica, onde manteve-se a concentração da sonda fixada em 40 μM e adicionou-se concentrações crescentes de Al (III) (0,05-4,0 μM), para

garantir a saturação do sistema. Após as medidas de fluorescência, a constante de ligação foi calculada por meio da equação modificada de Benesi-Hildebrand (SINGH e SINGH, 2014).

Para a determinação do limite de detecção (LOD, definido como a menor concentração do analito que pode ser detectada) e limite de quantificação (LOQ, definido como a menor concentração do analito que produz um sinal analítico e a partir do qual pode ser quantificado) e desvio padrão relativo (RSD) foram realizados utilizando as seguintes equações:

$$LOD = \frac{3sb}{ac} \quad (\text{eq. 1}) \quad LOD = \frac{10sb}{ac} \quad (\text{eq. 2}) \quad RSD = \frac{sp}{xp} \times 100 \quad (\text{eq. 3})$$

onde, *sb*: desvio padrão do branco analítico (*n* = 10), *ac*: coeficiente angular da curva analítica, *sp*: desvio padrão de um ponto da curva e *xp*: valor médio encontrado para este ponto da curva (*n* = 10). Já as curvas analíticas preparadas no desenvolvimento dessa metodologia foram construídas com o mínimo de cinco pontos de acordo com a equação:

$$IF = a C_{[Al(III)]} + b \quad (\text{eq. 4})$$

em que IF é o valor de intensidade de fluorescência, $C_{[Al(III)]}$ a concentração de Al(III), *a* o coeficiente angular da curva analítica e *b* o coeficiente linear. O coeficiente de correlação linear (*r*) também foi calculado, para cada curva analítica, visando avaliar a disposição dos pontos quanto à adequação ao comportamento linear (MILLER e MILLER, 2005). As figuras de mérito foram determinadas preparando uma curva analítica de trabalho de 0,05 - 4 μM (*n* = 11). Para essa curva os seguintes pontos foram preparados e medidas cerca de 10 vezes: o branco analítico, 0,25 e 3 μM.

3.3.7 Análise dos possíveis interferentes

Nessa avaliação foram escolhidas diferentes espécies como possíveis interferentes inorgânicos já descritos na literatura. Inicialmente, foram preparadas soluções mantendo a concentração da sonda e de Al(III) e do interferente fixadas em 40, 2 e 40 μM, respectivamente, de acordo com a resolução do CONAMA N° 357 / 2005. Nesta condição tinha-se um excesso de 20 vezes do possível interferente. Como parâmetro de avaliação se considerou que uma variação inferior ou igual a 5% do sinal de referência (ausência do interferente) não seria considerada significativa em comparação a solução contendo o interferente em estudo (KIM et al., 2016). Para as espécies que interferiram mais que 5% na primeira avaliação, a concentração dessa espécie foi reduzida até que a meta da variação do sinal fosse atingida.

3.3.8 Avaliação da reversibilidade da sonda fluorogênica

Para avaliar se a sonda funcionava de forma reversível, foram preparadas cinco soluções numeradas de 1 a 5: a solução 1 foi o branco analítico (40 μM da sonda), as outras soluções foram preparadas adicionando 40 μM da sonda, além de Al(III) e F^- nas seguintes concentrações: 3 μM de Al(III) ; 3 μM de Al(III) e 3 μM de F^- ; 6 μM de Al(III) e 3 μM de F^- ; 6 μM de Al(III) e 6 μM de F^- , respectivamente para as soluções 2, 3, 4 e 5. Todas as soluções foram avolumadas com solução tampão MES (25 mM, pH = 5,5). Após esses procedimentos, as medidas foram realizadas no espectrofluorímetro com $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$ e o $\lambda_{\text{em}} = 420\text{-}650 \text{ nm}$ para obtenção dos espectros.

3.3.9 Ensaio de adição de padrão

O ensaio de adição de padrão para avaliar a exatidão do método e possível efeito de matriz foi realizado em amostra de água de diálise do Hospital Universitário da UFAL, Hospital do Coração e do Hospital Sanatório da cidade de Maceió-AL. De acordo com a Sociedade Brasileira de Nefrologia, a diálise é um tipo de tratamento que visa repor as funções dos rins, retirando substâncias tóxicas e o excesso de água e sais minerais do organismo, estabelecendo assim, uma nova situação de equilíbrio (SIMOES et al., 2005). Assim, a água utilizada na diálise é tratada e usada para diluir soluções concentradas de sais, conhecidas como concentrados polieletrólíticos (SILVA et al., 1996). Na hemodiálise o maior insumo consumido é a água, pois os pacientes em tratamento são expostos a volumes de água que variam entre 18.000 a 36.000 litros por ano, portanto a água utilizada na diálise requer maior preocupação com sua qualidade e de seus parâmetros físico-químicos e microbiológicos (PEREZ e GARCIA, 2001). O ensaio de adição de padrão também foi realizado em amostras de água mineral adquirida no comércio de Maceió e de água potável. O procedimento de adição de padrão foi realizado da seguinte forma: em quatro tubos de 2 mL, foram adicionados 0,5 mL da amostra a ser analisada e as seguintes concentrações de Al(III) : 0; 0,25; 0,5 e 1 μM , respectivamente. Os outros parâmetros químicos e físicos foram aqueles descritos previamente nas condições otimizadas.

3.3.10 Marcação fluorescente da sonda 3A8 em raízes de milho previamente tratadas com alumínio.

Para a germinação, as sementes de milho foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (NaClO) 2% (v/v) durante 20 min e posteriormente lavadas com água deionizada. Em seguida, as sementes foram enfileiradas sobre folhas de papel de filtro embebidas com

solução aquosa de Nistatina[®] 0,5% (v/v), que foram enroladas e mantidas em câmara de germinação com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 25 °C, por 12 dias.

As plântulas foram então transferidas para potes plásticos de 500 mL cobertos por folhas de alumínio. Os sistemas radiculares de plântulas foram submetidos aos seguintes tratamentos hidropônicos a concentração de Ca(II) 200 µM (controle) ou Al(III) 20 µM ou 100 µM em Ca(II) 200 µM e pH 4,0. Durante os 2 dias de tratamento, as plantas foram mantidas em sala de crescimento, a 30°C, sob iluminação constante a uma fluência média de luz de 190 µmols de fótons/m². Os sistemas radiculares foram coletados 48 h após o segundo tratamento, e foram feitos cortes transversais, à mão livre a partir do ápice radicular. Os cortes foram incubados por 1 h em soluções recém-preparadas de Lumogallion 80 µM ou do composto 3A8 a 80 µM em tampão MES 22,5 mM (pH 5,5) em etanol 10% (v/v), para detecção de alumínio. Após 1 h de incubação no escuro e à temperatura ambiente, os cortes foram lavados em água deionizada, montados em lâminas e analisados ao microscópio de fluorescência.

3.3.11 Tratamento estatístico dos dados

Para o tratamento estatístico dos resultados obtidos foram empregados o programa Originlab versão 9.0 (Northampton, USA) e o Excel 2010 (Microsoft Office). Nas etapas de otimização dos diferentes parâmetros analíticos, o coeficiente angular da curva analítica e o sinal de fluorescência do branco analítico foram empregados como critério de escolha da condição de estudo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Estudos preliminares: seleção da sonda modelo e da faixa de pH

A seleção de uma sonda modelo a partir das sete bases de Schiff que foram cedidas para o desenvolvimento dessa metodologia foi baseado na quantidade de grupos hidroxila (-OH) presentes em sua estrutura. Esses compostos apresentam uma parte da estrutura comum, sendo variável a quantidade de radicais hidroxila, o que diferencia uma molécula da outra. Então, para o início do processo de avaliação, selecionou-se o composto 3A8 por apresentar uma quantidade intermediária de radicais hidroxilas.

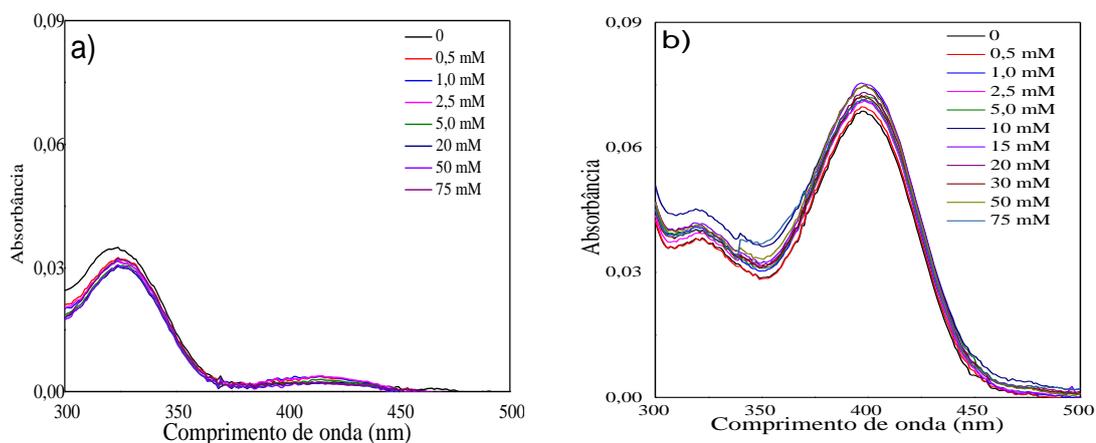
Inicialmente, baseando-se em trabalhos da literatura que utilizaram bases de Schiff como sondas fluorogênicas para quantificação de Al(III) selecionou-se os valores de pH comumente utilizados. Neste caso, uma condição próxima ao meio fisiológico (pH 7,5) e uma condição em meio mais ácido (pH = 4,5) para evitar hidrólise dos íons alumínio em meio aquoso (JIANG et al., 2011; SAHANA et al., 2011; KUMAR et al., 2015; HWANG et al., 2015). Assim, uma vez estabelecidos os valores de pH para os estudos preliminares, se utilizou tampão acetato (pH 4,5) e solução tampão Tris (pH 7,5) a 50 mM.

4.2 Avaliação espectrofotométrica e espectrofluorimétrica do complexo sonda–Al (III)

Na literatura, algumas bases de Schiff são utilizadas tanto como sensores colorimétricos e fluorimétricos para determinação de diferentes espécies metálicas (FAN et al., 2014; KUMAR et al., 2015; GHORAI et al., 2015). No intuito de avaliar a possibilidade de desenvolver um método colorimétrico e fluorimétrico para determinação de íons alumínio a partir das bases de Schiff utilizadas nesse estudo, se avaliou o comportamento espectroscópico do complexo por UV-vis e fluorescência molecular.

O uso da técnica de espectrofotometria tinha por objetivo principal verificar a possibilidade do complexo apresentar propriedades ópticas (cor ou aumento da absorção na presença de diferentes concentrações de íons alumínio) para desenvolvimento de um sensor colorimétrico. Além disto, avaliar em qual comprimento de onda o complexo formado tinha maior absorção, visto que esse dado é importante para determinar qual o comprimento de onda de excitação visando as medidas fluorimétricas (SKOOG et al., 2006; LAKOWICZ, 2010). Na figura 3 são mostrados esses resultados.

Figura 3. Espectro no UV-visível para o composto 3A8 (20 μM) na presença de diferentes concentrações de Al(III) (0 – 75 μM) em a) tampão acetato (50 mM, pH 4,5); b) tampão tris (50 mM, pH 7,5).



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

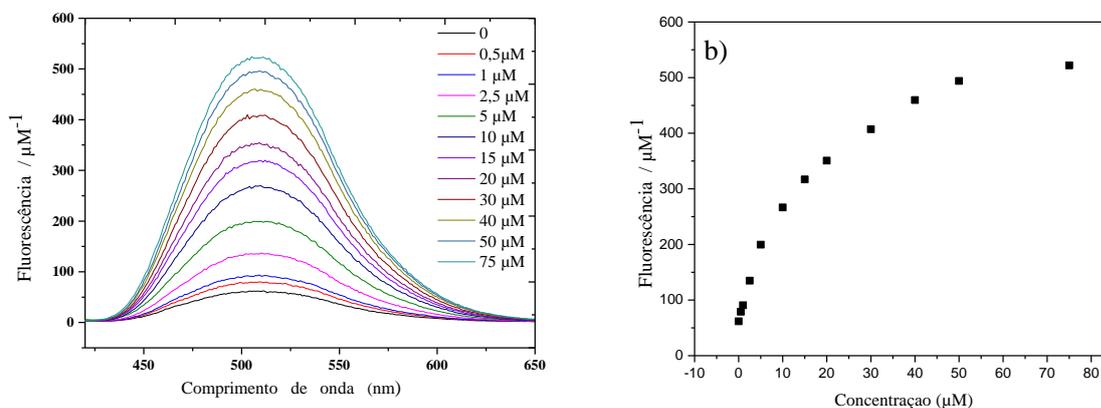
A partir dos resultados obtidos (Fig. 3), pôde-se observar que, nas condições avaliadas em diferentes valores de pH, não se observou variação significativa do sinal analítico para que o composto 3A8 pudesse ser utilizado como sensor colorimétrico. Por outro lado, o comprimento de onda de maior absorção para o complexo formado entre base de Schiff e íons Al(III) foi 325 nm em pH 4,5 e 400 nm em pH 7,5 (Fig. 4). Essa mudança no comprimento de onda ocorre devido ao fato do ligante ser derivado de ácido/base fraco, por isso a mudança no pH pode mudar a estrutura do complexo formado e, conseqüentemente, mudar as propriedades espectroscópicas.

Uma vez que se os resultados demonstram a inviabilidade de se obter um sensor colorimétrico utilizando a sonda 3A8, a técnica de fluorescência molecular foi utilizada para monitorar as propriedades em relação ao complexo formado entre a sonda e os íons Al(III). Para tanto, as mesmas soluções preparadas para a avaliação por UV-vis, foram utilizadas inicialmente como referência para avaliação da emissão de fluorescência utilizando os comprimentos de onda de máxima absorção para excitar o complexo e para verificar em qual faixa de pH 4,5 (tampão acetato, $\lambda_{\text{ex}} = 325$ nm) e 7,5 (tampão acetato, $\lambda_{\text{ex}} = 400$ nm) o complexo apresentou maior emissão de fluorescência. A partir dos resultados para a avaliação inicial do pH do meio pôde-se observar que em pH 7,5 (tampão Tris) a sensibilidade do método foi maior do que em pH 4,5 (tampão acetato) cerca de 9 vezes, dessa forma, se estabeleceu pH 7,5 para realização dos estudos subsequentes.

Na sequencia, foi realizada a titulação espectrofluorimétrica da sonda 3A8 com adições crescentes de alumínio (0 – 75 μM) em pH 7,5 (tampão tris 50 mM) no comprimento

de onda de excitação de 400 nm. Na figura 4 pode-se observar o perfil da titulação espectrofluorimétrica.

Figura 4. a) Espectro de emissão de fluorescência do composto 3A8 (20 μM) na presença de diferentes concentrações de Al(III) (0 – 75 μM) em tampão tris (50 mM, pH 7,5), λ_{ex} = 400 nm; b) Perfil gráfico do valor de intensidade de fluorescência em função da concentração de íons Al(III).



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

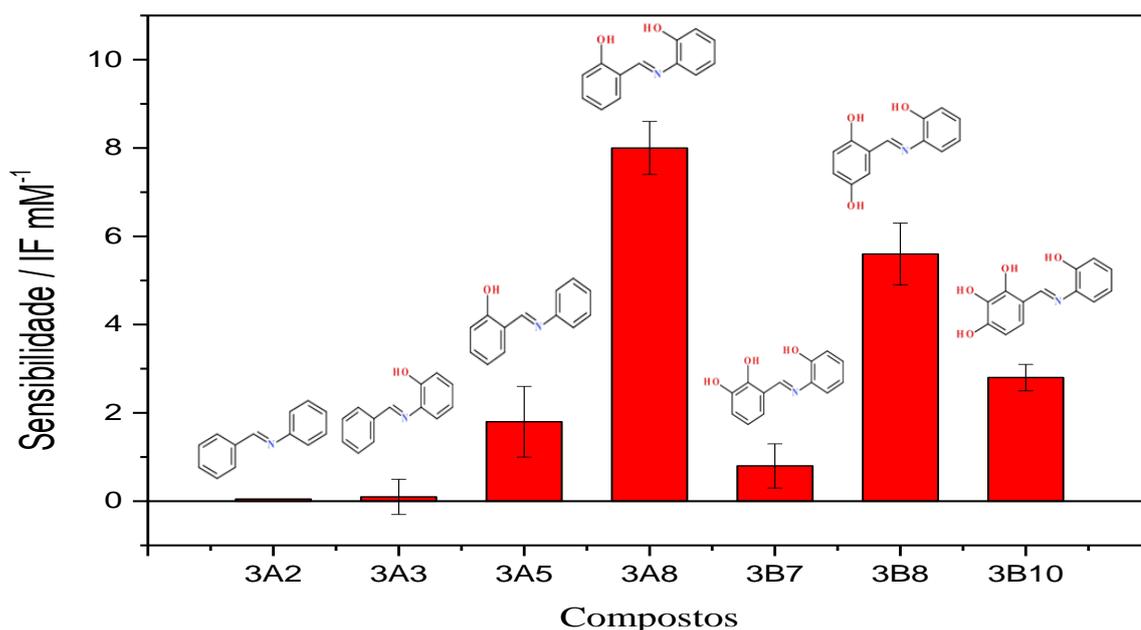
A partir dos resultados (Fig. 4), observou-se que com o aumento da concentração de íons alumínio (de 0 a 75 μM) ocorreu aumento na intensidade de fluorescência, indicando assim, que o composto 3A8, pode ser utilizado como uma sonda fluorogênica para íons Al(III). Considerando a composição do sistema, a ocorrência de fluorescência molecular pode ser explicada através das propriedades espectroscópicas de cada espécie. O princípio do método é baseado na ausência de fluorescência da base de Schiff livre ou dos íons Al(III). Nesta condição o sistema estaria no modo *off* ou “desligado”, no entanto, com a adição de incrementos de alumínio há formação do complexo, a um aumento na emissão de fluorescência do sistema, ou seja, ocorre a formação do modo *on* ou “ligado”.

O aumento da fluorescência do sistema está relacionado à perda da livre rotação da base de Schiff a partir da complexação com o alumínio, possibilitando o alinhamento dos orbitais π (π), fato que favorece o aumento da rigidez da molécula no complexo formado e diminui a velocidade de relaxação não-radioativa, ao ponto do relaxamento por fluorescência ocorrer (SKOOG et al., 2006; BONNACCHI, 2011).

4.3 Avaliação das bases de Schiff como sondas para Al(III)

Uma vez estabelecidas condições iniciais quanto ao pH os sete compostos foram avaliados quanto à sensibilidade visando a determinação de íons Al(III). Para tanto, os compostos foram avaliados em solução tampão Tris (50 mM, pH 7,5). Na Figura 5 pode ser observado o resultado da avaliação das diferentes bases de Schiff.

Figura 5. Avaliação das bases de Schiff nas condições iniciais estabelecidas: solução tampão Tris (50 mM, pH= 7,5), [sonda] = 20 μ M e Al(III) na faixa de 1-75 μ M, comprimento de onda de excitação (nm): 3A2 = 282, 3A3 = 282, 3A5 = 400, 388 = 400, 3B7 = 350, 3B8 = 350 e 3B10 = 366.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

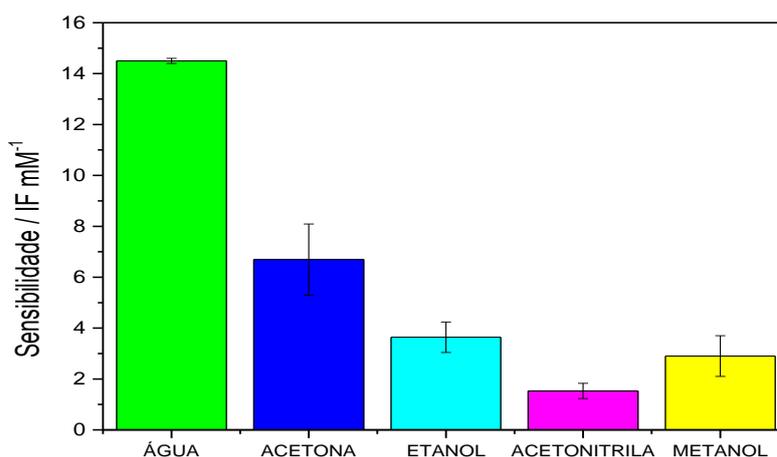
De acordo com os resultados obtidos pôde-se observar que a base de Schiff 3A8, foi a que apresentou maior sensibilidade quando comparado aos outros compostos. Esse composto diferencia-se dos demais pela presença de dois grupos hidroxila na posição orto em sua estrutura. Visto que a complexação de alumínio requer um ambiente que contenha O e N, uma base de Schiff com grupos hidroxila tende a favorecer a interação, devido à necessidade de um ambiente que contenha oxigênio e nitrogênio (bases duras de Pearson) para complexação dos íons alumínio. Assim, tomou-se como hipótese se o número de radicais hidroxilas por molécula poderia favorecer a complexação e por consequência aumentar a sensibilidade analítica. Este perfil foi observado comparando a sensibilidade de 3A2 a 3A8, pois as hidroxilas na posição 4 da porção original da amina sugere que este grupo interage com um grupo substituinte da porção do oriunda do aldeído, e assim, contribui para a intensidade da

fluorescência. Contudo, como evidenciado pela Figura 5 nota-se que o aumento de grupos hidroxila apesar de favorecer a complexação com os íons alumínio, a partir de 3 grupos/molécula, ocorre redução da sensibilidade. Este comportamento está relacionado com a combinação de grupos substituintes em determinadas posições, um dos quais aumenta a intensidade de fluorescência, enquanto o outro diminui, cancelando, assim as propriedades de fluorescência do complexo formado (AOKI et al., 1989). Por fim, a sonda 3A8 foi selecionada para os estudos posteriores.

4.4 Avaliação de diferentes solventes na sensibilidade do método

A maioria das bases de Schiff não são solúveis em água, sendo suas soluções preparadas em solventes orgânicos. Considerando que a sonda 3A8 foi a que apresentou melhor sensibilidade a influência de diferentes solventes foi avaliada. No entanto, neste estudo, os experimentos foram realizados utilizando solventes orgânicos misturados com água (solução tampão), pois o objetivo do trabalho é quantificar íons Al(III) em meio preferencialmente aquoso. Dessa forma, os solventes selecionados foram água, metanol, etanol, acetona e acetonitrila na proporção solução tampão/solvente de 1:1, com exceção da condição onde a água (solução tampão) foi utilizada sem adição de nenhum solvente adicional. Os resultados referentes a esta avaliação são apresentados na Figura 6.

Figura 6. Variação da sensibilidade do método em função de diferentes solventes orgânicos no meio. Condições: [3A8] = 20 μ M, Al(III) de 1 -75 μ M em solução tampão tris 50 mM.



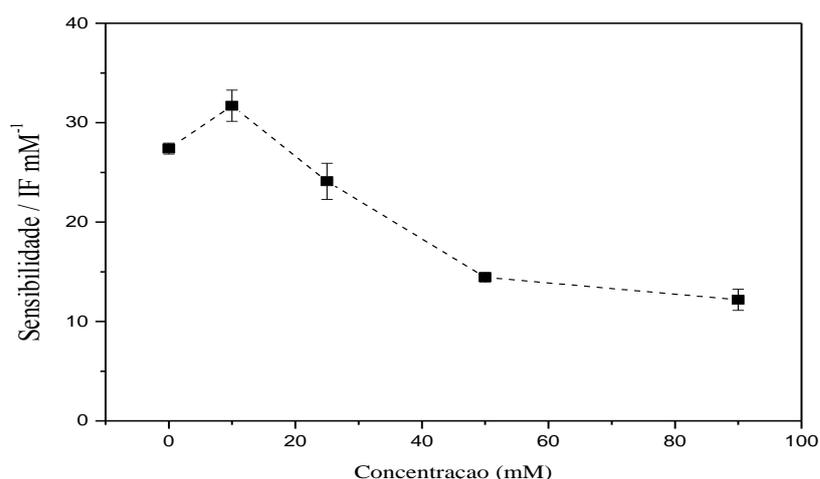
Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Por meio dos resultados, pôde-se observar, de forma geral, que a presença dos solventes orgânicos conduziu à redução da sensibilidade do método de forma significativa quando se compara o meio aquoso com acetonitrila, por exemplo. A sensibilidade quanto a

intensidade de fluorescência seguiu a seguinte ordem água > acetona > etanol > metanol > acetonitrila. Considerando que o solvente orgânico foi adicionado ao meio reacional juntamente com a base de Schiff e o alumínio, esses solventes foram responsáveis pelas alterações quanto a fluorescência do sistema, pois afetam a estabilidade do estado fundamental e excitado de forma diferente, visto que alteram a distribuição de probabilidade relacionados aos processos de absorção e emissão de radiação (AL-KINDY et al., 2015). A influência do solvente na intensidade de fluorescência e por consequência na sensibilidade analítica do método, pode estar relacionada com a habilidade do solvente em potencializar ou minimizar possíveis interações intramolecular nas moléculas (AL-KINDY et al., 2011). Dessa forma, a maior intensidade de fluorescência observada para o complexo em meio aquoso pode ser explicada pela estabilização do complexo devido à capacidade de interação do solvente, no caso a água. Assim, a presença de solventes orgânicos desestabiliza o complexo formado, rompendo as interações e, portanto, diminuindo a sensibilidade quando comparado com o meio sem solvente orgânico.

Dentre os sistemas avaliados houve diminuição na sensibilidade do método, sendo a acetona o solvente com menor redução em comparação aos outros solventes orgânicos. Assim, nesse estudo buscou-se avaliar como a sensibilidade do método seria influenciada em diferentes proporções de acetona. Para tanto, a proporção de acetona no meio foi avaliada no intervalo de 0 e 90% (v/v). Os resultados dessa avaliação podem ser observados na Figura 7.

Figura 7. Avaliação da sensibilidade do método em função da proporção de acetona no meio. Condições: [3A8] = 20 μ M, Al(III) de 1-75 μ M em solução tampão tris 50 mM.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Pôde-se observar que a sensibilidade do método mudou com o aumento na quantidade de acetona no meio. Inicialmente, se observou um aumento de ~15% na sensibilidade na

presença de acetona a 10% (v/v) no meio, contudo, houve uma diminuição acentuada quando a proporção foi aumentada. Essa redução na sensibilidade pode ser atribuída à desestabilização do complexo formado, pelo rompimento das interações pelos dos reagentes utilizados na preparação das soluções, como da solução tampão, em proporções maiores que 25% (v/v) em acetona.

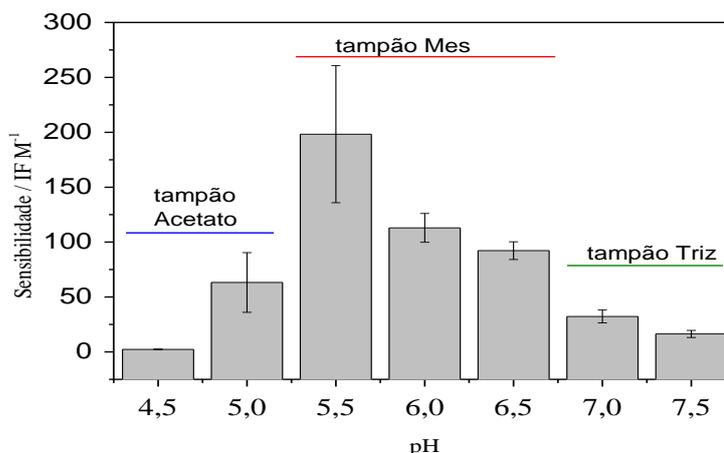
Outra explicação pode ser relacionada ao aumento da esfera de solvatação ocasionada pelo aumento da concentração de acetona no meio. Essa esfera de solvatação na sonda pode ocorrer devido à natureza orgânica das bases de Schiff, podendo essa ser melhor solvatada pela acetona do que pela água. Dessa forma, a complexação entre a sonda e os íons Al(III) fica comprometida devido à dificuldade de aproximação entre a base de Schiff e os íons alumínio, diminuindo assim, a sensibilidade do método.

4.5 Avaliação do pH e o tipo de solução tampão

O pH do meio tem um efeito importante na formação do complexo, uma vez que uma base de Schiff é uma molécula derivado de um ácido fraco (grupos fenólicos) que contém em sua estrutura grupos ionizáveis, o mesmo se aplica aos íons alumínio que são passíveis de hidrolisar formando hidróxicomplexos, ou seja, o pH do meio afeta a forma de existência analito e desempenha um papel importante na formação dos complexos metálicos. Assim, o estado fundamental e excitado de moléculas protonadas (ou respectivos complexos) podem ser dramaticamente diferentes de moléculas (e complexos) desprotonadas, por isso, o rendimento quântico pode ser modificado em função do grau de ionização em função do pH do meio (GUIBAULT, 1990; DESTANDAU; ALAIN; BARDEZ, 2004).

Dessa forma, para definir em qual pH o método proposto apresenta maior sensibilidade, se avaliou a faixa de pH de 4,5 a 7,5. Geralmente os estudos de otimização de pH onde objetiva-se o emprego da sonda em aplicações biológicas e em amostras ambientais, são realizados utilizando tampão fosfato devido a sua abrangência e compatibilidade. Contudo, devido à formação de composto iônico de baixa solubilidade entre o fosfato e os íons alumínio do meio ($\text{AlPO}_4(\text{s}) - K_{\text{ps}} = 9,84 \times 10^{-21}$), o emprego desta solução tampão foi evitado (SKOOG et al, 2006; NOLLA; ANGHINONI, 2006; AL-KINDY et al., 2015). Então, para realizar esse estudo, foram selecionadas diferentes soluções tampão que pudessem cobrir a faixa de pH a ser avaliada, sendo empregados tampão acetato (para 4,5 e 5,0), MES (5,5, 6,0 e 6,5) e Tris (7,0 e 7,5), todos a 50 mM. Na Figura 8 são apresentados os resultados quanto à variação da sensibilidade analítica em relação aos valores de pH avaliados.

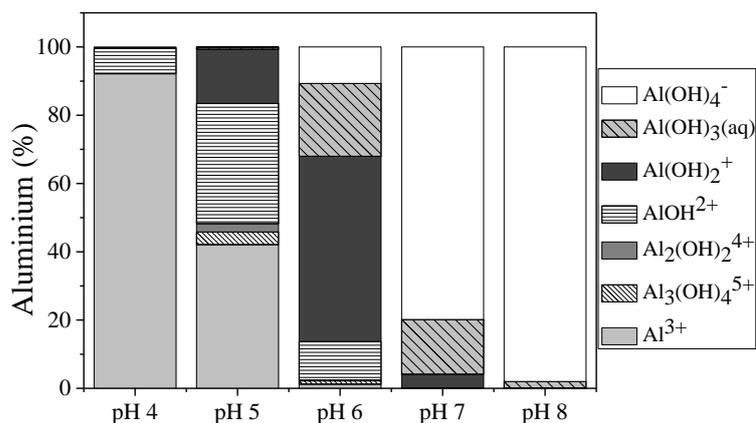
Figura 8. Avaliação da sensibilidade em função do pH do meio. Condições: [3A8] = 20 μ M, [Al(III)] = 1-2,5 μ M, concentração da solução tampão igual a 50 mM e λ_{ex} = 400 nm.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

A partir da análise dos resultados apresentados na Figura 8, a sensibilidade do método foi máxima em pH 5,5. Verifica-se que de pH 4,5 a pH 5,5 houve um aumento da sensibilidade, sendo observado um decréscimo para maiores valores de pH. A redução da sensibilidade quando o pH é menor que 5,5 estaria relacionado a competição dos íons Al(III) com os íons H⁺ presentes no meio pelos sítios de ligação da sonda, além disto, a redução do pH pode levar à hidrólise de compostos como bases de Schiff levando a formação dos reagentes de partida. Contudo, para maiores valores de pH (além de pH 5,5), a sensibilidade também diminuiu. Este resultado possivelmente está associado a degradação do complexo formado entre a base de Schiff e os íons alumínio, devido principalmente a competição com os íons hidroxila, pois os íons OH⁻ podem formar diferentes complexos com Al(III) em função do pH. Na Figura 9 pode-se observar a formação dos complexos de alumínio em função do pH.

Figura 9. Distribuição das espécies de alumínio (%) utilizando o software visual MINTEQ. Condições: Al(III) = 10 mg L⁻¹ variando o pH da solução de 4 a 8.

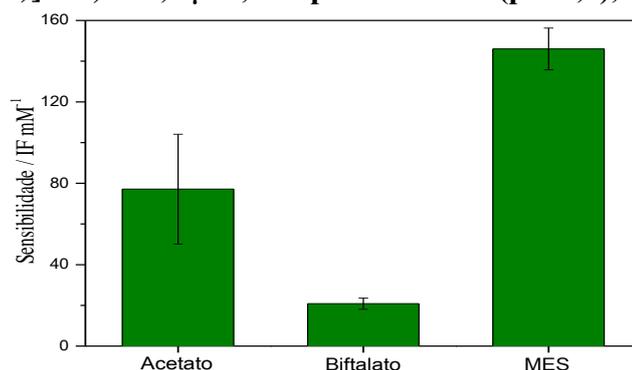


Fonte: Prof^a Luciana Camargo (UFSCar), 2015.

De acordo com a Figura 9, acima de pH 6,0 a concentração de íons Al^{3+} livres é muito baixa em relação as demais espécies, principalmente os complexos formados. Esta diminuição na concentração dos íons Al^{3+} no meio acarreta na redução da intensidade de fluorescência e, conseqüentemente, na sensibilidade do método, devido à menor formação do complexo (AL-KINDY et al., 2015). Assim, o pH 5,5 foi selecionado para os estudos posteriores.

Sendo estabelecido o valor de pH que apresentou uma maior sensibilidade no método proposto, foi avaliado se o tipo de solução tampão poderia influenciar. Para tanto, três soluções tampão foram avaliadas considerando que a máxima capacidade tamponante ($\text{pH} = \text{pK}_a \pm 1$) atendessem ao valor de pH selecionado. Desta forma, selecionou-se tampão acetato ($\text{pK}_a = 4,75$), biftalato ($\text{pK}_{a1} = 5,1$ e $\text{pK}_{a2} = 7,9$) e MES ($\text{pK}_a = 5,0$). Os resultados para a avaliação são mostrados na Figura 10.

Figura 10. Avaliação da sensibilidade em função do tipo de solução tampão. Condições: [3A8] = 20 μ M, [Al(III)] = 0,25-2,5 μ M, tampão a 50 mM (pH 5,5), $\lambda_{\text{ex}} = 400$ nm.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

A partir dos resultados desta avaliação, ficou constatado que o tampão MES foi o que apresentou maior sensibilidade, seguindo a ordem: MES > acetato > biftalato. Os íons Al(III) apresentam elevada afinidade com grupos carboxílicos devido ambos serem ácido e base duros de Pearson (SINGH e SINGH, 2014), enquanto que o grupo sulfonato é uma base intermediária. De fato, percebe-se que o número de grupos carboxilatos influenciou diretamente na sensibilidade, pois, o biftalato possuiu dois grupos carboxilatos enquanto o acetato apenas um, observando-se perfil inverso em relação a sensibilidade (Fig. 10). Assim, os ânions biftalato e acetato também podem competir com a base de Schiff pela complexação dos íons Al(III) e, portanto, o complexo com a sonda 3A8 é formado em menor quantidade. Por fim, o MES não apresenta em sua estrutura sítios complexantes efetivos (TAHA et al., 2014), desta forma, sua interação com os íons Al(III) devem ocorrerem em uma baixa extensão. Logo, este sistema tampão foi selecionado para os estudos subsequentes.

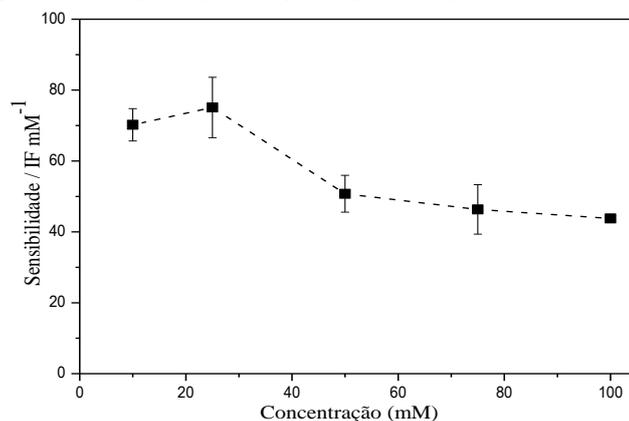
4.6 Avaliação da concentração do tampão

Após a seleção do tipo de solução tampão e do respectivo pH, foi avaliado o efeito da concentração desta solução quanto a sensibilidade do método. No desenvolvimento do método proposto, variações em relação ao pH de maior sensibilidade selecionado (pH 5,5) podem levar a variações acentuadas na sensibilidade. Por exemplo, uma variação de $\pm 0,5$ unidades de pH, pode influenciar na redução da sensibilidade em 38 e 75%, respectivamente. Dessa forma, é importante que o pH do meio permaneça constante durante o procedimento. Assim, a depender da amostra em que esse método for aplicado, a solução tampão em concentração adequada conseguirá manter o pH inalterado.

A solução tampão MES utilizada nesse estudo não se encontra na condição de máxima capacidade tamponante ($\text{pH} = \text{pK}_a$), conseqüentemente, as concentrações de ácido e base conjugadas são diferentes, sendo que 24% encontra-se na forma associada e 76% na forma

dissociada, perfazendo uma razão de aproximadamente 1:3 (ácido/base), adequada para garantir a eficiência do tamponamento (SKOOG et al., 2006; HARRIS, 2005). Na Figura 11 são apresentados os resultados referentes a essa otimização em diferentes concentrações do tampão.

Figura 11. Avaliação da concentração do tampão MES (mM) na sensibilidade analítica
Condições: tampão pH = 5,5; [3A8] = 20 μM , [Al(III)] = 0,25 – 2,5 μM .



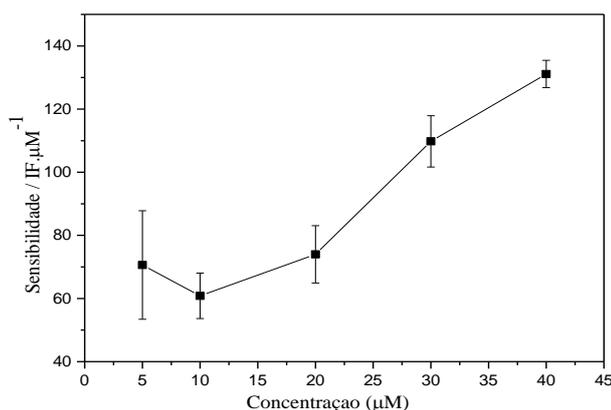
Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

De acordo com os resultados (Fig. 11), observou-se que, com o aumento da concentração do tampão a sensibilidade do método aumentou até a concentração de 25 mM, a partir dessa concentração, houve uma diminuição gradativa na sensibilidade. Essa diminuição está relacionada com o aumento da força iônica do meio, ou seja, os íons derivados da solução tampão levam a redução da atividade reduzindo a extensão da reação de complexação da base de Schiff com os íons alumínio, acarretando assim, na diminuição da formação do complexo e consequente decaimento do sinal de emissão de fluorescência e sensibilidade. Assim, a concentração de 25 mM da solução tampão foi selecionada para os estudos subsequentes.

4.7 Avaliação da concentração da sonda

Para determinar qual a concentração da sonda que seria avaliada, foi realizado um levantamento das concentrações de sondas explorando base de Schiff para quantificação de íons Al(III) descritos na literatura (GUNDUZ et al., 2005). Assim, observou-se que as concentrações mais utilizadas variam, geralmente, de 5 a 40 μM , as quais em alguns casos visavam a aplicação em imageamento celular (JIANG et al., 2015; DING et al., 2015; YIN et al., 2016). Então, se avaliou as concentrações da sonda de 5-40 μM a fim de obter a concentração com a maior sensibilidade e menor sinal do branco analítico, se possível. Os resultados obtidos para este estudo podem ser visualizados na Figura 12.

Figura 12. Avaliação da concentração da sonda na sensibilidade analítica. Condições: tampão Tris 25 mM (pH = 5,5), [3A8] = 20 μ M, [Al(III)] = 0,25-2,5 μ M.



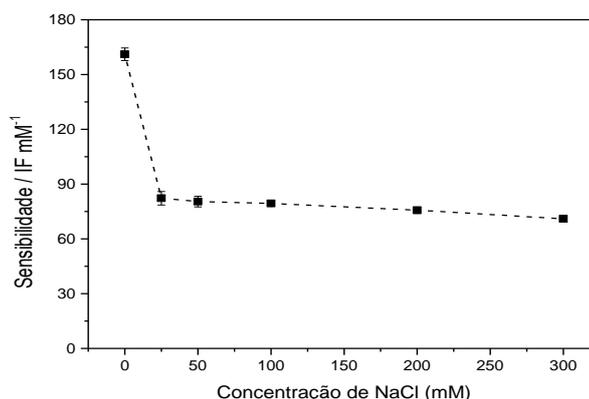
Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Observa-se na Figura 12 que com aumento da concentração do ligante (sonda), a sensibilidade do método aumentou. Esse resultado pode ser explicado pela maior formação do complexo sonda-alumínio e consequente aumento do sinal de emissão de fluorescência. Da variação de 20 para 30 μ M obteve-se um aumento da sensibilidade de 37%, contudo, para mesma variação de concentração da sonda, neste caso, quando se compara 30 e 40 μ M o aumento da sensibilidade foi de 16%. Logo, maiores valores na concentração da sonda não levariam a incremento significativo na sensibilidade, além de usar uma maior concentração do composto. Desta forma, a concentração selecionada da sonda foi de 40 μ M. Por fim, o sinal do branco analítico não foi influenciado pela concentração da sonda, devido à baixa fluorescência intrínseca da molécula em função da rotação livre dos anéis aromáticos.

4.8 Avaliação da influência da força iônica

Uma vez que o aumento da concentração da solução tampão levou à redução da sensibilidade e este resultado foi atribuído ao aumento da força iônica do meio, fez-se necessário avaliar este parâmetro no desenvolvimento do método proposto. Desta forma, o estudo foi realizado por meio da adição de diferentes concentrações de NaCl (0-300 mM) ao meio reacional, a fim de avaliar se a concentração dos íons presentes influenciaria na sensibilidade do método. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 13.

Figura 13. Avaliação da concentração de NaCl (mM) na sensibilidade analítica. Condições [3A8] = 40 μ M, [Al(III)] = 0,05-5 μ M, tampão MES 25 mM (pH 5,5) λ_{ex} = 400 nm.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

A partir da Figura 13 nota-se que o aumento da concentração de NaCl interfere diretamente na sensibilidade do método. Entretanto, nota-se que a partir da concentração de 25 mM em NaCl, há uma redução de cerca de 50% na sensibilidade do sistema, e em seguida, a sensibilidade do sistema ficou praticamente constante. A redução da sensibilidade deve-se possivelmente a diminuição da atividade das espécies iônicas, especialmente dos íons Al(III), uma vez que o coeficiente de atividade é mais afetado com o aumento da carga da espécie (WANG et al., 2010). Logo, para sistemas onde a força iônica possa influenciar deve-se recorrer a uma compatibilização de matriz ou utilizar a estratégia de adição de padrão.

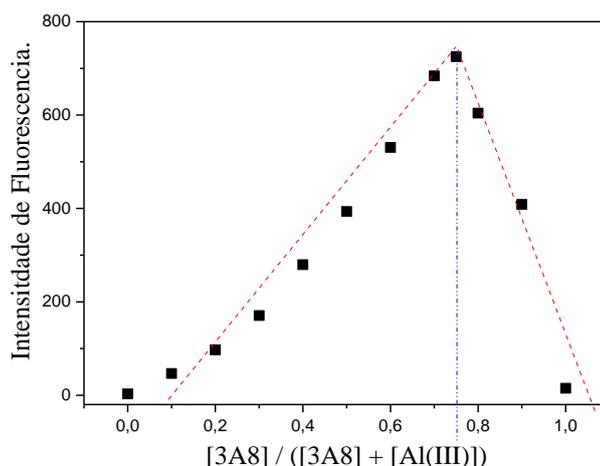
4.9 Determinação da estequiometria do complexo

A determinação da estequiometria do complexo formado entre o Al(III) e a sonda (base de Schiff, 3A8) foi realizado pelo método das variações contínuas ou método de Job (QIN et al., 2014)), avaliado por meio de cálculos teóricos (HUANG et al., 2017) e por Ressonância magnética nuclear (XU et al., 2015).

4.9.1 Determinação da estequiometria do complexo pelo método de Job

Para determinação da estequiometria pelo método das variações contínuas ou método de Job, foram preparadas soluções com diferentes frações molares sonda-Al(III). A intensidade de fluorescência dos diferentes sistemas foi medida sendo construído um gráfico da fração molar da sonda em função da intensidade de fluorescência (Figura 14).

Figura 14. Método de Job para determinação da estequiometria do complexo em meio aquoso.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

O máximo observado (Fig. 14) corresponde a estequiometria entre a sonda e os íons Al(III) nas condições estabelecidas. Desta forma, verifica-se que a fração da sonda equivalente a 0,75; que sugere a estequiometria de 3:1 em relação a sonda:Al(III) para o complexo formado.

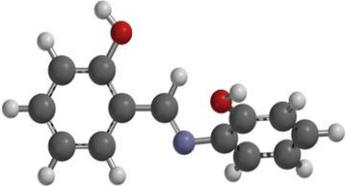
Na literatura, é verificado em muitos trabalhos que a estequiometria entre bases de Schiff e Al(III) é determinada pelo método de Job. A partir de dados da literatura, é verificado que a estequiometria pode ser influenciada por diferentes sistemas solventes. Assim, LIU e colaboradores (2014) determinaram a estequiometria de um derivado de naftaleno com alumínio em tampão HEPES (pH 7,0), sendo a proporção 1:1 encontrada, enquanto LI e colaboradores (2015) encontraram a proporção 1:1 de alumínio com um derivado de pirazina em etanol, dessa forma, pode ser observado que diferentes compostos podem apresentar a mesma estequiometria com alumínio diferenciando o sistema solvente. Por outro lado, KIM e colaboradores (2012) determinaram a estequiometria na proporção de 1:1 de um sensor baseado em Salicilimina (o mesmo ligante utilizado nesse trabalho) com alumínio em metanol / água (1:1), enquanto que neste trabalho, o sistema foi preparado em meio aquoso (tampão MES, pH 5,5). Dessa forma, pode-se confirmar que, até para o mesmo composto, a depender do solvente utilizado, a estequiometria pode ser modificada, pois em meio aquoso a estequiometria determinada foi 3:1, enquanto que em meio metanólico a estequiometria foi 1:1. Esse comportamento está relacionado com as mudanças nas habilidades relativas dos solventes para romper e reformar ligações de hidrogênio intra-molecular nas moléculas em solução nos estados fundamental e excitado.

4.9.2 Determinação da estequiometria sonda- Al(III) por cálculos teóricos

Cálculos teóricos foram utilizados para confirmar a estequiometria do complexo formado, para isso, a sonda (3A8) foi analisada utilizando-se o Hartree Fock(HF) com nível de teoria 3-21G(*), onde o método semi-empírico AM1 foi empregado como método de minimização energética para obtenção da conformação termodinamicamente mais favorável antes da aplicação do *ab initio*. Os resultados desta etapa estão mostrados na Tabela 3.

Após os resultados gerados por meio da aplicação do método híbrido QM-MM, foi possível observar que a estrutura da sonda tende a adotar uma conformação não planar, desfavorecendo a fluorescência. O valor de ZPE foi utilizado como método de correção energética, possibilitando a obtenção da $\Delta E = -1810780,37 \text{ kJ mol}^{-1}$. Adicionalmente, o intervalo energético entre os orbitais de fronteira (Δ_{H-L}) pode ser considerado relativamente pequeno, o que pode favorecer a fluorescência. Por fim, estes resultados referentes ao ligante livre foram utilizados para avaliar a estabilidade do complexado com os íons Al(III), nas proporções 2:1 e 3:1 sonda:Al(III), uma vez que o método de Job indicou a proporção 3:1.

Tabela 3. Parâmetros do ligante (3A8) obtidos por AM1/HF/3-21G(*)

Parâmetro	Valores	Estrutura otimizada
Energia do complexo (E) (kJ mol^{-1})	-1811379,85	
Energia do ponto zero (ZPE) (kJ mol^{-1})	599,48	
Energia real do complexo (ΔE) (kJ mol^{-1}) ^a	-1810780,37	
HOMO	-7,69	
LUMO	2,47	
Δ_{H-L} ^b	5,22	

^aEnergia real do complexo (kJ mol^{-1}), obtida através da equação $\Delta E = E + ZPE$

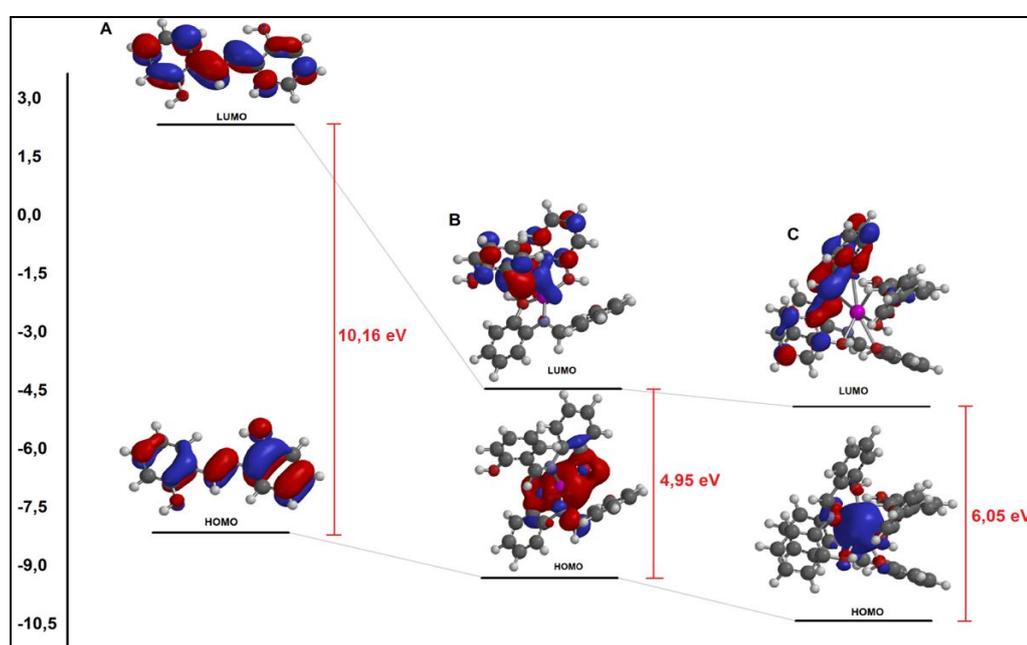
^bIntervalo de energia (eV), obtido através da equação $\Delta_{H-L} = HOMO - LUMO$.

Fonte: Edeildo F. Silva-Júnior, 2017.

Inicialmente, simulou-se os possíveis sítios de interação da sonda com os íons Al(III) para cada proporção, sendo avaliados sete complexos sonda:Al(III) na proporção 2:1, que se mostrara termodinamicamente favorável à complexação 2:1. De forma similar, simulou-se a formação de seis diferentes complexos sonda:Al(III) na proporção 3:1. Em seguida, um diagrama de energia de HOMO e LUMO foi gerado com o complexo mais estável do conjunto de possibilidades avaliado (Figura 15).

Com base no diagrama, percebe-se que o ligante livre apresenta a maior barreira energética (10,16 eV) inviabilizando a emissão de fluorescência por esta espécie, como verificado também pela sua falta de planaridade (Tabela 3). Em relação aos complexos, verificou-se que a proporção 2:1 apresentou menor energia (HOMO e LUMO) em relação ao complexo na proporção 3:1, sendo 4,95 e 6,05 eV, respectivamente. Estes resultados indicam que ambos os complexos são passíveis de emitir fluorescência devido a redução da barreira energética, com maior probabilidade para a estequiometria 2:1 (Fig. 15).

Figura 15. Intervalos de HOMO-LUMO calculados usando AM1/HF/3-21G(*). Em (a), sonda 3AB; (b) e (c), complexos sonda:Al(III) a proporção 2:1 e 3:1, respectivamente.



Fonte: Edeildo F. Silva-Júnior, 2017.

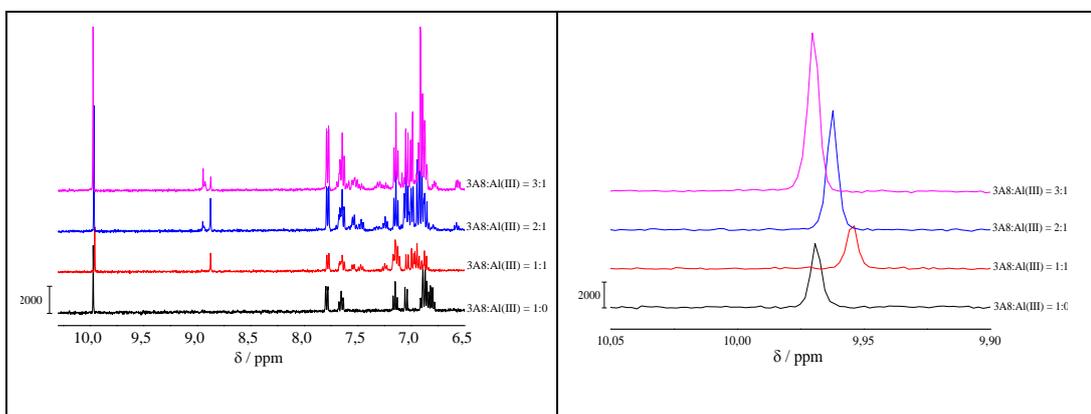
Seguindo a mesma metodologia, KUMAR e colaboradores (2015) utilizaram estudos teóricos para confirmar a formação do complexo sonda-Al(III). Nesse estudo, as diferenças de energia entre o HOMO e LUMO da sonda e do complexo sonda- Al(III) correspondente foram de 3,802 eV e 0,831 eV, respectivamente. Os resultados mostraram que a ligação de alumínio com a sonda reduziu a energia HOMO-LUMO, favorecendo a formação do complexo.

Contudo, o método de Job indicou que a estequiometria do complexo é preferencialmente 3:1. Mas, deve-se considerar que em solução pode ocorrer a formação de misturas de complexos, principalmente quando tem-se excesso do ligante. Assim, apesar dos estudos teóricos indicarem que a estequiometria 2:1 é energeticamente mais favorável, não desconsidera a hipótese da mistura dos complexos.

4.9.3 Determinação da estequiometria sonda- Al(III) por Ressonância Magnética Nuclear

Para monitorar as variações dos sinais da sonda (3A8) na presença de alumínio realizou-se estudos de deslocamento químico (δ) utilizando ressonância magnética nuclear de ^1H . Neste estudo, avaliou-se o efeito da adição de diferentes concentrações da sonda, para um valor fixo de alumínio mantendo o pH constante em 5,5. Utilizou-se como padrão de referência interna o trimetilsililpropionato de sódio (TMPS). Os resultados para este estudo estão apresentados nas figuras 16.

Figura 16. a) Espectro de RMN ^1H da sonda 3A8 em diferentes proporções com o íon Al(III) e b) expansão referente ao sinal do hidrogênio imínico. Condições: D_2O - $\text{DMSO-}d_6$ (8:2) em pH 5,5 ajustado com NaH_2PO_4 .



Os estudos empregando RMN ^1H foram realizados a fim de auxiliar na compreensão estequiometria do complexo formado entre a sonda 3A8 e o Al(III) simulando as condições experimentais. Devido a menor sensibilidade da técnica de RMN as concentrações nesta etapa do trabalho foram maiores quando comparadas aos ensaios por fluorescência molecular, assim, no meio reacional, foi adicionado $\text{DMSO-}d_6$ (máximo de 20% v/v) para garantir a solubilidade da sonda 3A8.

De acordo com a Figura 16 observa-se no espectro de RMN ^1H para sonda livre, na ausência de íons Al(III), um conjunto de sinais de 6,84 a 7,78 ppm referente aos hidrogênios aromáticos, e um singlete em 9,96 ppm atribuído a hidrogênio imínico (XU et al., 2015). Com adição de íons Al(III) ao meio observa-se desdobramentos dos sinais dos hidrogênios aromáticos, principalmente na região de 6,92 a 7,92 ppm e 7,19 a 7,59 ppm, independente da proporção sonda e Al(III). Contudo, para o singlete referente ao

hidrogênio imínico observa-se um deslocamento de 9,97 ppm (sonda livre) para 9,95 ppm (proporção 3A8:Al(III) de 1:1). Esta variação foi atribuída ao processo de complexação (GHORAI et al., 2015), onde nesta proporção o nitrogênio da ligação imina participa da coordenação do íon Al(III). Ao duplicar a quantidade da sonda no meio (proporção 3A8:Al(III) de 2:1), o hidrogênio imínico apresenta deslocamento de 9,96 ppm, possivelmente devido a menor contribuição do nitrogênio na complexação do alumínio. Nesta condição ocorre a formação preferencial de quatro ligações coordenadas do oxigênio fenólico com o Al(III). Por fim, na proporção 3A8:Al(III) de 3:1, não se observou variação no deslocamento químico do hidrogênio imínico em relação a sonda livre. Desta forma, nesta condição, a coordenação seria realizada apenas pelos átomos de oxigênio e não pelos de nitrogênio da ligação imina. Uma vez que os íons Al(III) são ácidos duros de Person, o oxigênio teria maior afinidade (base dura) em relação ao nitrogênio no processo de complexação. Assim, a proporção 3:1 (sonda: Al(III)) deve ser a espécie majoritária. Estes resultados são concordantes com os obtidos pelo método da variação contínua e pelos cálculos teóricos.

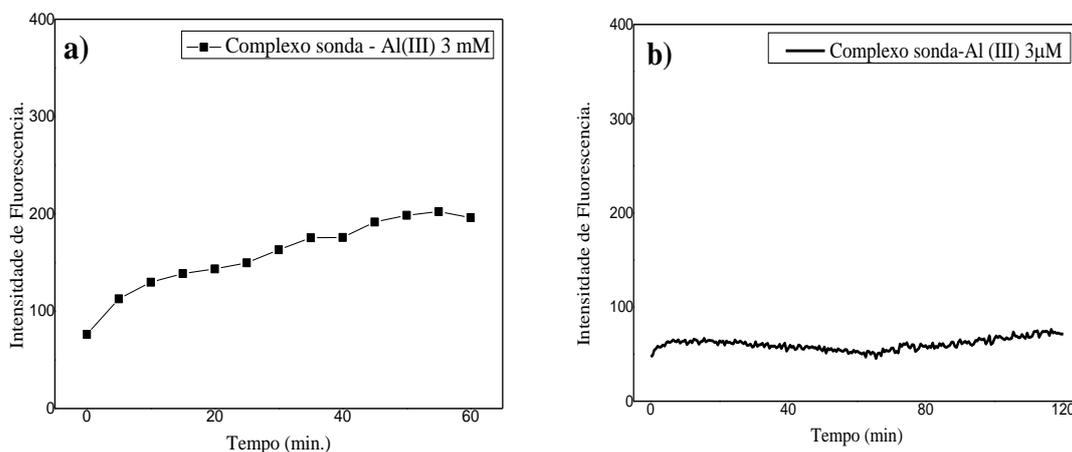
Adicionalmente, observou-se que um singlete em 8,87 ppm o qual possivelmente pode estar associado ao hidrogênio imínico de presente em uma fração do complexo formando em outra estequiometria (3A8:Al(III) a 2:1, por exemplo) ou com outro arranjo espacial (geometria). Portanto, nas condições avaliadas não podemos descartar a presença de outro complexo, contudo, a proporção 3A8:Al(III) de 3:1 deve ser a majoritária. Uma comparação com trabalho da literatura mostrou-se limitada, pois mesmos em sistemas com bases de Schiff e íons Al(III) visando o desenvolvimento de sondas em meio aquoso, os experimentos de RMN 1H foram realizados meio preferencialmente orgânico (FAN et al., 2014; LIU et al., 2014; KUMAR et al., 2015; QIN et al., 2015).

4.10 Avaliação da cinética da reação e estabilidade do complexo

Para o estudo cinético da reação e de estabilidade do complexo, as medidas de fluorescência molecular foram realizadas em função do tempo. Para essa avaliação, foram utilizados o branco analítico, ou seja, a sonda livre, e o complexo sonda-Al(III) nas condições otimizadas. O estudo cinético foi realizado até 60 min, enquanto para determinar a estabilidade fotoquímica do complexo, as medidas foram realizadas até 120 min. A diferença básica entre os dois procedimentos consiste que no estudo cinético a medida da intensidade de fluorescência foi realizada em intervalos de tempo pré-estabelecidos, nesse caso de 5 em 5

minutos. A avaliação da estabilidade fotoquímica foi realizada submetendo o sistema em estudo a um intervalo de tempo com incidência de radiação continuamente. A Figura 17 apresenta os resultados desses experimentos.

Figura 17. a) Avaliação da cinética da reação e b) estabilidade do complexo. Condições: Tampão MES 25 mM (pH 5,5), [3A8] = 40 μ M e [Al(III)] = 3 μ M.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Com relação à avaliação da cinética da reação, é possível observar na Figura 17a que a intensidade de fluorescência aumenta em função do tempo, até atingir um patamar por volta de 45 min de reação. A partir desse tempo, o sinal de fluorescência permanece praticamente inalterado e o complexo completamente formado. Assim, este tempo foi considerando como referência para os experimentos futuros.

Na Figura 17b, verifica-se que a intensidade de fluorescência permaneceu praticamente inalterado, indicando que, mesmo com exposição à radiação de forma contínua o complexo entre a base de Schiff e os íons Al(III) nas condições otimizadas não sofreu mudanças fotoquímicas significativas a ponto de alterar sua intensidade de fluorescência.

4.11 Determinação da constante de ligação e figuras de mérito

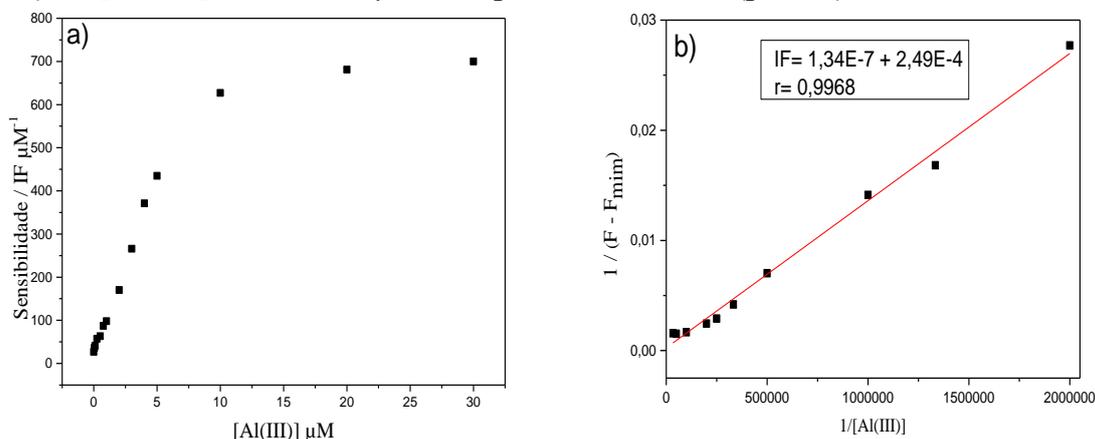
A constante de ligação para o complexo formado, foi calculado a partir da equação de Benesi-Hildebrand (ZHOU et al., 2015) representada abaixo:

$$\frac{1}{F - F_{min}} = \frac{1}{K(F_{max} - F_{min})[Al^{3+}]} + \frac{1}{F_{max} - F_{min}} \quad (\text{eq. 5})$$

onde F_{min} , F e F_{max} representam as intensidades de emissão da sonda na ausência de íon de alumínio (branco analítico), em uma dada concentração intermediária de íons alumínio e em

uma concentração de interação completa (saturação), respectivamente; e K é a constante de ligação. A partir da linearização do gráfico $1/[Al(III)]$ vs $1/(F_{max} - F_{min})$. A Figura 18 apresenta os resultados para a determinação da constante de ligação.

Figura 18. a) Curva de titulação fluorimétrica analítica e b) Linearização da equação de Benesi-Hildebrand para a determinação da constante de ligação (K). Condições: $[3A8] = 40 \mu M$, $[Al(III)] = 0,05 - 40 \mu M$, tampão MES 25 mM (pH 5,5) e $\lambda_{ex} = 400$ nm.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Por meio da equação de Benesi-Hildebrand, foi possível estabelecer o valor da constante de ligação igual a $7,4 \times 10^6 M^{-1}$. A constante de ligação estabelecida para essa metodologia demonstra que a formação do complexo sonda-Al(III) é favorecida e foi um valor dentro da faixa de valores encontrados na literatura, $6,62 \times 10^3 M^{-1}$ (GUPTA; JAIN; SHOORA, 2015), $2,67 \times 10^6 M^{-1}$ (ZHOU et al., 2015) e $8,72 \times 10^6$ (LI et al., 2015).

Após a otimização de todos os parâmetros relativos ao desenvolvimento da metodologia para determinação de alumínio, foram estabelecidas as figuras de mérito do método. Para tanto, foram determinados os limites de detecção (LOD), o desvio padrão relativo (RSD) considerando níveis de concentração nos extremos da curva analítica, visto que essas regiões apresentam os maiores erros instrumentais. Os parâmetros relacionados às figuras de mérito do método proposto nas condições otimizadas são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Figuras de mérito estabelecido para o método proposto.

Parâmetros	Valores	
	Slit 3;5	Slit 5;5
Curva analítica	IF = 212(±4) $C_{Al(III)}$ + 22,6 (±7,4)	IF = 452(±32) $C_{Al(III)}$ + 75,7 (±20)
Faixa linear ($n = 12$)	0,1 - 4,0 μ M (2,70 - 108 μ g L ⁻¹)	0,01 - 2,0 μ M (0,27 - 54 μ g L ⁻¹)
Coeficiente de correlação (r)	0,9980	0,9960
LOD ($n = 10$)	0,017 μ M (0,45 μ g L ⁻¹)	0,003 μ M (0,08 μ g L ⁻¹)
RSD ($n = 10$)	< 3,6%	< 3,5%

Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Para os estudos posteriores, as condições estabelecidas na Tabela 2 foram utilizadas, visto que, nessas condições, o método encontra-se com todos os parâmetros relacionados com a maior sensibilidade.

4.12 Avaliação dos possíveis interferentes

Nessa etapa do trabalho, foram avaliadas as espécies que pudesse atuar como possíveis interferentes e influenciar na exatidão do método. Assim, foram avaliadas os seguintes cátions e ânions: Na⁺, K⁺, Mg(II), Sr(II), Ba(II), Ca(II), Zn(II), Ni(II), Mn(II), Cu(II), Fe(II), Fe(III), Cr(III), Cr(VI), Pb(II), Cd(II), Hg(II), As(III), As(V), F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻, HSO₃⁻, H₂PO₄⁻, SiO₃²⁻, B₄O₇²⁻, SO₄²⁻ e NO₃⁻. Essas espécies foram selecionadas por estarem presentes nas amostras de água e muitas destas estarem presentes como eletrólitos em meio biológico, onde pretende-se aplicar o método desenvolvido.

Inicialmente foi avaliado excesso de 20 vezes de cada espécie (a 40 μ M) em relação a concentração molar de íons Al(III) (2 μ M). Como critério para indicar que a espécie não influenciou na complexação da sonda-Al(III) se considerou uma variação máxima \pm 5% em relação a intensidade do sinal de fluorescência na condição sem o interferente. Assim para a condição inicialmente proposta nas condições otimizadas as seguintes espécies não foram consideradas interferentes: Na⁺, K⁺, Mg(II), Sr(II), Ba(II), Ca(II), Zn(II), Ni(II), Mn(II), As(III), SO₃²⁻, H₂PO₄⁻, SiO₃²⁻, SO₄²⁻, NO₃⁻, Br⁻, Cl⁻ e I⁻. A Tabela 5 apresenta as demais espécies que não interferem em menores níveis de concentração.

Tabela 5. Dados referentes ao estudo das espécies interferentes no método.

Espécie	Concentração tolerada (μM)	Erro (%)	Proporção Al(III):interferente
As(V)	35	+ 0,6	17,5
B ₄ O ₇ ²⁻	10	+3,18	5
F ⁻	2,5	+0,30	1,25
Fe(II)	10	-4,45	5,0
Fe(III)	10	-1,59	5,0
Cr(III)	2,5	+1,98	1,25
Cr(VI)	2,5	-1,93	1,25
Pb(II)	0,5	-6,77	0,25
Cd(II)	1,0	-4,84	0,50
Hg(II)	2,0	-0,64	1,0
Cu(II)	10	+1,27	5,0

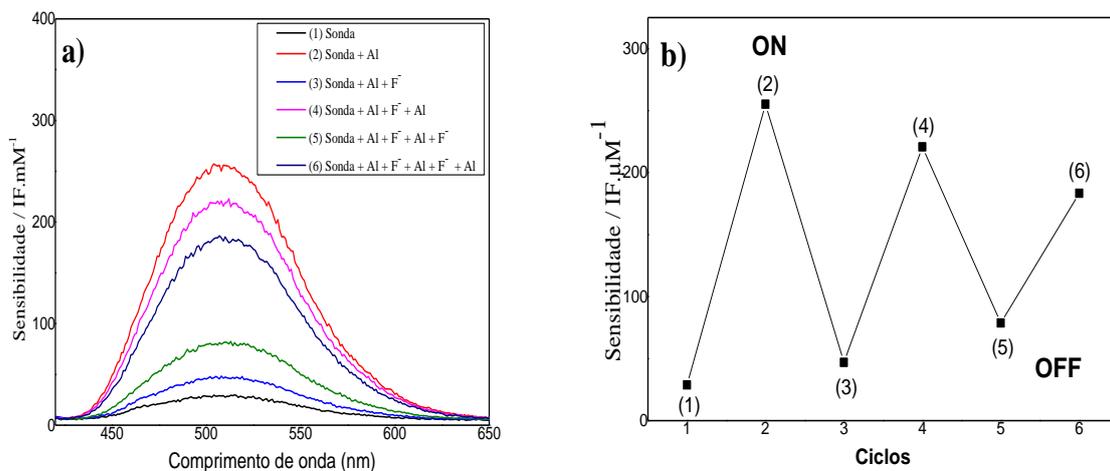
Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Sendo assim, por meio da Tabela 5 é possível observar que algumas espécies são menos tolerantes ao método, como: Pb(II), Cd(II), Hg(II) e F⁻, respectivamente. Para os cátions Pb(II), Cd(II) e Hg(II) deve ocorrer competição entre os sítios de complexação da sonda com as espécies interferentes. Contudo, as concentrações desses íons nas amostras de água e meio biológico são menores que as concentrações avaliadas. O fluoreto, devido a sua elevada constante de afinidade com os íons Al(III) ($K(\text{AlF}_6^{3-}) = 2,5 \times 10^4$ e $K(\text{AlF}_4^-) = 2,0 \times 10^8$) foi uma das espécies que apresentou elevada interferência.

4.13 Avaliação da reversibilidade da sonda

Para que uma sonda possa ser classificada como sensor (ou quimiossensor), além da seletividade e sensibilidade a espécie de interesse, deve apresentar resposta reversível (GHORAI et al., 2015). Para desenvolver um sensor fluorescente, a reversibilidade da sonda foi realizada em meio aquoso adicionando Al(III) e F⁻. Assim, a reversibilidade foi avaliada medido a fluorescência do sistema, contendo 40 μM da sonda em tampão MES (25 mM, pH 5,5) e diferentes incrementos de 3 μM de Al(III) e 3 μM de F⁻. Na figura 19 são mostrados os resultados do estudo de reversibilidade.

Figura 19. Avaliação da reversibilidade da sonda (40 μM) a partir de adições subsequentes de Al(III) (3 μM) e de F^- (3 μM). a) Espectros de emissão de fluorescência e b) Ciclos de reversibilidade da sonda.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

A partir dos resultados mostrados na Figura 19, observa-se que a sonda apresentou aumento significativo de fluorescência na presença de íons Al(III), no entanto, a adição de F^- na mistura sonda + Al(III) resultou na diminuição da intensidade de fluorescência. Em sequência, observa-se um sinal relativo a regeneração da sonda livre, e após adição de nova alíquota contendo de íons Al(III) a intensidade de fluorescência aumentou novamente (Fig. 20b). Esses resultados demonstram que a sonda apresenta comportamento reversível e pode ser aplicável para determinação e reconhecimento de íons Al(III) em muitos campos.

4.14 Aplicação do método em amostras reais

Após otimização de todos os parâmetros e estabelecimento das principais figuras de mérito, o método proposto foi avaliado em amostra de água de diálise de diferentes hospitais de Maceió, além de água mineral e água potável, com intuito de determinar a concentração de íons Al(III). Os resultados referentes às amostras de água de diálise (Hospital Universitário da UFAL, Hospital do coração e hospital Sanatório), água mineral e água potável são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Determinação de Al(III) em diferentes amostras de água.

Amostra	Local	Concentração (μM)	Legislação
Água de diálise	HU/ UFAL	$0,69 \pm 0,04$	$0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ($0,37 \mu\text{M}$)*
	Hospital do coração	$0,60 \pm 0,04$	
	Hospital Sanatório	$0,70 \pm 0,10$	
Água mineral	Comércio de Maceió (marca Itagy)	$0,13 \pm 0,01$	$0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ($3,7 \mu\text{M}$)**
Água potável	IQB / UFAL	$0,78 \pm 0,1$	

*Resolução ANVISA nº 1469 de 2000; **Resolução CONAMA 357/2005 (águas doces para as classes 1 e 2)

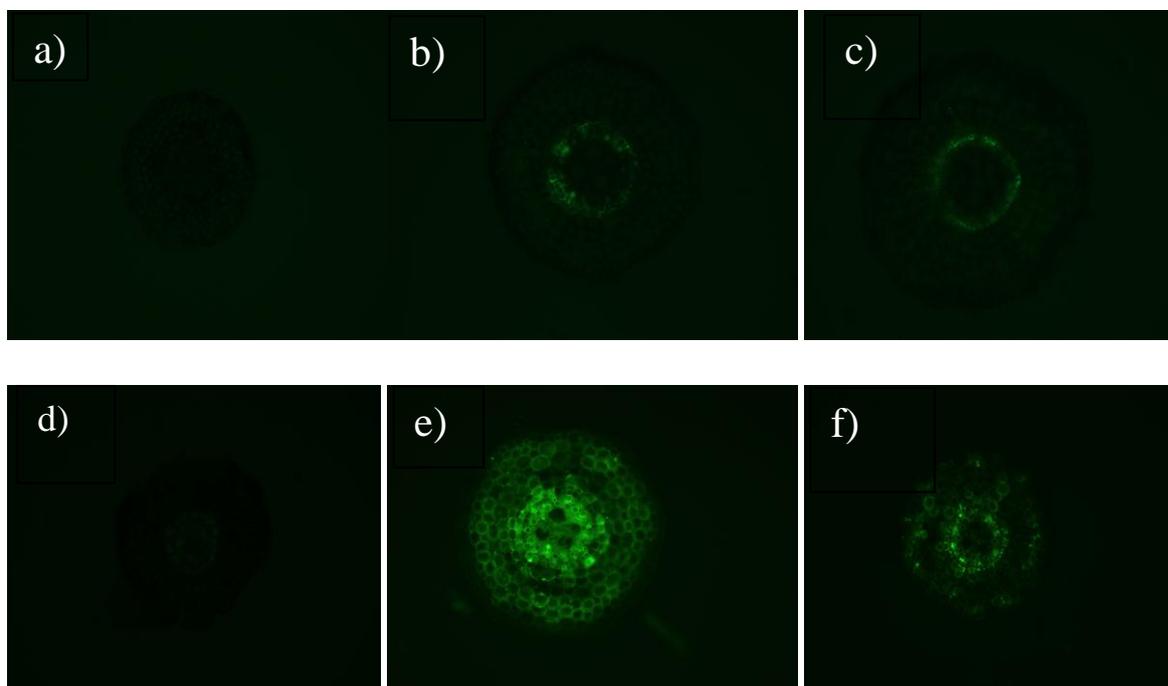
Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

A partir dos dados apresentados na Tabela 6, a determinação de alumínio em amostra de água de diálise, água mineral e água potável foram possíveis de ser realizadas utilizando o método de adição de padrão. Por fim, a concentração determinada de Al(III) nas referidas amostras encontram-se acima do valor de referência estabelecido pela ANVISA e pelo CONAMA.

4.15 Aplicação do método na marcação de alumínio em células vegetais

As raízes de milho submetidas a qualquer tratamento não apresentaram autofluorescência. Raízes submetidas ao tratamento controle apenas com Ca(II) $200 \mu\text{M}$ em pH 4,0 não apresentaram fluorescência após incubação com a sonda 3A8 $40 \mu\text{M}$. As raízes submetidas ao tratamento com Al(III) $20 \mu\text{M}$ ou $100 \mu\text{M}$ em Ca(II) $200 \mu\text{M}$ e incubadas com 3A8 apresentaram fluorescência na endoderme. Em alguns casos, observa-se fluorescência também em algumas células do córtex e cilindro vascular. Por isso pode-se inferir que a endoderme funciona como barreira física que dificultaria a translocação de Al(III) para a parte aérea. Na Figura 20 são mostrados os resultados para a marcação fluorescente da sonda 3A8 e lumogallion em raízes de milho previamente tratadas com alumínio.

Figura 20. Imagens fluorescente de raízes de milho tratados com a sonda 3A8 80 μ M e lumogallion 80 μ M em diferentes concentrações de alumínio (a= 0 μ M, b =20 μ M e c= 100 μ M) e (d= 0 μ M, e= 20 μ M e f= 100 μ M) Usando microscópio de fluorescência Leica DFT 7000T, utilizando filtro FITC (λ_{ex} = 450-490 nm (azul)) e (λ_{ex} = 515 nm (azul)) (amarelo/verde).



Fonte: Raquel Faria (UFMG), 2017.

Raízes de milho submetidas a qualquer tratamento não apresentaram autofluorescência. Raízes submetidas ao tratamento controle apenas com Ca(II) 200 μ M em pH 4,0 não apresentaram fluorescência após incubação com Lumogallion ou 3A8.

Raízes submetidas ao tratamento com Al(III) 20 μ M ou 100 μ M em Ca(II) 200 μ M e incubadas com 3A8 apresentaram fluorescência na endoderme. Em alguns casos, observa-se fluorescência também em algumas células do córtex e cilindro vascular. Por isso pode-se inferir que a endoderme funciona como barreira física que dificultaria a translocação de Al para a parte aérea.

A incubação das raízes submetidas ao tratamento com Al(III) 20 μ M ou 100 μ M em Ca²⁺ 200 μ M com Lumogallion mostrou fluorescência na endoderme e cilindro vascular, neste último, especialmente nos núcleos de suas células. Apesar de a localização da marcação fluorescente ter sido a mesma quando as raízes foram submetidas aos tratamentos com 20 ou 100 μ M de Al(III), houve menor fluorescência no tratamento com maior concentração de Al(III) (100 μ M) com ambos os compostos fluorescentes. Possivelmente as plantas de milho ativam outros mecanismos de tolerância ou exclusão do Al³⁺ e menor quantidade de Al chega, então, à endoderme.

Ambos os compostos marcam a presença de alumínio, porém houve fluorescência mais intensa nos cortes incubados com Lumogallion. Também houve diferença na localização do Al(III) localizado por ambos os compostos nos tecidos vegetais frescos. Cortes incubados com Lumogallion apresentaram maior extensão de tecidos marcados, quando comparados com os cortes incubados com 3A8, visto que além da endoderme, ainda apresentaram forte marcação do cilindro vascular.

Essas diferenças entre as marcações dos compostos levam a três hipóteses que justificariam a menor intensidade e extensão da fluorescência do 3A8:

1. O composto 3A8 é mais específico que o Lumogallion, pois marca apenas o local onde há real deposição ou acúmulo de Al(III) em tecidos vegetais.
2. O composto Lumogallion é mais eficiente que o 3A8 em identificar deposição ou acúmulo de Al(III) em tecidos vegetais.
3. Possivelmente, o composto Lumogallion é mais solúvel em água quando comparado com a sonda 3A8.

5 CONCLUSÕES

Para o desenvolvimento dessa metodologia, foi escolhido o composto 3A8, por apresentar características intermediárias entre os sete compostos avaliados. Não foi possível desenvolver um método colorimétrico, por isso, a técnica empregada no desenvolvimento do trabalho foi a técnica de espectrofluorimetria. Diante disso, observou-se que o perfil espectral por fluorescência molecular entre a sonda, aumentava com incrementos de Al(III) utilizando o slit 3/5.

A metodologia apresentou maior sensibilidade foi em meio aquoso, sendo tolerado até, cerca de 20% de acetona sem apresentar perda de sensibilidade. Já na etapa de otimização de parâmetros químicos, o pH do meio foi avaliado na faixa de pH = 4,5 a 7,5, demonstrando a maior sensibilidade para o pH = 5,5, e soluções tampão com máxima capacidade tamponante para esse pH, sendo escolhido o tampão MES a 25 mM, pois apresentou a maior sensibilidade, sendo então, esta considerada a melhor condição.

Pelos estudos da força iônica do meio (0 – 300 mM de NaCl) constatou-se que o aumento da concentração desses íons provoca diminuição na sensibilidade do método. Por outro lado, nos estudos da concentração do ligante (Base de Schiff), a concentração que apresentou maior sensibilidade foi 40 μM , sendo essa concentração utilizada nos estudos posteriores.

A estequiometria foi determinada pelo método de Job, por cálculos teóricos e por Ressonância Magnética nuclear, obtendo as seguintes proporções sonda- Al(III), 3:1. Nas condições otimizadas, foi realizada análise cinética sendo possível inferir que a reação sonda- Al(III) é alcança um patamar em cerca de 45 minutos de reação. Já na análise de estabilidade o complexo sonda- Al(III) permanece praticamente estável.

A constante de ligação foi estabelecida em $7,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ pela equação de Benesi-Hildebrand. As figuras de mérito foram calculadas e os valores encontrados foram: faixa linear foi de 0,1-4,0 μM (equivalente a 2,7-108 $\mu\text{g L}^{-1}$), LOD = 0,017 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (0,45 $\mu\text{g L}^{-1}$) e RSD < 3,5% com o slit 3:5 e 0,01-2,0 μM (equivalente a 0,27-54 $\mu\text{g L}^{-1}$) LOD = 0,003 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (0,08 $\mu\text{g L}^{-1}$) e RSD < 3,5% com o slit 5:5.

Através dos resultados observados para possíveis interferentes, constatou - se que a maioria das espécies avaliadas não causaram variação no sinal de fluorescência maior que 5% em relação à referência, apenas: Cr(III), Cr(VI), Pb(II), Cd(II), Hg(II) e F^{-1} . Os íons fluoreto foram utilizados no ensaio de reversibilidade da sonda. E verificou-se que a sonda 3A8 responde reversivelmente a alumínio, pode ser utilizada como um sensor.

A metodologia foi aplicada na determinação de alumínio em água de dialise, água mineral e água potável, obtendo concentrações abaixo do estabelecido na legislação vigente. Por fim, o método desenvolvido foi aplicado na marcação de Al(III) em raízes de milho e partes específicas comparado com lumogallion.

REFERÊNCIAS

AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA – ANVISA 2000. Resolução ANVISA nº 1469, disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents> >. Acessado em **22/08/2017**.

AL-KINDY, S. M. Z. AL-MAFRIGI, M.S.; SHONGWE, F.O. Suliman, Spectrofluorimetric determination of aluminum using 2-hydroxy-1-naphthylidene-(8-aminoquinoline), **Luminescence**. V. 26, p.462–470, 2011.

AL-KINDY, S. M. Z. et al. **ScienceDirect** Spectrofluorimetric determination of aluminium in water samples using N-((2-hydroxynaphthalen-1-yl)methylene) acetylhydrazide. **Journal of Taibah University for Science**. Omã, v. 9, p. 601–609, 2015.

ANTONIO NOLLA, A.; ANGHINONI, I. Atividade e especiação química na solução afetadas pela adição de fósforo em latossolo sob plantio direto em diferentes condições de acidez. **R. Bras. Ci. Solo**. Brasil, v. 30, p. 955-963, 2006.

AOKI, I. et al. Substituent-group effects on the fluorescence of aluminum-Schiff base complexes and their application to the determination of aluminum. **Bull Chem Soc Jpn**, v. 62(7), p. 2369-2374, Jul. 1989.

BONACCHI, S., et al. Luminescent Silica Nanoparticles: Extending the Frontiers of BRIGHTNESS. **Angew. Chem. Int. Ed.** Italia, v. 50, p. 4056 – 4066, 2011.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA 2005. Resolução Conama nº 357, disponível em: < <http://www.mma.gov.br/Conama> >. Acessado em **25/08/2017**.

DESTANDAU, E.; ALAIN, V.; BARDEZ, E. Chromotropic acid, a fluorogenic chelating agent for aluminium (III). **Anal Bioanal Chem**. V. 378, p.402–410. 2004.

DING, W. et al. A turn-on fluorescence chemosensor for Al³⁺, F⁻ and CN⁻ ions, and its application in cell imaging. **Sensors and Actuators B**. China, v. 209, p. 359–367, 2015.

ERDEMIR, S.; MALKONDU, M. A simple triazole-based “turn on” fluorescent sensor for Al³⁺ ion in MeCN–H₂O and F⁻ ion in MeCN. **Journal of Luminescence**. Turquia, v. 158, p. 401–406, out. 2015.

- FAN, L., et al. A chromone Schiff-base as Al(III) selective fluorescent and colorimetric chemosensor. **Journal of Luminescence**, China, v. 155, p. 84–88, nov. 2014.
- FAN, L., et al. 4-(8-Hydroxyquinolin-7'-yl)methyleneimino-1-phenyl-2,3-dimethyl-5-pyazole as a fluorescent chemosensor for aluminum ion in acid aqueous medium. **Sensors and Actuators B**. China, v. 205, p. 249–254, Set. 2014.
- GHORAI, A., et al. A reversible fluorescent-colorimetric imino-pyridyl bis-Schiff base sensor for expeditious detection of Al^{3+} and HSO_3^- in aqueous media. **Dalton Trans.** India, v. 44, p. 13261–13271, Jun. 2015.
- GUILBAULT, G.G. 1990. Practical Fluorescence, Second Edition, Marcel Dekker, Inc., New York.
- GUNDUZ, S. B., et al. Spectrofluorimetric determination of trace aluminum in diluted hemodialysis solutions. **Spectrochimica Acta Part A**. Turquia. V. 61, p. 913–921, 2005.
- GUNDUZ, S. B.; MALTAS, E.; YILDIZ, S. Fluorimetric analysis of aluminum in diluted hemodialysis solutions by using a novel Schiff base. **Analytical Letters**, Turquia, v. 43, p. 2892–2904, out. 2009.
- GUO, Y., et al. An “OFF- ON” fluorescent chemosensor for highly selective and sensitive detection of Al (III) in aqueous solution. **Dyes and Pigments**, China, v. 99, p. 693 – 698, jul. 2013.
- GUPTA, V. K., et al. A highly selective colorimetric and turn-on fluorescent chemosensor based on 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol for the detection of aluminium(III) ions. **Sensors and Actuators B**, India, v. 209, p. 15–24, nov. 2014.
- GUPTA, V. K.; JAIN, A. K.; SHOORA, S. K. New “on-off” optical probe based on Schiff base responding to Al^{3+} ions: Logic gate application. **Sensors and Actuators B**. India, v. 219, p. 218–231, May. 2015.
- GUPTA, V. K.; SINGH, A. K.; KUMAWAT, L. K.. Thiazole Schiff base turn-on fluorescent chemosensor for Al^{3+} ion. **Sensors and Actuators B**. India, v.195, p. 98–108, Dec. 2014.
- GUPTA, V. K.; SINGH, A. K.; MERGU, N. Antipyrine based Schiff bases as Turn-on Fluorescent sensors for Al(III) ion. **Electrochimica Acta**, India, v. 117, p. 405– 412, dez., 2013.

HARRIS, DANIEL C., *Análise Química Quantitativa*, 6ª Edição, LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro-RJ, 2005.

HUANG, J. et al. An Estimation of Hybrid Quantum Mechanical Molecular Mechanical (QM/MM) Polarization Energies for Small Molecules Using Polarizable Force-Field Approaches. **Journal of Chemical Theory and Computation**. United States, p. 1 -48, Jan, 2017.

HULANICKI, A.; GLAB, S.; INGMAN, F. Chemical sensors: definitions and classification, **Pure Appl. Chem.** v. 63, p. 1247-1250, 1991.

HUNG, P. et al. A selective colorimetric and ratiometric fluorescent chemosensor for detection of Al³⁺ íon. **Journal of Luminescence**. Taiwam, v.158, p.371–375, oct. 2015.

HU, S., et al. A new pyrazoline-based fluorescent sensor for Al³⁺ in aqueous solution. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. China, V. 136, p. 1188–1194, out. 2015.

HWANG, I. H., et al. A highly selective and sensitive fluorescent turn-on Al³⁺ chemosensor in aqueous media and living cells: experimental and theoretical studies. **New J. Chem.** França, v. 40, p. 171—178, out. 2015.

JALI, B. R.; BARUAH, J.B. Fluorescence properties, aluminium ion selective emission changes and self-assemblies of positional isomers of 4-(hydroxyphenylthio) naphthalene-1,2-diones. **Dyes and Pigments**. India, v. 110, p. 56-66, may, 2014.

JIANG, X. et al. 8-Hydroxyquinoline-5-carbaldehyde Schiff-base as a highly selective and sensitive Al³⁺ sensor in weak acid aqueous medium. **Inorganic Chemistry Communications**. China, v. 14, p. 1224–1227, Apr. 2011.

KARA, D.; FISHER, A., HILL, S. J. Flow injection determination of aluminium by spectrofluorimetric detection after complexation with *N-o*-vanillidine–2-amino-*p*-cresol: The application to natural Waters. **Analytica chimica acta**. Turquia, v. 611, p. 62–67, 2008 .

KIM, S.D.; LEE, D. R.; KIM, J. S. Fluorescence Spectrometric determination of Aluminum(III) Ion in Water Using 4-Chloro-2-phenyliminomethylphenol. **Bull. Korean Chem. Soc. Korea.**, V. 29, No. 1. P. 245-248, may, 2008.

- KIM, S. et al. Salicylimine-Based Fluorescent Chemosensor for Aluminum Ions and Application to Bioimaging. **Inorg. Chem. Korea**, v. 51 (6), pp 3597–3602, 2012.
- KÖSE, M., et al. A novel Schiff base: Synthesis, structural characterization and comparative sensor studies for metal ion detections. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. Turquia, v. 136, p. 1388–1394, out. 2015.
- KUMAR, A. et al. Detection of copper(II) and aluminium(III) by a new bis-benzimidazole Schiff base in aqueous media via distinct routes. **RSC Advances**. India, v. 5, p. 88612, Sep, 2015.
- KUMAR, V., et al. Salicylideneimines as efficient dual channel emissive probes for Al³⁺: Harnessing ESIPT and ICT processes. **Sensors and Actuators B**, India, v. 207, p. 650–657, out. 2014.
- LI, C., et al. A Chromone - Derived Schiff-Base Ligand as Al³⁺ “Turn- on” Fluorescent Sensor: Synthesis and Spectroscopic Properties. **J Fluorescence**. China. V. 26, p. 345–353, Out. 2015c.
- LI, C., et al. Development of a simple pyrazine-derived “turn on” Al³⁺ fluorescent sensor with high selectivity and sensitivity. **Inorganica Chimica Acta**. China, v. 430, p. 91–95, Mar. 2015a.
- LI, C., et al. Study on 2 -Acetylpyrazine (pyridine-2'-acetyl) hydrazone as a fluorescent sensor for Al³⁺. **Journal of Luminescence**. China, v. 168, p. 330–333, ago. 2015b.
- LIU, C. et al. Novel optical selective chromone Schiff base chemosensor for Al³⁺ ion. **Journal of Luminescence**. China, v. 158, p. 172–175, sep. 2015.
- MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 5 ed. England: Pearson, 2005.
- PRODI, L. Luminescent chemosensors: from molecules to nanoparticles. **New J. Chem**. Italia, v. 29 , p. 20–31, Dez. 2004.
- QIN, J., et al. Fluorescent sensor for selective detection of Al³⁺ based on quinoline–coumarin conjugate. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. China, v. 133, p. 38–43, Mai. 2014.

QIN, J.; YANG, Z. Bis-Schiff base as a donor–acceptor fluorescent probe: Recognition of Al^{3+} ions in near 100% aqueous solution. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. China, v. 303–304, p. 99–104, Fev. 2015.

QIN, J.; YANG, Z.; YANG, P. Recognition of Al^{3+} based on a naphthalene-based “Off–On” chemosensor in near 100% aqueous media. **Inorganica Chimica Acta**. China, v. 432, p. 136–141, Mar. 2015.

SAHANA, A. et al. A naphthalene-based Al^{3+} selective fluorescent sensor for living cell imaging. **Organic & Biomolecular Chemistry**. India, v. 9, p. 5523, May. 2011.

SALVADOR, J. O., et al. Influência do alumínio no crescimento e na acumulação de nutrientes em mudas de goiabeira. **R. Bras. Ci. Solo**, Brasil. V. 24, p. 787-796, 2000.

SKOOG, et al. **Fundamentos de química analítica**, 8. ed. São Paulo: Cengage learning, 2006.

SHOORA, S. K., JAIN, A. K., GUPTA, V. K. A simple Schiff base based novel optical probe for aluminium (III) ions. **Sensors and Actuators B**. Africa do Sul, v. 216, p. 86–104, Abr. 2015.

SILVA, A. N. M; MARTINS, C. T. B; FERRABOLI, R; JORGETTI, V; ROMÃO Jr, J. E. Revisão/ Atualização em Diálise: Água para hemodiálise. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 18, n.2, 1996. p. 180-188.

SILVA, C. M.. et al. Studies on free radical scavenging, cancer cell antiproliferation, and calf thymus DNA interaction of Schiff bases. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**. Brasil, v. 172, p. 129–138, May, 2017.

SILVA, C. M. Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. **Journal of Advanced Research**. Brasil, V. 2, p. 1–8. 2011.

SIMOES, M. et al . Água de diálise: parâmetros físico-químicos na avaliação do desempenho das membranas de osmose reversa. **Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)**, São Paulo, v. 64, n. 2, 2005.

SINGH, D. P.; SINGH, V. P. A dihydrazone based fluorescent probe for selective determination of Al^{3+} ions. **Journal of Luminescence**. India, v. 155, p. 7–14, jun. 2014.

SUAH, F. B. M., AHMAD, M., HENG, L. Y. Highly sensitive fluorescence optode for aluminium(III) based on non-plasticized polymer inclusion membrane. **Sensors and Actuators B**. Malasia, v. 201, p. 490–495, Mai. 2014.

SUN, J. et al. Spectrofluorimetric determination of aluminum ions via complexation with luteolin in absolute ethanol. **Luminescence**. China, v. 29, p. 456–461, jul. 2014.

TANG, J. et al. A highly sensitive and selective fluorescent probe for trivalent aluminum ion based on rhodamine derivative in living cells. **Analytica Chimica Acta**. China, v. 888, p. 155-161, China, 2015.

TIAN, J. et al. A novel turn-on Schiff-base fluorescent sensor for aluminum (III) ions in living cells. **RSC Advances**. China, v. 5, p. 107012–107019, nov. 2015.

VALEUR, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Weinheim: ed. WILEY-VCH, 2002.

VASCONCELLOS, M. L. A. A. A TEORIA DE PEARSON PARA A DISCIPLINA DE QUÍMICA ORGÂNICA: UM EXERCÍCIO PRÁTICO E TEÓRICO APLICADO EM SALA DE AULA. *Quim. Nova*, Vol. 37, No. 1, 171-175, 2014.

WANG, G., et al. A highly selective fluorescent probe for Al³⁺ based on quinolone derivative. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. China, V. 150, p. 21–25, Mai. 2015.

WANG, J., et al. A small and robust Al(III)-chemosensor based on bis-Schiff base N,N0-(1,4-phenylenedimethyldiyne)bis-1,4-benzene diamine. **Inorganic Chemistry Communications**. China. V. 11, p. 203–206, Nov. 2008.

WU, H.; ZHOU, P.; WANG, J.; ZHAO, L.; DUAN, C. Dansyl-based Fluorescent Chemosensors for Selective Response of Cr (III). **New Journal of Chemistry**, v. 33, p. 653-658, 2009.

YIN, N. et al. Preparation, regulation and biological application of a Schiff base fluorescence probe. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. China, v. 153, p. 1–5, Aug, 2016.

ZHOU, D., et al. Research of a highly selective fluorescent chemosensor for aluminum(III)ions based on photoinduced electron transfer. **Journal of Molecular Structure**. China. V. 1079, p. 315–320, out. 2015.

ZIMMERMANN-DIMER, L. M.; MACHADO, V. G. Quimiossensores cromogênicos e fluorogênicos para a detecção de analitos aniônicos. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 31, n. 8, p. 2134-2146, 2008 .