INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DOS COMPLEXOS
EURÓPIO-TETRACICLINAS E SUAS APLICAÇÕES NA DETECÇÃO
DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E PERÓXIDO DE URÉIA

ANDREA NASTRI GRASSO

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção
do Grau de Mestre em Ciências na
Área de Tecnologia Nuclear –
Materiais.

Orientadora:
Profa. Dra. Lilia Coronato Courrol

SÃO PAULO
2010

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer minha orientadora Lilia C. Courrol, minha família por sempre apoiar as minhas escolhas e especialmente minha amiga Luciane S. Teixeira por tornar esta etapa mais fácil.

ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DOS COMPLEXOS EURÓPIO-TETRACICLINAS E SUAS APLICAÇÕES NA DETECÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E PERÓXIDO DE URÉIA

Andrea Nastri Grasso

RESUMO

Neste trabalho foram estudadas as propriedades espectroscópicas do íon európio trivalente complexado às componentes da família das tetraciclina, a clorotetraciclina, oxitetraciclina e metaciclina, em presença de peróxido de hidrogênio e peróxido de uréia. Para isso foram obtidos os parâmetros ópticos de absorção, emissão, tempo de vida e construídas curvas de calibração para os espectros de luminescência. Realizaram-se experimentos com compostos inorgânicos juntamente com os complexos a fim de verificar a interferência dos mesmos. Também foram realizados estudos para determinação de glicose utilizando os complexos európio-tetraciclina como biossensor. Os resultados mostram que os complexos európio-tetraciclina apresentam um espectro de emissão bem definido na região do visível e, na presença de peróxido de hidrogênio ou peróxido de uréia, há um aumento sensível na luminescência e tempo de decaimento. Assim, os complexos európio-tetraciclina estudados podem ser utilizados como biossensores para determinação dos peróxidos de hidrogênio e uréia, sendo um método realizado em temperatura ambiente, direto e de baixo custo. Um método indireto para determinação de glicose foi estudado através da adição da enzima glicose oxidase aos complexos európio-tetraciclina na presença de glicose no qual há como produto o peróxido de hidrogênio.

Palavras-Chave: európio; tetraciclina; peróxido de hidrogênio; peróxido de uréia; glicose.

SPECTROSCOPIC STUDIES OF EUROPIUM-TETRACYCLINES COMPLEXES AND THEIR APPLICATIONS IN DETECTION OF HYDROGEN PEROXIDE AND UREA PEROXIDE.

Andrea Nastri Grasso

ABSTRACT

In this work were studied the spectroscopic properties of trivalent europium ion complexed with components of tetracycline family, chlorotetracycline, oxytetracycline and metacycline, in the presence of hydrogen peroxide and urea peroxide. Optical parameters were obtained such as absorption, emission, lifetime and calibration curves were constructed for luminescence spectra. Experiments were carried out with both inorganic compounds and europium-tetracyclines complexes in order to verify possible interferences. Studies for glucose determination were also described using europium-tetracyclines complexes as biosensors. Results show that europium-tetracyclines complexes emit a narrow band in the visible region and, in the presence of hydrogen peroxide or urea peroxide there is a greater enhancement in their luminescence and lifetime. Thus, europium-tetracyclines complexes studied can be used as biosensors for hydrogen and urea peroxides determination as a low cost and room temperature method. An indirect method for glucose determination was studied by adding glucose oxidase enzyme in europium-tetracyclines complex in the presence of glucose promoting as product hydrogen peroxide.

Key-words: europium; tetracycline; hydrogen peroxide; urea peroxide; glucose.

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO.....	11
OBJETIVOS.....	13
REVISÃO DA LITERATURA.....	14
1.1 Lantanídeos.....	14
1.2 Európio.....	15
1.3 Tetraciclina.....	18
1.4 Complexo EuTC.....	19
1.5 Peróxido de Hidrogênio.....	23
1.6 Peróxido de Uréia.....	25
1.7 Glicose.....	26
MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
1.8 Reagentes e Solventes.....	30
1.9 Preparação das amostras.....	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
1.10 Estudos dos Reagentes e Complexos Európio-Tetraciclina.....	34
1.11 Determinação das curvas de calibração.....	38
1.11.1 Complexos EuTC-PH.....	39
1.11.2 Complexos EuTC-PHU.....	48
1.12 Tempo de Vida.....	54
1.13 Interferentes.....	60
1.13.1 Complexos EuTC-PH.....	60
1.13.2 Complexos EuTC-PHU.....	62
1.14 Complexos EuTC com Glicose.....	64
CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos para determinação de peróxido de hidrogênio	4,52,.....	25
Tabela 2 - Valores de glicemia para diagnóstico de diabetes melito	60.....	26
Tabela 3- Amostras do complexo európio tetraciclinas.....		31
Tabela 4 - Valores de referência dos componentes inorgânicos estudados.....		32
Tabela 5 – Deslocamento dos picos de absorção e emissão dos complexos EuOTc, EuCTc e EuMTc.....		38
Tabela 6 - Razões molares do EuTC na presença de PH que obtiveram emissão com maior intensidade.....		41
Tabela 7 - Razão molar do EuTC na presença de PHU que obteve emissão com maior intensidade.....		49
Tabela 8 - Razão Molar das amostras de EuTC para estudo de tempo de vida..		55
Tabela 9 – Parâmetros da dupla exponencial e tempo de vida dos complexos EuTc, EuTc-PH e EuTc-PHU.....		56
Tabela 10 - Parâmetros da dupla exponencial e tempo de vida dos complexos EuOTc, EuOTc-PH e EuOTc-PHU.....		57
Tabela 11 - Parâmetros da dupla exponencial e tempo de vida dos complexos EuCTc, EuCTc-PH e EuCTc-PHU.....		58
Tabela 12- Parâmetros da dupla exponencial e tempo de vida dos complexos EuMTc, EuMTc-PH e EuMTc-PHU.....		59
Tabela 13 – Parâmetros da dupla exponencial e tempo de vida do complexo EuTc com diferentes concentrações de Glicose acrescidas de Gox.....		69
Tabela 14 - Parâmetros da dupla exponencial e tempo de vida do complexo EuCTc com diferentes concentrações de Glicose acrescidas de Gox.....		70
Tabela 15 - Parâmetros da dupla exponencial e tempo de vida do complexo EuOTc com diferentes concentrações de Glicose acrescidas de Gox.....		71
Tabela 16 – Resumo dos resultados obtidos nos estudos com peróxido de hidrogênio e peróxido de uréia.....		72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama de energia do Európio	16
Figura 2 – Estrutura química das tetraciclinas	18
Figura 3 - Mecanismo de emissão de fluorescência de complexos de Eu^{3+} , sendo S_0 , S_1 e T_1 estado singlete fundamental, estado singlete excitado, e estado tripleto, respectivamente	21
Figura 4 - Proposta de estrutura para o complexo Eu-Tc	23
Figura 5 – Espectrofotômetro Fluorolog 3	29
Figura 6 – Estrutura do ácido propanosulfônico 3-(N-morfolino) ou MOPS	34
Figura 7 - Espectro de absorção óptica do tampão MOPS, íon európio em solução MOPS, solução-mãe PH e solução-mãe PHU	34
Figura 8 - Espectro de absorção óptica: (a) complexo EuOTc e OTc , (b) complexo EuCTc e CTc , (c) complexo EuMTc e MTc	35
Figura 9 - (a) Espectro de emissão óptica das soluções de OTc e do íon európio. (b) Emissão óptica do complexo EuOTc em diversas razões molares	36
Figura 10 - (a) Espectro de emissão óptica da solução CTc . (b) Emissão óptica do complexo EuCTc em diversas razões molares	37
Figura 11 - (a) Espectro de emissão óptica da solução MTc . (b) Emissão óptica do complexo EuMTc em diversas razões molares	37
Figura 12 - Espectro de absorção óptica dos complexos (a) EuOTc , (b) EuCTc , (c) EuMTc , em diferentes concentrações molares, com e sem PH	40
Figura 13 - Espectro de emissão dos complexos: (a) EuOTc-PH , (b) EuCTc-PH , (c) EuMTc-PH , em diferentes concentrações molares EuTC	41
Figura 14 – (a) Espectro de emissão (b) e curva de calibração do complexo $3\text{Eu}:1\text{Tc-PH}$	43
Figura 15 – (a) Espectro de emissão e (b) curva de calibração complexo $4\text{Eu}:1\text{CTc-PH}$	44
Figura 16 - (a) Espectro de emissão e (b) curva de calibração do complexo $4\text{Eu}:1\text{OTc-PH}$	46
Figura 17 - (a) Espectro de emissão e (b) curva de calibração do complexo $2\text{Eu}:1\text{MTc-PH}$	47
Figura 18 - Espectro de absorção óptica dos complexos (a) EuOTc , (b) EuCTc , (c) EuMTc , em diferentes concentrações molares sem PHU e com PHU	48
Figura 19 - Espectro de emissão dos complexos (a) EuOTc-PHU , (b) EuCTc-PHU , (c) EuMTc-PHU , em diferentes concentrações molares de EuTC	49

Figura 20 - (a) Espectro de emissão e (b) curva de calibração do complexo 3Eu:1Tc-PHU.....	50
Figura 21 - (a) Espectro de emissão e (b) curva de calibração do complexo 4Eu:1OTc-PHU.....	51
Figura 22 - (a) Espectro de emissão e (b) curva de calibração do complexo 3,5Eu:1CTc-PHU.....	52
Figura 23 - (a) Espectro de emissão e (b) curva de calibração do complexo 1,5Eu:1MTc-PHU.....	53
Figura 24 – Tempo de vida dos complexos EuTc, EuTc-PH e EuTc-PHU.....	56
Figura 25 - Tempo de vida dos complexos EuOTc, EuOTc-PH e EuOTc-PHU....	57
Figura 26 - Tempo de vida dos complexos EuCTc, (a) EuCTc-PHU e (b)EuCTc-PH.....	58
Figura 27 - Tempo de vida dos complexos EuMTc, (a) EuMTc-PH e (b) EuMTc-PHU.....	59
Figura 28 - Comparação da intensidade de emissão entre o os sinais dos complexos EuTc, EuTc-PH e dos complexos EuTc-PH na presença de interferentes.....	61
Figura 29 - Comparação da intensidade de emissão entre o os sinais dos complexos EuOTc, EuOTc-PH e dos complexos EuOTc-PH na presença de interferentes.....	61
Figura 30 - Comparação da intensidade de emissão entre o os sinais dos complexos EuCTc, EuCTc-PH e dos complexos EuCTc-PH na presença de interferentes.....	62
Figura 31 - Comparação da intensidade de emissão entre o os sinais dos complexos EuTc, EuTc-PHU e dos complexos EuTc-PHU na presença de interferentes.....	63
Figura 32 - Comparação da intensidade de emissão entre o os sinais dos complexos EuOTc, EuOTc-PHU e dos complexos EuOTc-PHU na presença de interferentes.....	63
Figura 33 - Comparação da intensidade de emissão entre o os sinais dos complexos EuCTc, EuCTc-PHU e dos complexos EuCTc-PHU na presença de interferentes.....	64
Figura 34 - Emissão dos complexos EuOTc e EuCTc, acrescidos de glicose nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/dL.....	64
Figura 35 - Emissão e curva de calibração dos complexos EuTc-Glicose-Gox, variando a concentração de glicose nas amostras. Excitação em 400 nm.....	66
Figura 36 - Emissão e curva de calibração dos complexos EuOTc-Glicose-Gox, variando a concentração de glicose nas amostras. Excitação em 390 nm.....	67
Figura 37 - Emissão e curva de calibração dos complexos EuCTc-Glicose-Gox, variando a concentração de glicose nas amostras. Excitação em 390 nm.....	68

Figura 38 – Tempo de vida do complexo EuTc com diferentes concentrações de Glicose acrescidas de Gox.....	69
Figura 39 - Tempo de vida do complexo EuCTc com diferentes concentrações de Glicose acrescidas de Gox.....	70
Figura 40 - Tempo de vida do complexo EuOTc com diferentes concentrações de Glicose acrescidas de Gox.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

Eu	Európio
EuCTc	Complexo Európio-Clorotetraciclina
EuMTc	Complexo Európio-Metaciclina
EuOTc	Complexo Európio-Oxitetraciclina
EuTC	Complexo Európio e um componente da família da Tetraciclina
EuTc	Complexo Európio-Tetraciclina
Gox	Glicose Oxidase
MOPS	Ácido propanosulfônico 3-(N-morfolino)
MTc	Metaciclina
OTc	Oxitetraciclina
PH	Peróxido de Hidrogênio
PHU	Peróxido de Uréia
pH	Potencial Higrogeniônico
Tc	Tetraciclina

INTRODUÇÃO

As propriedades ópticas de complexos de íons lantanídeos vem sendo estudadas desde 1941, sendo íon európio um dos lantanídeos de maior interesse¹.

A emissão por excitação direta do íon európio é pouco eficiente. Porém quando ligado a outras moléculas, há a formação de um *complexo* cuja luminescência torna-se mais intensa e a banda de emissão mantém-se bem definida, característica dos íons lantanídeos. Este fenômeno chama-se “efeito antena”, onde o ligante absorve a radiação incidente transferindo-a para o íon európio (transferência de energia intramolecular). Como resultado ocorre um aumento da luminescência, grande deslocamento Stokes (ampla banda de absorção, com pico em torno de 400 nm e emissão em torno de 615 nm) e o aumento no tempo de decaimento².

As tetraciclinas são uma família de antibióticos extensivamente utilizados com amplo espectro de ação. São fortes agentes quelantes, complexando-se facilmente com íons metálicos, como o íon európio³.

A emissão do complexo európio-tetraciclina (EuTC) é fortemente dependente das características da solução, tais como presença ou ausência de peróxido de hidrogênio e peróxido de uréia.

O peróxido de hidrogênio (PH) é um poderoso oxidante, vastamente utilizado em indústrias especialmente para clareamento, limpeza e desinfecção podendo ser liberado no meio ambiente, logo a importância da sua detecção. Além disso, é produto de diversas reações metabólicas do nosso organismo possibilitando a detecção indireta dos seus produtos⁴. Já o peróxido de uréia é um agente citotóxico e seu aumento no organismo está relacionado à problemas renais⁵.

Na presença de peróxido de hidrogênio, o complexo EuTC fluorescente, se transforma no complexo EuTC-PH altamente fluorescente. Com adição de pequenas quantidades de peróxido de hidrogênio ocorre um aumento de até 15 vezes na intensidade da banda de emissão do európio em torno de 615 nm, em solução com pH neutro. O tempo de vida do európio no complexo EuTC-PH aumenta para ~60

microssegundos decorrente de uma redução da supressão da luminescência por transferência de energia intramolecular ⁶. Efeitos semelhantes ocorrem na formação de complexos EuTC com peróxido de uréia⁷.

Tais características proporcionam às medidas de emissão e tempo de vida, alta sensibilidade, alta sensibilidade e especificidade na detecção de peróxido de hidrogênio, peróxido de uréia e glicose, este substrato de reações catalisadas por oxidases produzindo PH. O complexo EuTc é de fácil síntese, opera em pH neutro, apresenta alta estabilidade e baixo custo. É frequentemente estudado devido ao seu alto potencial em aplicações nas áreas da biomedicina, indústria e meio ambiente⁶.

Neste trabalho estudamos alguns dos componentes da família da tetraciclina (oxitetraciclina, clorotetraciclina e metaciclina) na formação do complexo com o íon európio, assim como estes complexos em presença do peróxido de hidrogênio e peróxido de uréia.

OBJETIVOS

Caracterização e estudo espectroscópico dos complexos európio-clorotetraciclina, európio-metaciclina e európio-oxitetraciclina na presença de peróxido de hidrogênio (EuTC-PH) e peróxido de uréia (EuTC-PHU). Obtenção dos espectros de emissão e curvas de tempo de vida do európio em função do aumento de concentração dos peróxidos. Obtenção das curvas de calibração. Estudos de interferentes inorgânicos. Estudo de detecção de glicose. Verificação da possibilidade de utilização dos complexos como biossensores de peróxido de hidrogênio, peróxido de uréia e glicose.

REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Lantanídeos

A série do lantânio é formada por um conjunto de 15 elementos químicos com números atômicos de 57 (lantânio) ao 71 (lutécio). Os lantanídeos correspondem aos elementos da série que contém elétrons na camada 4f, ou seja, do cério ao lutécio. Juntamente com o escândio (Sc) e ítrio (Y) são conhecidos como terras raras e possuem propriedades físicas e químicas muito semelhantes. Apesar da denominação “raras”, estes elementos não são incomuns, exceto pelo promécio que não ocorre na natureza. O túlio que é o elemento menos abundante na crosta terrestre é encontrado mais facilmente que a prata, arsênio, mercúrio, cádmio e selênio^{8,9}.

A aplicação dos lantanídeos se estende a diversas áreas, como por exemplo, na fabricação de laser, em reações de catálise e como materiais luminescentes. Também são muito estudados em sistemas biológicos devido às suas propriedades espectroscópicas e magnéticas, sendo utilizados como traçadores biológicos e agentes de contraste em RMN (ressonância magnética nuclear)^{8,9}.

A semelhança das propriedades químicas e físicas dos lantanídeos decorre da sua configuração eletrônica. Todos os átomos neutros derivam da configuração do gás nobre xenônio (Xe) seguida do preenchimento sequencial da camada 4f. Assim, os lantanídeos possuem o orbital $6s^2$ e um preenchimento do nível 4f variável apresentando a seguinte distribuição eletrônica: $[Xe] 6s^2 4f^n 5d^{0-1}$, com n variando de 1 até 14. A camada 4f é interna, sendo blindada pelas camadas mais externas 6s e 5d¹⁰.

Os íons lantanídeos mais estáveis encontram-se no estado trivalente (3+). Neste caso há a perda de 2 dos elétrons 6s e o elétron 5d (ou um elétron 4f caso não exista elétron 5d), e a camada 4f permanece blindada pelos orbitais 5p e 5s.

Nos compostos com estes íons trivalentes a luminescência em geral, é devida às transições f-f. Os elétrons 4f são internos sendo fracamente afetados pelo campo dos ligantes, as propriedades eletrônicas são pouco afetadas pelo ambiente químico e assim as transições ópticas são geralmente muito finas. Essas transições f — f são proibidas (regra de Laporte) resultando em baixo coeficiente de absorção e taxa de emissão, logo, suas transições ópticas são geralmente caracterizadas por bandas finas de emissão e tempos de vida longos, de microssegundos a milissegundos. A variação do ambiente do íon apenas causa pequenos desdobramentos nos níveis de energia e nas intensidades relativas das bandas^{11,12}. Outro fator interessante é o grande deslocamento Stokes (deslocamento entre comprimento de onda de excitação e emissão)¹³.

O espectro de emissão dos lantanídeos trivalentes ocorre nas regiões do visível e infravermelho próximo. Por exemplo, o íon európio trivalente é um forte emissor em aproximadamente 615 nm na região do vermelho e o térbio trivalente emite na região do verde. Em nossos estudos o íon európio foi o lantanídeo escolhido.

1.2 Európio

O európio é um elemento químico de símbolo Eu, número atômico 63 e peso atômico 151,96 g. Juntamente com o térbio é dos lantanídeos que possuem maior capacidade de emissão, por isso as propriedades do íon európio são muito estudadas¹⁴.

Os níveis envolvidos nas transições radiativas são não-degenerados¹⁵. O estado emissivo de energia mais baixo, 5D_0 , é 17.250 cm^{-1} acima do estado fundamental¹⁶ (Figura 1).

Figura 1 – Diagrama de energia do Európio¹⁶.

A luminescência por excitação direta do íon európio é pouco eficiente, pois não têm absortividade molar alta. Porém, quando ligado a outras moléculas formando um *complexo*, a luminescência torna-se forte e apresenta uma banda de emissão bem definida, característica dos íons lantanídeos.

Um complexo ou composto de coordenação é formado quando um íon metálico central se combina com um grupo de moléculas vizinhas doadoras de um par de elétrons que são compartilhados entre ambas as espécies químicas. As moléculas que circundam o íon metálico são chamadas de ligantes e a quantidade de átomos ligados diretamente ao íon central é denominada número de coordenação. Nos casos em que um cátion metálico liga-se a uma molécula com duas ou mais ligações coordenadas o complexo resultante é chamado de *quelato* e o ligante referido como *agente quelante* ou *ligante polivalente*¹⁷.

Desta forma, usa-se um agente quelante para absorver a luz transferindo esta energia para o íon lantanídeo, que emite de acordo com sua luminescência

característica⁸. Este processo de transferência de energia intramolecular entre o ligante orgânico e o íon lantanídeo é conhecido como efeito antena^{12,18}.

A intensidade da luminescência dos íons lantanídeos é principalmente influenciada pela desativação não-radiativa (supressão) do estado excitado do lantanídeo e da capacidade do estado excitado tripleto do ligante transferir a energia ao nível de emissão do lantanídeo. Fatores estes que dependem da natureza do ligante e íon assim como do meio em que se encontram¹⁹.

Quando em solução, a emissão do európio pode ser inibida por grupos OH, NH e CH. O íon európio apresenta de 8 a 9 sítios de coordenação. O encapsulamento dos íons por agentes quelantes pode aumentar a luminescência e tempo de vida do complexo^{15,20}.

A luminescência e tempo de vida destes complexos em solução está diretamente relacionada com o número de moléculas de água coordenadas ao íon metálico. Devido à eficiente transferência de energia entre o nível de ressonância do íon e o grupo OH, o tempo de vida decresce linearmente conforme o aumento da quantidade de moléculas de água coordenadas³.

Em nosso trabalho utilizaremos como ligantes a oxitetraciclina, clorotetraciclina e metaciclina (compostos da família da tetraciclina) por serem fortes agentes quelantes²².

1.3 Tetraciclina

As tetraciclinas (TCs) são uma família de antibióticos descoberta no final dos anos 40. Sua estrutura básica consiste em um núcleo hidronaftaceno com 4 anéis fundidos³ (Figura 2).

Figura 2 – Estrutura química das tetraciclinas²².

Possuem ação bacteriostática em concentrações terapêuticas e amplo espectro de atividade incluindo bactérias aeróbias e anaeróbias, Gram-positivas, Gram-negativas, espiroquetas, micoplasmas, riquetsias, clamídias e alguns protozoários. Atuam inibindo a síntese protéica bacteriana devido à sua capacidade de ligação aos ribossomos microbianos impedindo a ligação da aminoacil-tRNA aos mesmos^{21,22}.

Devido ao relativo baixo custo e segurança do ponto de vista terapêutico, as tetraciclinas são extensivamente utilizadas em terapias de infecções bacterianas humanas e medicina veterinária, assim como em criadouros de animais para produção de carne, peixes e laticínios²³.

Os principais eventos adversos consistem em fototoxicidade, distúrbios gastrointestinais, reações alérgicas em indivíduos mais sensíveis, e, por serem agentes quelantes, as tetraciclinas podem se fixar ao cálcio depositando-se nos ossos e dentes em formação, provocando manchas e, em casos mais graves, hipoplasia dentária e deformidades ósseas. O uso irracional de antibióticos assim como o seu consumo em alimentos em baixas doses por um longo período de tempo pode promover e disseminar a resistência bacteriana. Assim os resíduos destes medicamentos, tetraciclinas inclusive, são rotineiramente monitorados^{24,25}.

As tetraciclinas possuem vários possíveis locais de ligação, logo, formam facilmente complexos metálicos, sendo seu mecanismo de ação nos fluidos biológicos fortemente dependente da presença de íons metálicos ²⁶. Os sítios de complexação incluem o sistema beta-dicetona (posições 11 e 12), os grupos enol (posições 1 e 3) e carboxiamida (posição 2)²².

Em nossos estudos, comparamos a oxitetraciclina, clorotetraciclina e metaciclina com a tetraciclina na formação dos complexos na presença de peróxido de hidrogênio e peróxido de uréia. Espera-se observar variação da emissão do európio, com a mudança estrutural, na formação de complexos. Isto porque a variação da estrutura acarreta em mudança de sítios de ocupação do európio. Em solução aquosa as possíveis ligações do íon európio ocorrem nos radicais OH dos anéis B e A e no nitrogênio do grupo CH₃ do anel A. A diferença entre a tetraciclina e a oxitetraciclina está no radical R₄ que é um H no caso da tetraciclina e um OH no caso da oxitetraciclina. No caso da clorotetraciclina o radical R₁ é substituído por cloro. Já na metaciclina não existe o grupo OH no radical R₃.

1.4 Complexo EuTC

As características espectroscópicas de complexos formados pelo íon európio trivalente com ligantes orgânicos são estudadas desde 1941¹¹. Desde então já era

observada a importante propriedade destes complexos em absorver radiação próximo ao ultravioleta através do ligante orgânico, a transmissão desta energia para o európio (chamada transferência de energia intramolecular) com emissão característica do lantanídeo.

Em 1961 foi proposto que este fenômeno ocorre devido ao aumento da população do estado vibracional do quelato, transferência de energia do estado tripleto para o nível 4f de menor energia do íon e transição radioativa para o estado fundamental resultando em uma banda de emissão bem delimitada^{27,28}.

Em 1982 Richardson²⁹ observou experimentalmente as propriedades espectroscópicas do íon európio trivalente concluindo que o íon metálico possuía boas características para ser utilizado como biossensor. Através da complexação do európio com um ligante orgânico observou a transferência de energia do ligante para o európio (transferência intramolecular) com aumento da luminescência.

No ano seguinte Hirschy e colegas^{2,30} estudaram a formação do complexo Európio-Tetraciclina (EuTc). Enquanto o complexo apresentava um amplo espectro de absorção, similar ao do ligante orgânico, o espectro de emissão era formado por uma banda estreita e bem definida, característica das transições 4f dos íons lantanídeos, com aumento da luminescência e tempo de vida.

Assim, no quelato a energia é absorvida através da tetraciclina e é transferida através de um efeito antena para o íon európio, que emite parte desta energia em uma banda característica do lantanídeo³¹. Os mecanismos de fluorescência do complexo EuTc são o resultado de diversos processos como mostrado na Figura 3 (diagrama de *Jablonski*).

Figura 3 - Mecanismo de emissão de fluorescência de complexos de Eu^{3+} , sendo S_0 , S_1 e T_1 estado singlete fundamental, estado singlete excitado, e estado tripleto, respectivamente⁴⁸.

Na excitação, a tetraciclina absorve a energia fornecida por uma fonte externa e é elevada do estado singlete fundamental (S_0) para qualquer um dos estados vibracionais do primeiro estado singlete excitado (S_1). Em muitos casos há um relaxamento para o estado vibracional S_1 de menor energia por conversão interna, um decaimento não radioativo. Novamente, através de um processo não radiativo de cruzamento intersistema (ISC – intersystem crossing), ocorre o decaimento de S_1 para o primeiro estado tripleto T_1 . Então ocorre a transferência de energia intramolecular do estado tripleto do ligante orgânico para o íon európio trivalente, com nível de energia mais baixo que o nível T_1 . Assim o Eu^{3+} é excitado, de onde partem múltiplas emissões provenientes das transições eletrônicas $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$ ($J = 0$,

1, 2, 3, 4) e $^5D_1 \rightarrow ^7F_J$ ($J = 1, 2, 3, 5, 6$). As transições mais intensas são $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ e $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ em torno de 610-660 nm e 585-600 nm, respectivamente ^{32,33}.

Devido à dissipação de energia durante os processos de conversão interna, conversão intersistema e transferência de energia intramolecular a energia emitida pelo lantanídeo é muito diferente da energia de excitação. Assim, há um grande deslocamento entre os espectros de absorção e emissão (deslocamento Stokes). No complexo EuTc o deslocamento é de aproximadamente 220 nm (absorção ~395 nm e emissão ~615 nm), característica que pode ser aplicada para evitar a sobreposição entre os espectros de excitação e de emissão do próprio fluoróforo ou a emissão da matriz biológica.

Outra propriedade interessante é a estreita banda de emissão. Isso acontece por causa da proteção ou blindagem dos orbitais f pelos orbitais mais elevados s e p do lantanídeo. E a intensidade de fluorescência da banda principal do complexo de lantanídeo é muito alta, embora seu rendimento quântico seja geralmente mais baixo do que aquele dos fluoróforos convencionais. A razão disso é que a energia transferida é fortemente emitida por uma banda estreita⁴⁸.

Além disso, o complexo possui um longo tempo de vida da fluorescência (~20 μ s). As transições eletrônicas f-f do lantanídeo são proibidas, conduzindo para longo tempo de vida do estado excitado³⁴. Os tempos de decaimento de complexos de lantanídeo são completamente sensíveis à natureza detalhada do ambiente do ligante, em especial ao número de moléculas de água que ocupam locais internos da coordenação. As transições proibidas f-f são refletidas também nos coeficientes baixos de excitação, o que dificulta a foto-excitação direta de seus íons, e requerendo desta forma a presença de ligantes orgânicos para a absorção da energia³⁵. Os tempos de decaimentos relativamente longos de complexos de lantanídeos facilitam a fluorometria resolvida no tempo.

Devido às propriedades citadas, existem diversas aplicações deste complexo desde a detecção de teores da própria tetraciclina^{36,37}, até detecção de peróxido de hidrogênio⁶, glicose³⁸, heparina³⁹, peróxido de uréia⁴⁰, etc.

Na Figura 4 é apresentada uma proposta da estrutura para o complexo Eu-Tc em pH neutro.

Figura 4 - Proposta de estrutura para o complexo Eu-Tc.

1.5 Peróxido de Hidrogênio

O peróxido de hidrogênio (PH), de fórmula molecular H_2O_2 e comercialmente conhecido como água oxigenada, é um potente agente oxidante o qual pode ser convertido, através de catálise, em radical hidroxila ($\bullet OH$) com reatividade inferior apenas ao flúor. É um líquido transparente, assemelhando-se à água e tem odor característico. Não é inflamável, é miscível em água em todas as proporções⁴.

É formado pela ação da luz solar na água em presença de substâncias húmicas (material orgânico dissolvido)^{41,42}.

O peróxido de hidrogênio está presente em pequenas concentrações na atmosfera e no ambiente marinho⁴³. Na atmosfera, o H_2O_2 contribui diretamente como agente oxidante para a conversão de SO_2 em H_2SO_4 - um dos maiores responsáveis pela chuva ácida – e indiretamente pela formação de radicais hidroxila, que reagem com milhares de gases atmosféricos, podendo causar danos à camada

de ozônio^{44,45}. É um composto amplamente utilizado na indústria para branqueamento, limpeza e desinfecção, sendo liberado ao meio ambiente em grandes quantidades, logo a relevância de seu monitoramento ambiental⁴⁶. Também é importante em áreas envolvendo medicamentos e alimentos⁴.

O PH é um metabólito natural de muitos organismos sendo decomposto em oxigênio molecular e água e está presente em inúmeras reações biológicas como principal produto de oxidases.

Assim, diversas substâncias de grande importância no nosso organismo - como, por exemplo, o álcool⁴⁷, a glicose⁴⁸, lactose⁴⁹ e até a atividade da catalase^{50,51} - podem ser determinadas indiretamente através da detecção do peróxido de hidrogênio resultante das reações de oxidação.

Na presença de peróxido de hidrogênio, o complexo európio-tetraciclina (EuTc) fracamente fluorescente, se transforma no complexo (EuTc-PH) que é altamente fluorescente. Este processo foi observado por Y. Rakicioglu em 1999⁵², e aplicado por A. Duerkop na detecção de peróxido de hidrogênio em águas de rios⁵³.

Com adição de pequenas quantidades de peróxido de hidrogênio ocorre um aumento de até 15 vezes da intensidade da banda de emissão do európio em torno de 615 nm em solução com pH neutro. Este aumento ocorre devido à formação de um novo complexo, onde moléculas de água circundantes ao íon európio são substituídas por peróxido de hidrogênio, minimizando efeitos de supressão. O tempo de vida do európio no complexo EuTc-PH aumenta de ~20µs para ~60µs.

A Tabela 1 compara o método de determinação de PH utilizando a sonda európio-tetraciclina com outros métodos utilizados. Desta forma, tanto a espectroscopia de emissão como a espectroscopia resolvida no tempo são técnicas sensíveis a presença de peróxido de hidrogênio em solução.

Tabela 1 - Métodos para determinação de peróxido de hidrogênio^{52,54}.

Método	Escala Linear	Limite de Detecção
Eletrodo modificado (carbono vítreo)	5 – 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	0,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
Biossensor Amperométrico (carbono vítreo)	0,01 -1,5 mmol.L^{-1}	5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
Biossensor Potenciométrico (eletrodo redox)	1,98 - 9,86 mol.L^{-1}	0,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
Biossensor Condutométrico (ouro)	5 – 300 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	-
Biossensor de Fibra Óptica	0,05 -1,2 mmol.L^{-1}	25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
Quimiluminescência (Luminol e Peroxidase)	0,1 – 0,3 mmol.L^{-1}	0,67 mmol.L^{-1}
UV-Vis (Ferro e Porfirina)	3,5 – 70 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
Volumetria	41 – 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
Cromatografia Líquida	0,5 – 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	0,15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
EuTc	2 – 400 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	0,96 $\mu\text{mol.L}^{-1}$

1.6 Peróxido de Uréia

O peróxido de uréia (PHU), ou peróxido de carbamida, possui a fórmula molecular $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O.H}_2\text{O}_2$, ou seja, é formado por uma molécula de uréia ligada ao peróxido de hidrogênio, sendo uma forma estável do H_2O_2 . O PHU é um forte agente oxidante e apresenta efeito citotóxico⁵⁵.

A uréia é a principal forma de excreção de nitrogênio realizada pelos rins em nosso organismo em um processo metabólico chamado ciclo da uréia. A fim de serem utilizados pelo nosso organismo, os aminoácidos sofrem um processo de desaminação (remoção do grupo amina) produzindo amônia (NH_3). Estas moléculas capturam íons de hidrogênio transformando-se em amônio (NH_4^+). Ambos, amônia e amônio, são tóxicos e, portanto convertidos no fígado em uréia sendo finalmente excretadas pelos rins⁵⁶.

Indivíduos com insuficiência renal crônica apresentam elevação nos níveis de PHU. Experimentos mostram que os níveis de pentosidina e carboximetilisina foram aumentados pelo radical hidroxila gerado pelo PHU através da reação de Fenton. As substâncias citadas (pentosidina e carboximetilisina) são produtos da reação de

Maillard, e podem promover várias respostas celulares, resultando em disfunções vasculares, aterosclerose, piora do quadro de diabetes e envelhecimento celular^{57,58}.

A determinação de PHU é realizada por meio de métodos indiretos com diversas etapas e reagentes⁵⁷. O complexo európio-tetraciclina utilizado como sensor de PHU pode ser uma alternativa mais econômica e direta^{40,7}.

1.7 Glicose

A glicose ou dextrose é um monossacarídeo, o menor tipo de carboidrato. Todas as células dos organismos vivos armazenam glicose como fonte de energia na forma de polissacarídeo (moléculas complexas de carboidratos)⁵⁶.

O aumento da concentração de glicose no sangue, ou hiperglicemia, é resultante de alterações da secreção de insulina e/ou ação da insulina nos tecidos. O conjunto de disfunções metabólicas causado pelo aumento da glicemia chama-se diabetes melito, e tem como sintomas clássicos poliúria (aumento do volume de urina), polidispia (sede), perda de peso, visão embaçada e fadiga. Tem como complicações crônicas retinopatia, aumento do risco de infecções e nefropatia, esta provocando disfunções gastrointestinais, cardiovasculares e sexuais^{59,60}.

Cerca de 7,6% da população adulta entre 30 e 69 anos e 0,3% das gestantes sofrem de diabetes. Alterações da tolerância à glicose são observadas em 12% dos adultos e em 7% das grávidas, e apenas aproximadamente 50% dos indivíduos acometidos pela doença tem conhecimento do diagnóstico⁶¹.

O diagnóstico do diabetes baseia-se fundamentalmente nas alterações da glicose plasmática de jejum ou após uma sobrecarga de glicose por via oral ⁶¹.

A concentração de glicose sanguínea varia normalmente de 80 a 120 mg/dL. A Tabela 2 mostra os valores da glicemia considerados normais e que diagnostica o diabetes pelo comitê especialista internacional de diabetes, financiado pela Sociedade Americana de Diabetes e aceito pela Organização Mundial de Saúde⁶⁰.

Tabela 2 - Valores de glicemia para diagnóstico de diabetes melito⁶⁰

Diagnóstico	Glicemia em jejum (mg/dL)	Glicemia 2h após a ingestão de 75 g glicose (mg/dL)	Glicemia casual-horário aleatório (mg/dL)
-------------	---------------------------	---	---

Normal	< 100	< 140	
Tolerância à glicose diminuída	≥ 100 a < 126	≥ 140 a < 200	
Diabetes mellitus	≥ 126	≥ 200	≥ 200 (com sintomas clássicos)

Existem 3 principais métodos laboratoriais para determinação da glicose no sangue: métodos de redução e de condensação (ambos métodos químicos) e métodos enzimáticos.

Dos métodos químicos empregados, os de redução são os mais antigos e baseiam-se nas propriedades de redução da glicose. Os oxidantes utilizados são o cobre ou o íon ferricianeto em meio alcalino, reduzidos pela glicose a íon cuproso e íon ferrocianeto, respectivamente. Os métodos mais populares transformam os íons cuprosos a óxido cuproso em presença de calor. A coloração é feita através da redução do fosfomolibdato (Folin-Wu) ou arsenomolibdato (Somogyi-Nelson) para formar azul de molibdênio. Estes métodos são não-específicos e qualquer agente redutor forte pode elevar o valor real do resultado ^{62,63}.

Nos métodos de condensação o grupo aldeído da glicose reage com aminas aromáticas formando um produto colorido, cuja intensidade é medida através de espectrofotometria no UV-visível e relacionada com a concentração de glicose. Um exemplo clássico é a reação da *o*-toluidina com a glicose em ácido acético formando uma glicosilamina com intensa coloração verde cuja absorbância é medida em 630 nm. Uma desvantagem é a alta corrosividade e toxicidade da *o*-toluidina. Além disso, o método sofre interferências podendo causar resultados falsamente elevados como, por exemplo, em amostras com teores elevados de bilirrubina que pode ser parcialmente transformada em biliverdina de cor verde, ou turvação na solução final como em presença de lipemia (aumento na concentração de lipídeos no sangue), condição frequentemente encontrada em diabéticos ^{62,63}.

Os métodos químicos (de redução e condensação) citados acima estão em desuso por não apresentarem a especificidade adequada, sendo os métodos enzimáticos preferidos para diagnóstico, pois são absolutamente específicos para glicose e mais simples de serem realizados ⁶¹.

Métodos enzimáticos utilizam enzimas como reativos. As principais enzimas utilizadas são: glicose desidrogenase, hexoquinase e glicose oxidase.

A glicose desidrogenase catalisa a redução de NAD^+ , produzindo gliconolactona e NADH que pode ser monitorado em 340 nm. O método com a enzima hexoquinase é realizado em duas etapas. Primeiramente a glicose é fosforilada pelo ATP com a ação da hexoquinase formando glicose-6-fosfato. Na segunda etapa a glicose-6-fosfato é convertida por outra enzima, a glicose-6-fosfato desidrogenase, na presença de NADP^+ , em 6-fosfogliconolactona e NADPH. Finalmente o NADPH formado é proporcional à quantidade de glicose na amostra e é medido em 340 nm, como no método enzimático da glicose desidrogenase^{62,63}.

O método com a glicose-oxidase ou Gox é específico para a β -D-Glicose. Em solução, aproximadamente 66% da D-glicose encontra-se no estado β e 34% na forma de α -D-Glicose⁶². Primeiramente a Gox catalisa a oxidação da glicose para ácido glicônico e peróxido de hidrogênio de acordo com a reação abaixo 48:

A quantidade de peróxido formada na reação é então mensurada de diversas formas. Usualmente utiliza-se novamente a enzima peroxidase que oxida o H_2O_2 em um cromogênio para formar um complexo oxidado colorido que revela a presença de glicose (método enzimático-colorimétrico).

Outra forma que está sendo estudada atualmente é utilizar o complexo EuTC, que reage com o H_2O_2 formando um complexo altamente fluorescente cuja intensidade é medida através de espectrofotometria em 615 nm⁴⁸. Através deste método não há a necessidade de utilizar outra enzima e é possível observar a emissão em um comprimento de onda na região visível.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os equipamentos utilizados para a realização das medidas encontram-se no Centro de Lasers e Aplicações (CLA) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)/USP. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente.

Os espectros de absorção das amostras foram medidos em um espectrofotômetro Cary-Olis-17D. Para a obtenção dos espectros de emissão e tempo de vida utilizamos o sistema Fluorolog 3 da Jobin Yvon (Figura 5). O fluorímetro fornece uma curva de contagens de fótons em função do comprimento de onda.

Em todas as medidas realizadas neste aparelho as amostras foram colocadas em cubetas com as quatro faces polidas, com 1 mm de caminho óptico.

Figura 5 – Espectrofotômetro Fluorolog 3.

Dados técnicos do Fluorolog 3:

- Excitação: Lâmpada de Xe 450 Watts;
- Acurácia: 0.5 nm;

- Velocidade: 150 nm/s;
- Faixa de detecção: 0 nm – 1100 nm;
- Grades: 330 nm (intervalo de 200–700 nm) e 500 nm (intervalo de 300–1000 nm);
- Sensibilidade: S/N >5000:1 (R928 PMT) em 397 nm, com slits de 5 nm;
- Tempo de pulso: 10 μ s.

1.8 Reagentes e Solventes

Os reagentes e solventes utilizados seguem listados abaixo:

- Cloreto de Európio Hexahidratado
- Cloridrato de Tetraciclina
- Cloridrato de Clorotetraciclina
- Cloridrato de Oxitetraciclina
- Cloridrato de Metaciclina
- Água bideionizada
- Hidróxido de sódio
- Ácido propanosulfônico 3-(N-morfolino) ou MOPS
- Peróxido de Hidrogênio
- Peróxido de Uréia
- Glicose Oxidase

As tetraciclinas foram importadas da Sigma Aldrich, cloreto de európio hexa-hidratado da Molecular Probe, solução tampão MOPS da alemã Carl Roth. A glicose oxidase foi adquirida do kit comercial de dosagem de glicose por método enzimático Laborlab. Usou-se a glicose anidra e peróxido de hidrogênio 30% p.a. da Casa Americana. O peróxido de uréia 98% foi adquirido do laboratório Sigma-Aldrich. Todos os reagentes foram pesados em balança analítica com precisão de $\pm 0,0001$ g.

1.9 Preparação das amostras

Foram preparadas as seguintes amostras:

Solução MOPS: preparou-se uma solução tampão adicionando 2,09 g de MOPS em 1000 mL de água bideionizada. O pH da solução foi ajustado para 6,9 através do acréscimo de NaOH, pois o MOPS em água bideionizada possui um pH mais ácido que o desejado.

Solução TCs: $21 \mu\text{molL}^{-1}$ das tetraciclinas (Tc, OTc, CTc, MTc) completando o volume com a *Solução MOPS* para 100 mL.

Solução EuTCs: foram preparadas amostras de európio em diferentes concentrações molares para a quantidade fixa de $21 \mu\text{molL}^{-1}$ das tetraciclinas (EuTc, EuOTc, EuCTc, EuMTc) completando o volume com a *Solução MOPS* para 100 mL, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3- Amostras do complexo európio tetraciclinas.

Proporção Eu:TCs	Eu ³⁺ (μmolL^{-1})	TC (μmolL^{-1})
1,0Eu:1,0Tc	21,00	21,00
1,5Eu:1,0Tc	31,50	21,00
2,0Eu:1,0Tc	42,00	21,00
2,5Eu:1,0Tc	52,50	21,00
3,0Eu:1,0Tc	63,00	21,00
3,5Eu:1,0Tc	73,50	21,00
4,0Eu:1,0Tc	84,00	21,00

Solução-mãe PH: 11,5 μL de peróxido de hidrogênio 30% p.a. dissolvidos em 100 mL de água bideionizada, obtendo 100 mL de uma solução de peróxido de hidrogênio 1000 μM .

Solução-mãe PHU: 0,009407 g de peróxido de uréia dissolvidos em 100 mL de água bideionizada, obtendo 100 mL de uma solução de peróxido de uréia 1000 μM .

Solução EuTCs-PH : 1 mL da *Solução EuTC* acrescidas de 1 mL de solução de PH em diversas concentrações molares (0 à 1000 μM) que foram preparadas à partir da *Solução-mãe PH*, completando com água bideionizada quando necessário para um volume final de 2 mL.

Solução EuTCs-PHU : 1 mL da *Solução EuTC* acrescidas de 1 mL da solução de PHU em diversas concentrações molares (0 à 1000 μM) que foram preparadas à partir da *Solução-mãe PHU*, completando com água bideionizada quando necessário para um volume final de 2 mL.

Solução EuTC-Glicose: 1 mL da *Solução EuTC* + 50 μL Glicose nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/dL, estas preparadas a partir de uma solução mãe de 250 mg/dL de glicose.

Solução EuTC-Glicose-Gox: 1mL *Solução EuTC* + 5 μL Gox + 50 μL Glicose em diversas concentrações (0 à 225 mg/dL), preparadas a partir de uma solução mãe de 250 mg/dL de glicose.

Solução de Interferentes: 500 μL *Solução EuTC* + 500 μL de PHU ou PH 500 μM + 500 μL da solução com interferente inorgânico. Os interferentes e concentrações utilizados seguem na Tabela 4. As concentrações correspondem à valores encontrados normalmente no sangue e as soluções de interferentes foram preparadas com água bideionizada.

Tabela 4 - Valores de referência dos componentes inorgânicos estudados.

Interferente	Valor de Referência no Sangue
Zn	20 μM ⁶⁴

Al	12 μM ⁶⁵
Ca	1,12 μM ⁶⁶
Co	0,1 μM ⁶⁴
Cu	11,02 μM ⁶⁷
Fe	10,74 μM ⁶⁷
Mg	0,75 mM a 1 mM ⁶⁷
Mn	0,2 μM ⁶⁴
Ni	0,1 μM ⁶⁴
Ag	0,093 μM ⁶⁸

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.10 Estudos dos Reagentes e Complexos Európio-Tetraciclina

A base das soluções de európio-tetraciclina são feitas utilizando o tampão MOPS (Figura 6) a fim de manter o pH da solução neutro, mais precisamente em 6.9. Estudos mostram que para melhor complexação do íon európio com a tetraciclina o pH neutro é o ideal^{2,30,53}.

Figura 6 – Estrutura do ácido propanosulfônico 3-(N-morfolino) ou MOPS.

A Figura 7 mostra os espectros de absorção óptica da solução de MOPS, do íon európio $63 \mu\text{molL}^{-1}$ em solução de MOPS, e das soluções-mãe dos peróxidos de hidrogênio e uréia na concentração molar de $1000 \mu\text{M}$, realizados nos comprimentos de onda entre 200 e 500 nm. Nenhum dos reagentes apresenta absorção neste intervalo, não interferindo assim no complexo EuTC.

Observa-se que o íon európio possui um baixo coeficiente de absorção, resultado das transições proibidas f-f¹².

Figura 7 - Espectro de absorção óptica do tampão MOPS, íon európio em solução MOPS, solução-mãe PH e solução-mãe PHU.

As candidatas ao nosso estudo da família das Tetraciclina: oxitetraciclina (OTc), clorotetraciclina (CTc) e metaciclina (MTc) apresentam, em solução, um amplo espectro de absorção característico de compostos orgânicos e, quando em solução com európio, apresentam um deslocamento de absorção para o vermelho, indicando a formação do complexo EuTC (Figura 8). A OTc e CTc sofrem um deslocamento para um maior comprimento de onda de aproximadamente 30 nm quando complexadas com európio. Na solução MTc o deslocamento foi de 40 nm. As Tetraciclina em solução preparadas com concentração molar de $21 \mu\text{molL}^{-1}$ e os complexos EuTC nas razões molares 1:1; 1:2; 1:3 e 1:4.

Figura 8 - Espectro de absorção óptica: (a) complexo EuOTc e OTc, (b) complexo EuCTc e CTc, (c) complexo EuMTc e MTc.

O complexo EuTC mantém a banda larga de absorção característica do ligante orgânico, indicando que a energia absorvida pelo quelato ocorre através deste. É possível observar que para diferentes razões molares de EuTC a absorção do complexo permanece praticamente no mesmo comprimento de onda.

A Figura 9(a) mostra a emissão das amostras da solução de OTc 21 μmolL^{-1} e do íon európio 21 μmolL^{-1} , excitadas respectivamente em 357nm e 390 nm.

Figura 9 - (a) Espectro de emissão óptica das soluções de OTc e do íon európio.
(b) Emissão óptica do complexo EuOTc em diversas razões molares.

A OTc possui um amplo banda de emissão, característico dos compostos orgânicos, com máximo em torno de 480 nm, com emissão de 7.000 fótons. O európio apresenta banda de emissão com picos finos e bem definidos em: 578nm, 590nm e 614nm, este último com emissão máxima em torno de 33.000 fótons.

O espectro de emissão do EuOTc é mostrado na Figura 9(b), com excitação em 390 nm. A razão molar 1Eu:1OTc foi a que obteve maior intensidade na emissão, em torno de 5.500.000 fótons, ou seja, um aumento na emissão de mais de 150 vezes em relação ao íon európio em solução. Todas as razões molares estudadas emitiram no mesmo comprimento de onda, com máximo em aproximadamente 615 nm. Isto ocorre porque o ligante orgânico absorve energia transferindo-a ao estado tripleto do íon metálico central, que emite a radiação em

uma banda estreita e bem definida, devido à transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ dos íons európio (efeito antena).

Os espectros de emissão da CTc e do seu complexo com o íon európio (Figura 10), assim como os da MTc e do complexo EuMTc (Figura 11) demonstram o mesmo fenômeno de transferência de energia intramolecular entre o ligante orgânico e o lantanídeo descrito anteriormente. As soluções CTc e EuCTc foram excitadas em 370 e 400 nm, enquanto a solução MTc e EuMTc foram excitadas em 350 e 390 nm respectivamente.

Figura 10 - (a) Espectro de emissão óptica da solução CTc. (b) Emissão óptica do complexo EuCTc em diversas razões molares.

Figura 11 - (a) Espectro de emissão óptica da solução MTc. (b) Emissão óptica do complexo EuMTc em diversas razões molares.

Na Tabela 5 é apresentado o grande deslocamento entre a absorção e emissão dos complexos EuTCs, importante característica que evita a sobreposição dos espectros de excitação e emissão.

Tabela 5 – Deslocamento dos picos de absorção e emissão dos complexos EuOTc, EuCTc e EuMTc

EuTC	Absorção (nm)	Emissão (nm)	Deslocamento (nm)
<i>EuOTc</i>	390	615	225
<i>EuCTc</i>	400	615	215
<i>EuMTc</i>	390	615	225

1.11 Determinação das curvas de calibração

Uma curva de calibração permite a determinação da concentração de uma substância em uma amostra desconhecida, comparando o desconhecido a um conjunto de amostras padrão de concentração conhecida. Os dados - as concentrações do analito (peróxido de hidrogênio, peróxido de uréia, glicose, etc.) e a resposta do instrumento para cada padrão – podem ser ajustados como uma linha reta de equação $y = a + b \cdot x$, onde y é a resposta do instrumento de medida, x corresponde à concentração do peróxido, b (coeficiente angular da reta) representa o ruído de fundo e a (coeficiente linear) descreve a sensibilidade. A concentração do analito das amostras desconhecidas (x) pode ser calculada a partir desta equação.

Outro fator a ser considerado é o limite de detecção (LD) que corresponde à menor quantidade do analito capaz de ser detectado em uma amostra⁶⁹. O LD pode ser calculado a partir da seguinte fórmula:

$$LD = 3 * \frac{\text{desvio padrão do parâmetro } b}{\text{Coeficiente angular da curva de calibração}}$$

Para a construção da curva de calibração dos complexos EuOTc, EuCTc e EuMTc com o peróxido de hidrogênio e peróxido de uréia primeiramente foi

determinada a melhor razão molar de Eu:TC para a formação do complexo, considerando a melhor razão molar aquela que apresenta maior intensidade de luminescência. Logo, foram preparadas amostras em diversas concentrações molares de európio (1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0) para 1 de Tetraciclina (OTc, CTc e MTc), acrescidas de peróxido de hidrogênio ou uréia em uma concentração fixa, no caso 500 μ M. Encontrada a melhor razão de EuTC, foram obtidos os espectros de emissão variando a concentração dos peróxidos. Os espectros de emissão foram feitos entre os comprimentos de onda 580 e 650 nm, intervalo em que ocorre o maior pico de emissão do complexo. A curva de calibração foi construída através da integral do espectro de cada amostra para a concentração do analito em questão.

Os resultados foram comparados com o complexo Európio-Tetraciclina (EuTc), este amplamente estudado na detecção de peróxidos de hidrogênio^{52,53} e uréia^{40,7}. A curva de calibração da EuTc foi construída baseando-se em estudos prévios que demonstram que a melhor razão molar de EuTc para a realização dos experimentos é de 1:3 e que o complexo possui pico de absorção com máximo no comprimento de onda em 400 nm²⁻³⁰.

1.11.1 Complexos EuTC-PH

Foram obtidos os espectros de absorção dos complexos EuOTc, EuCTc e EuMTc na presença de PH (Figura 12). As amostras foram preparadas em diversas concentrações molares de Eu:TC (1:1; 2:1; 3:1 e 4:1) acrescidas de peróxido de hidrogênio 500 μ M.

Pode-se observar que a posição das bandas de absorção dos EuTCs não se alteram com a presença de PH, havendo apenas alteração na intensidade. Os picos de absorção mantiveram-se em 390 nm nos complexos EuOTc-PH e EuMTc-PH, 400 nm no complexo EuCTc-PH.

Figura 12 - Espectro de absorção óptica dos complexos (a)EuOTc, (b)EuCTc, (c)EuMTc, em diferentes concentrações molares, com e sem PH.

Os espectros de luminescência das EuTC com PH 500 μ M estão apresentados na Figura 13. As soluções foram excitadas nos comprimentos de onda obtidos nos experimentos dos espectros de absorção realizados anteriormente: 390 nm para os complexos EuOTc-PH e EuMTc-PH; 400 nm para o complexo EuCTc-PH.

Figura 13 - Espectro de emissão dos complexos: (a) EuOTc-PH, (b) EuCTc-PH, (c) EuMTc-PH, em diferentes concentrações molares EuTC.

Assim, os resultados com a razão molar com maior intensidade de emissão seguem na Tabela 6 abaixo:

Tabela 6 - Razões molares do EuTC na presença de PH que obtiveram emissão com maior intensidade.

EuTC	Razão Molar Eu:TC, na presença de PH 500 μ M
EuOTc	4:1
EuCTc	4:1
EuMTc	2:1

A partir do resultado anterior, foram preparadas amostras dos complexos 4Eu:1OTc, 4Eu:1CTc e 2Eu:1MTc com PH variando a concentração deste de 0 até

1000 μM . As soluções foram então excitadas nos comprimentos de onda 390 nm para os complexos EuOTc-PH e EuMTc-PH, 400 nm para o complexo EuCTc-PH. Para comparação dos resultados, o complexo EuTc foi preparado a razão molar de 3:1 acrescido de PH em diversas concentrações molares, excitado em 400 nm.

Os resultados obtidos para a EuTc-PH são exibidos na Figura 14. A curva de calibração mostrou um aumento relativamente linear de 0 a 600 μM , com um aumento na emissão em 7 vezes se comparado ao complexo sem PH. O limite de detecção do EuTc-PH é de 0,17 mg/mL.

Figura 14 – (a) Espectro de emissão (b) e curva de calibração do complexo 3Eu:1Tc-PH.

O complexo EuCTc-PH obteve um aumento na luminescência de quase 7,2 vezes em relação ao EuCTc (Figura 15). A emissão aumentou de 15 milhões de fótons para 110 milhões de fótons na presença de PH. A curva de calibração mostrou-se linear entre 100 a 700 μM . O limite de detecção obtido foi de 0,06 mg/mL.

Figura 15 – (a) Espectro de emissão e (b) curva de calibração complexo 4Eu:1CTc-PH.

A curva de calibração do complexo EuOTc também mostrou um aumento linear de 0 a 600 μM (Figura 16). O aumento na intensidade de luminescência foi menor que os anteriores, de aproximadamente 4 vezes em relação ao complexo sem PH. O limite de detecção para o EuOTc-PH é de 0,12 mg/mL.

Figura 16 - (a) Espectro de emissão e (b) curva de calibração do complexo 4Eu:1OTc-PH.

O espectro de emissão e curva de calibração do complexo EuMTc-PH é apresentado na Figura 17. Pode-se observar que não houve alteração na emissão do complexo EuMTc na presença de PH.

Figura 17 - (a) Espectro de emissão e (b) curva de calibração do complexo 2Eu:1MTc-PH.

É possível observar no espectro de emissão que em torno da transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ a banda apresenta dois picos, o que pode significar que existam diferentes sítios de ligação para o európio na molécula da tetraciclina quando em presença de PH. Especificamente no caso do complexo EuOTc nota-se que isto ocorre mesmo sem a presença de PH.

O aumento da luminescência com a adição do peróxido ocorre devido à substituição de moléculas da água na coordenação do európio (que diminuem a intensidade de emissão) pelo H_2O_2 . Além disso, estudos sugerem que o peróxido de hidrogênio promove uma reorganização estrutural do complexo EuTc em solução aumentando a proximidade do íon metálico central com os ligantes orgânicos, o que permitiria maior eficiência na transferência de energia intramolecular⁶.

O complexo EuMTc, ao contrário dos outros, não sofre aumento na emissão em presença de PH. Isto ocorre provavelmente porque não há um aumento no número de sítios de ligação da molécula com a presença do peróxido.

1.11.2 Complexos EuTC-PHU

A Figura 18 mostra os espectros de absorção dos complexos EuOTc, EuCTc e EuMTc na presença de PHU. As amostras foram preparadas em diversas razões molares de Eu:TC (1:1; 2:1; 3:1 e 4:1) acrescidas de peróxido de uréia 500 μM . Não há alteração significativa do comprimento de onda de absorção das amostras na ausência ou presença do peróxido de uréia. Os picos de absorção mantiveram-se em 390 nm nos complexos EuOTc-PHU e EuCTc-PHU, 400 nm no complexo EuCTc-PHU.

Figura 18 - Espectro de absorção óptica dos complexos (a)EuOTc, (b)EuCTc, (c)EuMTc, em diferentes concentrações molares sem PHU e com PHU.

Os espectros de emissão das EuTC com PHU 500 μM são apresentados na Figura 19. As soluções foram excitadas nos comprimentos de onda obtidos nos

experimentos dos espectros de absorção realizados anteriormente: 390 nm para os complexos EuOTc- PHU e EuMTc- PHU; 400 nm para o complexo EuCTc- PHU.

Figura 19 - Espectro de emissão dos complexos (a) EuOTc-PHU, (b) EuCTc-PHU, (c) EuMTc-PHU, em diferentes concentrações molares de EuTC.

Os resultados com a razão molar com maior intensidade de emissão seguem na Tabela 7.

Tabela 7 - Razão molar do EuTC na presença de PHU que obteve emissão com maior intensidade.

EuTC	Razão Molar Eu:TC, na presença de PHU 500 μ M
EuOTc	4,0:1
EuCTc	3,5:1
EuMTc	1,5:1

De acordo com o resultado obtido, foram preparadas amostras dos complexos 4Eu:1OTc, 3,5Eu:1CTc e 1,5Eu:1MTc com diversas concentrações molares de PHU. As soluções foram novamente excitadas nos comprimentos de onda 390 nm para os complexos EuOTc- PHU e EuMTc- PHU, 400 nm para o complexo EuCTc- PHU. Para comparação dos resultados, o complexo EuTc foi preparado a razão molar de 3:1, e excitado em 400 nm.

A Figura 20 apresenta o espectro de emissão e curva de calibração do complexo EuTc-PHU. A curva de calibração mostrou boa linearidade de 0 a 1000 μM de PHU e houve um aumento em torno de 7 vezes na emissão da luminescência. O limite de detecção obtido para o complexo foi de 0,076 mg/mL.

Figura 20 - (a) Espectro de emissão e (b) curva de calibração do complexo 3Eu:1Tc-PHU.

Na presença de PHU a curva de calibração para o EuOTc mostrou-se relativamente linear de 0 até 500 μM com um aumento na luminescência de 4,8 vezes em relação ao complexo sem o peróxido (Figura 21). O limite de detecção obtido é de 0,24 mg/mL.

Figura 21 - (a) Espectro de emissão e (b) curva de calibração do complexo 4Eu:1OTc-PHU.

Na Figura 22 é apresentado o espectro de emissão e curva de calibração do complexo EuCTc-PHU. A curva obtida possui linearidade entre 200 a 1000 μM . O aumento na emissão foi de 3 vezes em relação ao complexo sem PHU. O limite de detecção do complexo é de 0,08 mg/mL.

Figura 22 - (a) Espectro de emissão e (b) curva de calibração do complexo 3,5Eu:1CTc-PHU.

A Figura 23 mostra o espectro de emissão e a curva de calibração do EuMTc-PHU. Pode-se observar que não houve alteração da luminescência com a presença de PHU.

Figura 23 - (a) Espectro de emissão e (b) curva de calibração do complexo 1,5Eu:1MTc-PHU.

Assim como nos experimentos com o peróxido de hidrogênio, há uma divisão da banda em torno de 615 nm sugerindo que o európio ocupa diferentes sítios na tetraciclina. Também há um considerável aumento na luminescência com a adição do peróxido de uréia (exceto nos estudos com o complexo európio-metaciclina) provocado pela substituição de moléculas da água pelo PHU.

1.12 Tempo de Vida

O tempo de vida é o tempo que o sistema demora a retornar ao estado fundamental, isto é, o tempo de transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ do európio presente no complexo. Assim como os espectros de absorção óptica e de emissão, é uma importante medida para a caracterização dos complexos.

As medidas dos tempos de vida foram realizadas no fluorímetro Fluorolog 3 onde um pulso de luz excita a amostra. O aparelho permite o controle de atrasos variáveis quando abre a janela de detecção, e por quanto tempo.

Geralmente sistemas complexos podem apresentar múltiplas espécies fluorescentes, e sendo assim, o perfil de decaimento da intensidade de fluorescência não pode ser ajustado por uma função exponencial simples. Dessa forma, foi ajustado por uma exponencial dupla: $y = y_0 + A_1 e^{(-t/\tau_1)} + A_2 e^{(-t/\tau_2)}$, onde τ_1 e τ_2 são os tempos de decaimento (μs) e A_1 e A_2 são as amplitudes do sinal. No caso de decaimento com múltiplas exponenciais, a média do tempo de vida (τ_{av}), é proporcional a área total abaixo da curva de decaimento da fluorescência, definida por :

$$\tau_{av} = \frac{\sum_i A_i \tau_i^2}{\sum_i A_i \tau_i}$$

Os experimentos foram realizados considerando as razões molares de EuTCs que apresentaram maior intensidade de emissão na presença dos peróxidos de hidrogênio e uréia em nossos estudos (Tabela 8). No caso da tetraciclina a melhor proporção adotada, como dito anteriormente, foi a partir de artigos científicos que demonstram que a melhor razão molar da EuTc é 3:12.³⁰

Tabela 8 - Razão Molar das amostras de EuTC para estudo de tempo de vida.

TC	Razão Molar EuTC com PH	Razão Molar EuTC com PHU
OTc	4:1	4:1
CTc	4:1	3.5:1
MTc	2:1	1.5:1
Tc	3:1	3:1

Foram realizadas medidas do tempo de vida do európio em 615 nm para os complexos EuTc, EuCTc, EuMTc e EuOTc na ausência e na presença de 500 μ M de peróxido de hidrogênio ou peróxido de uréia. Os complexos EuTc e EuCTc foram excitados em 400 nm, e os complexos EuMTc e EuOTc excitados em 390 nm.

Comparando o tempo de vida de ambos os complexos EuTc e EuOTc com a adição de PH e PHU, podemos notar um expressivo aumento no tempo de decaimento nas amostras que contêm peróxidos.

O complexo EuTc apresentou um tempo de vida de 34 μ s, dobrando este valor na presença de peróxido de hidrogênio e uréia para 68 μ s e 70,8 μ s respectivamente (Tabela 9 e Figura 24).

Figura 24 – Tempo de vida dos complexos EuTc, EuTc-PH e EuTc-PHU.

Tabela 9 – Parâmetros da dupla exponencial e tempo de vida dos complexos EuTc, EuTc-PH e EuTc-PHU.

Complexos EuTc	Parâmetros	Valor	Erros	$\tau_{av}(\mu s)$
3Eu:1Tc	A1	17959,80474	1361,28738	34,40
	τ_1	0,05979	0,00258	
	A2	95405,85839	1232,90573	
	τ_2	0,02039	2,39E-04	
3Eu:1Tc-PH	A1	295970,0749	--	68,12
	τ_1	0,06812	936,27005	
	A2	295970,0749	--	
	τ_2	0,06812	936,2752	
3Eu:1Tc-PHU	A1	419503,6848	4076,60778	70,87
	τ_1	0,07143	6,29E-04	
	A2	19039,70452	2999,26646	
	τ_2	0,01581	0,00543	

O EuOTc obteve um tempo de decaimento de 56 μs . Na presença de PH houve um aumento significativo para 95 μs e complexado com PHU o aumento foi um pouco menor, 85 μs (Figura 25 e Tabela 10).

Figura 25 - Tempo de vida dos complexos EuOTc, EuOTc-PH e EuOTc-PHU.

Tabela 10 - Parâmetros da dupla exponencial e tempo de vida dos complexos EuOTc, EuOTc-PH e EuOTc-PHU.

Complexos EuOTc	Parâmetros	Valor	Erros	$\tau_{av}(\mu\text{s})$
4Eu:1OTc	A1	118162,3517	13287,85149	56,62
	τ_1	0,03069	0,00158	
	A2	145421,3542	13424,57947	
	τ_2	0,06637	2,60E-03	
4Eu:1OTc-PH	A1	361436,2103	--	95,13
	τ_1	0,09513	27594,36244	
	A2	361436,2103	--	
	τ_2	0,09513	27594,37603	
4Eu:1OTc-PHU	A1	266855,5896	5,68E+10	85,57
	τ_1	0,08557	2,24E+03	
	A2	266855,5896	5,68E+10	
	τ_2	0,08557	2238,38497	

O complexo EuCTc apresentou um tempo de vida de aproximadamente 14 μs e não houve variação significativa neste valor com a adição de ambos os peróxidos (Figura 26 e Tabela 11).

Figura 26 - Tempo de vida dos complexos EuCTc, (a) EuCTc-PHU e (b)EuCTc-PH.

Tabela 11 - Parâmetros da dupla exponencial e tempo de vida dos complexos EuCTc, EuCTc-PH e EuCTc-PHU.

Complexos EuCTc	Parâmetros	Valor	Erros	$\tau_{av}(\mu s)$
4Eu:1CTc	A1	68489,77526	108,83675	14,50
	τ_1	0,01065	4,22E-05	
	A2	1269,88781	99,48436	
	τ_2	0,05484	0,00341	
4Eu:1CTc-PH	A1	99184,43977	5,70E+10	17,26
	τ_1	0,01726	1152,10575	
	A2	99184,44086	5,70E+10	
	τ_2	0,01726	1,15E+03	
3,5Eu:1CTc	A1	55412,20864	1,71E+02	14,26
	τ_1	0,01002	8,57E-05	
	A2	1926,65618	2,01E+02	
	τ_2	0,04284	0,00276	
3,5Eu:1CTc-PHU	A1	57142,97607	2,76E+02	12,83
	τ_1	0,00985	1,78E-04	
	A2	2718,83077	6,23E+02	
	τ_2	0,03207	0,00336	

O complexo EuMTc obteve o maior tempo de vida de todos os complexos estudados sem os peróxidos, 60 μs para a razão molar de 2Eu:1MTc e 74 μs para razão molar de 1,5Eu:1MTc. Na presença dos peróxidos houve uma diminuição no tempo de vida (Figura 27 e Tabela 12).

Figura 27 - Tempo de vida dos complexos EuMTc, (a) EuMTc-PH e (b) EuMTc-PHU.

Tabela 12- Parâmetros da dupla exponencial e tempo de vida dos complexos EuMTc, EuMTc-PH e EuMTc-PHU.

Complexos EuMTc	Parâmetros	Valor	Erros	$\tau_{av}(\mu s)$
2Eu:1MTc	A1	87851,8574	4217,77092	60,80
	τ_1	0,03435	1,01E-03	
	A2	20270,3167	4066,61632	
	τ_2	0,1001	0,01572	
2Eu:1MTc-PH	A1	72578,6393	5,70E+03	54,22
	τ_1	0,03021	0,00128	
	A2	37370,17134	5,76E+03	
	τ_2	0,07342	5,86E-03	
1,5Eu:1MTc	A1	17094,2358	3,03E+03	74,55
	τ_1	0,1496	4,12E-02	
	A2	139295,0583	3,79E+03	
	τ_2	0,04072	7,27E-04	
1,5Eu:1MTc-PHU	A1	70179,78358	3,87E+03	53,06
	τ_1	0,02895	9,29E-04	
	A2	33439,38579	3,92E+03	
	τ_2	0,07311	0,00465	

Para o expressivo aumento no tempo de vida dos complexos na presença de peróxidos, sugerimos que as moléculas de água na solução contendo peróxidos são substituídas por estes. Com menor número de moléculas na vizinhança do íon európio, a transferência de energia para as moléculas de água é minimizada, e a

energia é então praticamente mantida para o íon Eu^{3+} , aumentando o tempo de vida e a intensidade da luminescência, resultando em um melhor rendimento quântico.

No complexo EuCTc não houve aumento no tempo de vida com a adição dos peróxidos possivelmente devido ao limite de detecção do equipamento, pois o ajuste fornece um valor irreal já que a medição realizada é o flash da lâmpada de xenônio do aparelho.

1.13 Interferentes

Para a análise da tolerância de compostos inorgânicos, preparamos amostras com interferentes em concentrações encontradas normalmente no sangue como ponto de partida para o estudo, e verificamos se tais componentes nestas concentrações de referência acarretam em aumento ou redução da fluorescência do európio em 615 nm. Foram obtidas as relações de emissão para o complexo com PH ou PHU na presença dos interferentes. Os estudos de interferentes com a metaciclina foram desconsiderados devido aos resultados não expressivos na criação da curva de calibração.

1.13.1 Complexos EuTC-PH

Foram realizados experimentos para observar a interferência dos compostos inorgânicos nos complexos 3Eu:1Tc-PH (Figura 28), 4Eu:1OTc-PH (Figura 29) e 4Eu:1CTc-PH (Figura 30). Verifica-se que dentro das faixas de concentração encontradas normalmente no sangue, tais compostos não apresentam interferência significativa no sinal de emissão, pois considerando o aumento da luminescência em relação ao complexo európio-tetraciclina sem a presença de peróxido, a interferência torna-se irrelevante.

Figura 28 - Comparação da intensidade de emissão entre o os sinais dos complexos EuTc, EuTc-PH e dos complexos EuTc-PH na presença de interferentes.

Figura 29 - Comparação da intensidade de emissão entre o os sinais dos complexos EuOTc, EuOTc-PH e dos complexos EuOTc-PH na presença de interferentes.

Figura 30 - Comparação da intensidade de emissão entre o os sinais dos complexos EuCTc, EuCTc-PH e dos complexos EuCTc-PH na presença de interferentes.

1.13.2 Complexos EuTC-PHU

Foram realizados experimentos para observar a interferência dos compostos inorgânicos nos complexos 3Eu:1Tc-PHU (Figura 31), 4Eu:1OTc-PHU (Figura 32) e 3,5Eu:1CTc-PHU (Figura 33). Assim como nos experimentos do peróxido de hidrogênio, existe uma pequena interferência na luminescência dos compostos inorgânicos estudados, que quando comparado ao aumento da emissão devido à presença do PHU torna-se irrisória.

Figura 31 - Comparação da intensidade de emissão entre o os sinais dos complexos EuTc, EuTc-PHU e dos complexos EuTc-PHU na presença de interferentes.

Figura 32 - Comparação da intensidade de emissão entre o os sinais dos complexos EuOTc, EuOTc-PHU e dos complexos EuOTc-PHU na presença de interferentes.

Figura 33 - Comparação da intensidade de emissão entre o os sinais dos complexos EuCTc, EuCTc-PHU e dos complexos EuCTc-PHU na presença de interferentes.

1.14 Complexos EuTC com Glicose

Sabendo que a glicose, na presença se GOx é quebrada em ácido glicônico e peróxido de hidrogênio, foram realizados estudos com o complexo európio-tetraciclina para a verificação do PH resultante e assim, indiretamente da glicose. Para este estudo foram utilizados os complexos 4Eu:1OTc-Glicose-Gox, 4Eu:1CTc-Glicose-Gox e 3Eu:1Tc-Glicose-Gox para comparação dos resultados.

A Figura 34 mostra que a presença de apenas glicose com o complexo EuTC não promove aumento na intensidade da luminescência do mesmo.

Figura 34 - Emissão dos complexos EuOTc e EuCTc, acrescidos de glicose nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/dL.

Nos experimentos seguintes foi adicionado Gox ao complexo EuTC-Glicose para a quebra da molécula de açúcar e formação de peróxido de hidrogênio. Foi utilizada a concentração de 5 μ L de Gox, pois para 225 mg/dL de glicose maiores quantidades de Gox não mostraram diferença no aumento na luminescência e portanto na formação de PH. Observa-se que para todas as tetraciclinas estudadas houve um aumento na emissão do complexo.

A Figura 35 mostra a emissão e curva de calibração do complexo EuTc-Glicose-Gox. Houve um aumento de 4,7 vezes na emissão com linearidade de 0 à 100 mg/dL de glicose. O limite de detecção foi de 0,29 mg/dL.

Figura 35 - Emissão e curva de calibração dos complexos EuTc-Glucose-Gox, variando a concentração de glicose nas amostras. Excitação em 400 nm.

O complexo EuOTc-Glucose-Gox apresentou um aumento de 3,1 em em relação à amostra sem glicose (Figura 36). A faixa de linearidade foi de 10 a 125 mg/dL de glicose e o limite de detecção obtido foi 0,246 mg/dL.

Figura 36 - Emissão e curva de calibração dos complexos EuOTc-Glicose-Gox, variando a concentração de glicose nas amostras. Excitação em 390 nm.

A Figura 37 mostra a emissão e curva de calibração do complexo EuCTc-Glicose-Gox. Houve um aumento de 4,2 vezes na luminescência em relação à

amostra sem glicose com linearidade de 10 a 125 mg/dL de glicose. O limite de detecção foi de 0,22 mg/dL.

Figura 37 - Emissão e curva de calibração dos complexos EuCTc-Glicose-Gox, variando a concentração de glicose nas amostras. Excitação em 390 nm.

Foram também realizados estudos do tempo de vida com os complexos: EuTc-Glicose-Gox (Figura 38 e Tabela 13), EuCTc-Glicose-Gox (Figura 39 e Tabela 14), EuOTc-Glicose-Gox (Figura 40 e Tabela 15). Todos apresentaram um aumento no tempo de vida.

Figura 38 – Tempo de vida do complexo EuTc com diferentes concentrações de Glicose acrescidas de Gox.

Tabela 13 – Parâmetros da dupla exponencial e tempo de vida do complexo EuTc com diferentes concentrações de Glicose acrescidas de Gox.

Complexo EuTc	Parâmetros	Valor	Erros	$\tau_{av}(\mu s)$
3Eu:1Tc + 0 mg/dL Glicose + Gox	A1	121550,65703	1193,59368	40,93
	τ_1	0,02158	0,00021	
	A2	24195,68202	1304,33551	
	τ_2	0,07064	0,00265	
3Eu:1Tc + 50 mg/dL Glicose + Gox	A1	109827,03652	17190,91484	65,87
	τ_1	0,03599	0,00218	
	A2	228310,65272	17184,86842	
	τ_2	0,07297	0,00220	
3Eu:1Tc + 70 mg/dL Glicose + Gox	A1	297660,40431	33852,44129	67,74
	τ_1	0,07218	0,00335	
	A2	83103,63878	33824,85897	
	τ_2	0,03511	0,00571	
3Eu:1Tc + 100 mg/dL Glicose + Gox	A1	332630,06093	31674,35235	69,33
	τ_1	0,07286	0,00311	
	A2	71109,08663	31586,01998	
	τ_2	0,03334	0,00661	
3Eu:1Tc + 150 mg/dL Glicose + Gox	A1	395877,62839	19573,03805	69,83
	τ_1	0,07132	0,00197	
	A2	36073,95718	19108,45165	
	τ_2	0,02721	0,00913	
3Eu:1Tc + 200 mg/dL Glicose + Gox	A1	88095,33658	71256,06906	74,09
	τ_1	0,04264	0,01071	
	A2	364994,19201	70906,74260	
	τ_2	0,07823	0,00528

Figura 39 - Tempo de vida do complexo EuCTc com diferentes concentrações de Glicose acrescidas de Gox.

Tabela 14 - Parâmetros da dupla exponencial e tempo de vida do complexo EuCTc com diferentes concentrações de Glicose acrescidas de Gox.

Complexo EuCTc	Parâmetros	Valor	Erros	$\tau_{av}(\mu s)$
4Eu:1CTc + 0 mg/dL Glicose + Gox	A1	72832,03257	198,45849	23,04
	τ_1	0,01081	0,00008	
	A2	5864,51364	206,69803	
	τ_2	0,05365	0,00145	
4Eu:1CTc + 50 mg/dL Glicose + Gox	A1	15697,85126	520,36288	31,48
	τ_1	0,05791	0,00143	
	A2	98849,54040	331,70868	
	τ_2	0,01355	0,00012	
4Eu:1CTc + 70 mg/dL Glicose + Gox	A1	105213,99684	639,21869	36,66
	τ_1	0,01407	0,00022	
	A2	22347,84784	968,24062	
	τ_2	0,06115	0,00208	
4Eu:1CTc + 100 mg/dL Glicose + Gox	A1	27292,34207	1047,50260	41,08
	τ_1	0,06431	0,00201	
	A2	104849,44526	722,82028	
	τ_2	0,01478	0,00024	
4Eu:1CTc + 150 mg/dL Glicose + Gox	A1	109849,01646	606,36756	48,94
	τ_1	0,01573	0,00019	
	A2	36639,60353	828,09009	
	τ_2	0,07101	0,00145	
4Eu:1CTc + 200 mg/dL Glicose + Gox	A1	108472,36126	1411,83128	49,97
	τ_1	0,01580	0,00043	
	A2	44996,56435	1923,16881	
	τ_2	0,06888	0,00253

Figura 40 - Tempo de vida do complexo EuOTc com diferentes concentrações de Glicose acrescidas de Gox.

Tabela 15 - Parâmetros da dupla exponencial e tempo de vida do complexo EuOTc com diferentes concentrações de Glicose acrescidas de Gox.

Complexo EuOTc	Parâmetros	Valor	Erros	$\tau_{av}(\mu s)$
4Eu:1OTc + 0 mg/dL Glicose + Gox	A1	92805,64026	7640,52093	57,83
	τ_1	0,02675	0,00124	
	A2	200902,32308	7841,81219	
	τ_2	0,06385	0,00118	
4Eu:1OTc + 50 mg/dL Glicose + Gox	A1	34493,90438	11189,90736	95,31
	τ_1	0,00716	0,00195	
	A2	516263,77842	595,05360	
	τ_2	0,09576	0,00023	
4Eu:1OTc + 70 mg/dL Glicose + Gox	A1	25886,81210	2044,08315	101,42
	τ_1	0,01236	0,00224	
	A2	556456,83466	1174,14417	
	τ_2	0,10193	0,00042	
4Eu:1OTc + 100 mg/dL Glicose + Gox	A1	610676,00934	862,34273	106,94
	τ_1	0,10736	0,00040	
	A2	36465,36600	15303,10396	
	τ_2	0,00750	0,00280	
4Eu:1OTc + 150 mg/dL Glicose + Gox	A1	642610,02664	777,36218	114,12
	τ_1	0,11459	0,00042	
	A2	40688,66998	11242,39342	
	τ_2	0,00801	0,00216	
4Eu:1OTc + 200 mg/dL Glicose + Gox	A1	666793,47878	1273,20596	120,19
	τ_1	0,12074	0,00075	
	A2	41634,51733	9365,40061	
	τ_2	0,00951	0,00276	

CONCLUSÕES

Neste trabalho foram realizados estudos espectroscópicos dos complexos európio-clorotetraciclina, európio-metaciclina e európio-oxitetraciclina na presença de peróxido de hidrogênio e peróxido de uréia. Os resultados obtidos foram comparados ao complexo európio-tetraciclina, este bastante estudado no meio científico.

Todos os complexos estudados (EuOTc, EuCTc e EuMTc) apresentaram as características típicas de um complexo lantanídeo-ligante: um grande deslocamento Stokes (aproximadamente 220 nm) importante para evitar a sobreposição dos espectros de excitação e emissão; amplo espectro de absorção com pico em torno de 400 nm com estreita banda de emissão em 615 nm com forte luminescência em pH neutro.

Na presença dos peróxidos os espectros de absorção e emissão característicos se mantêm, porém com há aumento significativo na luminescência. Os complexos citados anteriormente foram comparados com o complexo EuTc.

Os resultados do complexo com PH e PHU podem ser resumidos na Tabela 16. A intensidade relativa corresponde à intensidade máxima de emissão com peróxido/ intensidade da emissão sem peróxido.

Tabela 16 – Resumo dos resultados obtidos nos estudos com peróxido de hidrogênio e peróxido de uréia.

Complexo		Intensidade Relativa	Linearidade (μM)	Limite de Detecção (mg/mL)	Tempo de Vida (μs)
PH	EuTc	7,0	0-600	0,17	68,12
	EuOTc	4,0	0-600	0,12	95,13
	EuCTc	7,2	100-700	0,06	17,26
	EuMTc	0,0	-	-	54,22
PHU	EuTc	7,0	0-1000	0,07	70,87
	EuOTc	4,5	0-500	0,24	85,57
	EuCTc	3,0	200-1000	0,08	12,83
	EuMTc	0,0	-	-	53,06

Os complexos EuTc-PH e EuCTc-PH foram os que obtiveram maior aumento na luminescência de até 7 vezes mais comparado ao complexo sem o peróxido. Todos os complexos apresentaram praticamente o mesmo intervalo de linearidade e bons resultados no limite de detecção sendo o complexo EuCTc-PH que obteve melhor resultado, 0,06 mg/mL. O tempo de vida das amostras EuTc-PH e EuOTc-PH praticamente dobraram o seu tempo de vida de fluorescência em relação às amostras sem peróxido. Somente a EuCTc-PH não sofreu aumento significativo no tempo de decaimento e o EuMTc-PH teve seu tempo de vida diminuído.

O complexo EuTc-PHU obteve melhor resultado. Apresentou maior aumento na luminescência, um aumento de 7 vezes, com linearidade ao longo de toda a curva de calibração, menor limite de detecção no valor de 0,07 mg/mL e dobrou seu tempo de decaimento. O complexo EuCTc apresentou um bom resultado. Mostrou-se relativamente linear em um grande intervalo e com baixo limite de detecção, com aumento de 4,5 vezes na luminescência. O tempo de vida diminuiu em relação à amostra sem o peróxido. O complexo EuOTc apresentou um pequeno aumento (3 vezes) na emissão com uma menor linearidade comparado aos anteriores, o maior limite de detecção, porém o tempo de decaimento aumentou consideravelmente.

Para ambos os peróxidos observa-se que o complexo EuOTc mostrou um longo tempo de vida, em torno de 90 μ s.

O aumento da emissão com a adição do peróxido de hidrogênio ou com peróxido de uréia ocorre devido à substituição de moléculas de água nos sítios de coordenação do íon európio e a oxidação da tetraciclina pelo peróxido permitindo a complexação de mais íons Eu^{3+} nos sítios da tetraciclina. Os peróxidos também promovem uma reorganização estrutural do complexo em solução aproximando o íon metálico central com os ligantes orgânicos aumentando a eficiência na transferência de energia intramolecular. No complexo EuMTc não há alteração na emissão mesmo em presença de peróxidos, possivelmente porque não há um aumento no número de sítios de ligação da molécula.

Foi observado nos estudos com interferentes inorgânicos que estes compostos não promovem interferência significativa no sinal de emissão, pois

considerando o aumento da luminescência em relação ao complexo EuTC sem a presença dos peróxidos, a interferência torna-se irrelevante.

Assim um biossensor para PH e PHU mostra-se possível também para os complexos EuCTc e EuOTc. No caso do PHU o complexo EuTc ainda mostrou-se como a melhor opção para a detecção do peróxido, possibilitando a criação de um método mais rápido, direto e de menor custo que pode ser realizado em temperatura ambiente e ser observado sem a necessidade de condições especiais, já que a emissão da luz é em uma região visível.

Os complexos EuCTc e EuOTc também mostraram-se eficientes na detecção de glicose. O método baseia-se na adição da enzima glicose oxidase que promove a quebra da glicose em ácido glicônico e peróxido de hidrogênio, que em presença do complexo EuTC possui forte luminescência na região de 615 nm. Todos os complexos apresentaram um aumento na emissão, baixo limite de detecção e relativa linearidade até aproximadamente 125 mg/dL de glicose. Foi observado nos experimentos um aumento gradativo no tempo de vida conforme o aumento da concentração de glicose na amostra. O complexo EuOTc para 200 mg/dL de glicose mostrou um tempo de vida de 120 μ s, o dobro do valor obtido sem a presença de glicose. Logo o método para determinação de glicose é promissor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ WEISSMAN, S. I. Intramolecular energy transfer – The fluorescence of complexes of europium. **J. Chem. Phys.**, v. 10, n. 4, p. 214-217, 1942.
- ² HIRSCHY, L.M.; DOSE, E.V.; WINEFORDNER, J.D. Lanthanide-sensitized luminescence for the detection of tetracyclines. **Anal. Chim. Acta**, v. 147, n. MAR, p. 311-316, 1983.
- ³ ARNAUD, N.; GEORGES, J. Comprehensive study of the luminescent properties and lifetimes of Eu³⁺ and Tb³⁺ chelated with various ligands in aqueous solutions: influence of the synergic agent, the surfactant and the energy level of the ligand triplet. **Spectrochim. Acta A.**, v. 59, n. 8, p. 1829-1840, 2003.
- ⁴ MATTOS, I.L.; SHIRAISHI, K.A.; BRAZ, A.D.; FERNANDEZ, J.R. Hydrogen Peroxide: importance and determination. **Quim. Nova**, v. 26, n. 3, p. 373-380, 2003.
- ⁵ SINENSKY, M.C.; LEISER, A.L.; BABICH, H. Oxidative stress aspects of the cytotoxicity of carbamide peroxide: in vitro studies. **Toxicol. Lett.**, n. 75, p.101-109, 1995.
- ⁶ WOLFBEIS, O. S.; DÜRKOP, A.; WU, M.; LIN, Z. Europium ion-based luminescent sensing probe for hydrogen peroxide. **Angew. Chem. Int.**, n. 41, p. 4495–4498. 2002.
- ⁷ COURROL, L. C.; SILVA, F. R. D.; TARELHO, L. V. G.; BELLINI, M. H.; MANSANO, R. D.; GOMES, L.; VIEIRA, N. D. Enhancement of europium luminescence in tetracycline-europium complex in the presence of urea hydrogen peroxide. **J. Fluoresc.**, v. 15, n. 5, p.667-671, 2005.
- ⁸ MARTINS, T. S.; ISOLANI, P. C. Rare earths: Industrial and biological applications. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 111-117, 2005.
- ⁹ ROSENTAL, S.; **Terras-Raras**, CETEM/CNPq: Rio de Janeiro, Brasil, 2008.
- ¹⁰ DE SÁ, G. F.; MALTA, O. L.; DE MELLO DONEGÁ, C.; SIMAS, A. M.; LONGO, R. L.; SANTA-CRUZ, P.A.; DA SILVA, E. F. Spectroscopic properties and design of highly luminescent lanthanide coordination complexes. **Coordin. Chem. Rev.**, v. 196, n. 1, p. 165-195, 2000.
- ¹¹ SABBATINI, N.; GUARDIGLI, M.; MANET, I.; UNGARO, R.; CASNATI, A.; ZIESSEL, R.; ULRICH, G.; ASFARI, Z.; LEHN, J. M. Lanthanide Complexes Encapsulating ligands – luminescent devices at the molecular level. **Pure Appl. Chem.**, v. 67, n. 1, p. 135-140, 1995.
- ¹² MAAS, H.; CURRAO, A.; CALZAFERRI, G. Encapsulated Lanthanides as Luminescent Materials. **Angew. Chem. Int.** v. 41, n. 14, p. 2495-2497, 2002.
- ¹³ SELVIN, P.R.; JANCARIK, J.; LI, M.; HUNG, L. Crystal Structure and Spectroscopic Characterization of a Luminescent Europium Chelate. **Inorg. Chem.** v. 35, n. 3, p. 700-705, 1996.
- ¹⁴ HORROCKS, W.; SUDNICK, D.R. Lanthanide Ion Luminescence Probes of the Structure of Biological Macromolecules. **Am Chem. Soc.** v. 14, p 376-384, 1981.

- ¹⁵ TURRO, C.; FU, P.K.L.; BRADLEY, P.M. **Lanthanide Ions as Luminescent Probes of Proteins and Nucleic Acids**. Departamento de química da Universidade de Ohio. USA.
- ¹⁶ DURKOP, A. **Luminescent Metal-Ligand Complexes as Labels for Polarization Immunoassays and for determination of Hydrogen Peroxide**. 2001. Tese (Doutorado) – Faculdade de Química e Farmácia da Universidade de Regensburg, Alemanha.
- ¹⁷ BROWN, T.L.; LEMAY, H.E.; BURSTEN, B.E. **Química a Ciência Central**. 9. ed. São Paulo: Pearson Education, 2005. p. 884-889.
- ¹⁸ LIS, S.; ELBANOWSKI, M.; HNATEJKO, Z. Energy transfer in solution of lanthanide complexes. **J. Photoch. Photobio. A.**, v. 150, n.1-2, p. 233-247, 2002.
- ¹⁹ LIS, S. Luminescence spectroscopy of lanthanide(III) ions in solution. **J. Alloy Compd.**, v. 341, n. 1-2, p. 45-50, 2002.
- ²⁰ CHEN, J. Y.; SELVIN, P. R. Lifetime- and color-tailored fluorophores in the micro- to millisecond time regime. **J. Am. Chem.Soc.**, v. 122, n. 4, p. 657-660, 2000.
- ²¹ SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 988.
- ²² CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiol. Mol.Biol. R.**, v. 65, n. 2, p. 232-260, 2001.
- ²³ KURITTU, J. *et al.* Detection of tetracyclines with luminescent bacterial strains. **Luminescence**, v. 15, n. 5, p. 291-297, 2000.
- ²⁴ HANG H.P.; DALE N.M.; RITTER J.M. **Farmacologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 366.
- ²⁵ ZHAO, F. N.; ZHANG, XZ; GAN, YR. Determination of tetracyclines in ovine milk by high-performance liquid chromatography with a coulometric electrode array system. **J. Chromatogr. A**, v. 1055, n. 1-2, p. 109-114, 2004.
- ²⁶ SACHAN, N. P.; GUPTA, C.M. **Talanta**, v. 27, p. 457, 1980.
- ²⁷ CROSBY, G.A.; WHAN R.E.; ALIRE R.M. Intramolecular energy transfer in rare earth chelates – role of triplet state. **J. Chem.I Phys.**, v. 34, n. 3, p. 743-747, 1961.
- ²⁸ CROSBY, G.A.; WHAN R.E.; FREEMAN J.J. Spectroscopic studies of rare earth chelates. **J. Phys. Chem.**, v. 66, n. 12, p. 2493-&, 1962.
- ²⁹ RICHARDSON, F. S. Terbium(III) and Europium(III) ions as luminescent probes and stains for biomolecular systems. **Chem. Rev.**, v. 82, n. 5, p. 541-552, 1982.
- ³⁰ HIRSCHY, L.M.; VANGEEL, T.F.;WINEFORDNER, J D.;KELLY, R N.;SCHULMAN, S.G. Characteristics of the binding of europium(III) to tetracycline. **Anal. Chim. Acta**, v. 166, n. 12, p. 207-219, 1984.

- ³¹ SELVIN, P. R. Lanthanide-based resonance energy transfer. *Ieee J. Sel. Top. Quant.*, v. 2, n. 4, p. 1077-1087, 1996.
- ³² DIAMANDIS, E.P.; CHRISTOPOULOS, T.K. Europium chelate labels in time-resolved fluorescence immunoassays and DNA hybridization assay. *Anal. Chem.*, v. 62, n. 22, p.1149A-1157A, 1990.
- ³³ GEORGES, J. Lanthanide-sensitized luminescence and applications to the determination of organic analytes, *Analyst*, v. 118, n.12, p. 1481- 1486, 1993.
- ³⁴ SELVIN, P. R. Principles and biophysical applications of lanthanide-based probes. *Annu. Rev. Bioph. Biom.*, v. 31, p. 275-302, 2002.
- ³⁵ YATSIMIRSKII, K. B.; DAVIDENKO, N. K. Absorption spectra and structure of lanthanide coordination compounds in Solution. *Coordin. Chem. Rev.*, v. 27, n. 3, p. 223-273, 1979.
- ³⁶ ARNAUD, N.; GEORGES, J. Sensitive detection of tetracyclines using europium-sensitized fluorescence with EDTA as co-ligand and cetyltrimethylammonium chloride as surfactant. *Analyst*, v. 126, n. 5, p. 694-697, 2001.
- ³⁷ RODRIGUEZ-DIAZ, R.C.; AGUILAR-CABALLOS, M.P.; GOMEZ-HENS, A. Simultaneous determination of ciprofloxacin and tetracycline in biological fluids based on dual-lanthanide sensitised luminescence using dry reagent chemical technology. *Anal. Chim. Acta*, v. 494, n. 1-2, p. 55-62, 2003.
- ³⁸ WU, M.; LIN, Z.; SCHAFERLING, M.; DURKOP, A.; WOLFBEIS, O.S. Fluorescence imaging of the activity of glucose oxidase using a hydrogen peroxide sensitive europium probe. *Anal Biochem.*, v. 340, p. 66-73, 2005.
- ³⁹ ZHU, X.; WANG, X.; JING, C. Spectrofluorimetric determination of heparin using a tetracycline europium, *Probe. Anal Biochem.*, v. 341, n. 2, p. 299-307, 2005.
- ⁴⁰ COURROL, L. C.; BELLINI, M. H.; TARELHO, L. V. G.; SILVA, F. R. O.; MANSANO, R. D.; GOMES, L.; VIEIRA, N. D.; SHOR, N. Urea hydrogen peroxide determination in whole blood using europium tetracycline probe. *Anal. Biochem.*, v. 355, n. 1, p. 140-144, 2006.
- ⁴¹ ZEPP, R. G.; FAUST, B.C.; HOIGNE, J. Hydroxyl radical formation in aqueous reactions (pH 3-8) of iron (II) with hydrogen-peroxide – the photo-fenton reaction. *Environ. Sci. Technol.*, v. 26, n. 2, p. 313-319, 1992.
- ⁴² ZEPP, R. G.; SCHLOTZHAUER, P. F.; SINK, R. M. Photosensitized transformations involving electronic-energy transfer in natural waters – role of humic substances. *Environ. Sci. Technol.*, v. 19, n. 1, p. 74-81, 1985.
- ⁴³ PRICE, D.; WORSFOLD, P.J.; MANTOURA, R. F. C. Hydrogen-peroxide in the marine environment – cycling and methods of analysis. *Trac-Trend Anal. Chem.*, v. 11, n. 10, p. 379-384, 1992.
- ⁴⁴ THOMPSON, A. M. The oxidizing capacity of the earth's atmosphere – probable past and

the future changes. **Science**, v. 256, n. 5060, p. 1157-1165, 1992.

⁴⁵ ANGLADA, J. M.; APLINCOURT, P.; BOFILL, J. M.; CREMER, D. Atmospheric formation of OH radicals and H₂O₂ from alkene ozonolysis under humid conditions. **Chemphyschem**, v. 3, n. 2, p. 215-221, 2002.

⁴⁶ CHEN, J.; RULKENS, W. H.; BRUNING, H. Photochemical elimination of phenols and COD in industrial wastewaters. **Water Sci. Technol.**, v. 35, n. 4, p. 231-238, 1997.

⁴⁷ VIJAYAKUMAR, A. R.; CSOREGI, E.; HELLER, A.; GORTON, L. Alcohol biosensors based on coupled oxidase-peroxidase systems. **Anal. Chim. Acta**, v. 327, n. 3, p. 223-234, 1996.

⁴⁸ WU, M.; LIN, Z. H.; DURKOP, A.; WOLFBEIS, O. S. Time-resolved enzymatic determination of glucose using a fluorescent europium probe for hydrogen peroxide. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 380, n. 4, p. 619-626, 2004.

⁴⁹ TKAC, J.; STURDIK, E.; GEMEINER, P. Novel glucose non-interference biosensor for lactose detection based on galactose oxidase-peroxidase with and without co-immobilised beta-galactosidase. **Analyst**, v. 125, n. 7, p. 1285-1289, 2000.

⁵⁰ GORENEK, G.; AKYILMAZ, E.; DINCKAYA, E. Immobilization of catalase by entrapping in alginate beads and catalase biosensor preparation for the determination of hydrogen peroxide decomposition. **Artif. Cell Blood Sub.**, v. 32, n. 3, p. 453-461, 2004.

⁵¹ WU, M.; LIN, Z.; WOLFBEIS, O. S. Determination of the activity of catalase using a europium(III)-tetracycline-derived fluorescent substrate. **Anal. Biochem.**, v. 320, n. 1, p. 129-135, 2003.

⁵² RAKICIOGLU, Y.; PERRIN, J. H.; SCHULMAN, S. G. Increased luminescence of the tetracycline-europium(III) system following oxidation by hydrogen peroxide. **J. HParm. Biomed. Anal.**, n. 20, p. 397-399, 1999.

⁵³ LEI, W.; DUERKOP, A.; WU, M.; WOLFBEIS, O. S. Determination of hydrogen peroxide in river water using a europium tetracycline microplate luminescence assay with time-resolved ("gated") detection. **Microchim. Acta**, n. 143, p. 269-274, 2003.

⁵⁴ OSZWALDOWSKI, S.; LIPKA, R.; JAROSZ, M. Sensitive reversed-phase liquid chromatographic determination of hydrogen peroxide and glucose based on ternary vanadium(V)-hydrogen peroxide-2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol system. **Anal. Chim. Acta**, v. 421, n. 1, p. 35-43, 2000.

⁵⁵ HANKS, C. T.; FAT, J. C.; WATAHA, J. C.; CORCORAN, J. F. Cytotoxicity and Dentin Permeability of Carbamide Peroxide and Hydrogen Peroxide Vital Bleaching Materials, in vitro. **J. Dent. Res.**, v. 72, n. 5, p. 931-938, 1993.

⁵⁶ SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana** – uma abordagem integrada. 2 ed. São Paulo: Manole, 2003.

⁵⁷ MOH, A.; SAKATA, N.; TAKEBAYASHI, S.; TATEISHI, K.; NAGAI, R.; HORIUCHI, S.; CHIHARA, J. Increased production of urea hydrogen peroxide from Maillard reaction and a

UHP-Fenton pathway related to glycoxidation damage in chronic renal failure. **J.Am. Soc. Nephrol.**, v. 15, n. 4, p. 1077-1085, 2004.

⁵⁸ MONNIER, V.M.; SELL, D.R.; NAGARAJ, R.H.; MIYATA, S.; GRANDHEE, S.; ODETTI, P.; IBRAHIM, S. A maillard reaction-mediated molecular damage to extracellular-matrix and other tissue proteins in diabetes, aging and uremia. **Diabetes**, v. 41, p. 36-41, 1992.

⁵⁹ ALBERTI, K.G.M.M.; ZIMMET, P.Z., for the World Health Organization Consultation. **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications**. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of a WHO Consultation. Geneva: WHO; 1999.

⁶⁰ The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus**, Diabetes Care. v. 25, supplement 1, p. S5-S20, 1997.

⁶¹ GROSS, Jorge L.; SILVEIRO, S.P.; CAMARGO, J.J.; REICHELT, A.J. Diabetes Mellito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 46, n. 1, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302002000100004&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 30 abr. 2010.

⁶² WALKER, H.K.; HALL, W.D.; HURST J.W. **Clinical Methods: the history, physical and laboratory examinations**. 3.ed. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cm&part=A4187>>. Acesso em: 30 abr. 2010.

⁶³ MOTTA, V.T. **Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações**. v.7. Disponível em: <<http://www.labclinisul.com.br/artigos/Bioq.Clinica%20-%20Carboidratos.pdf>>. Acesso em: 30 abr. 2010.

⁶⁴ SEILER, H.G.; SIGEL, A.; SIGEL, H. **Handbook on metals in clinical and analytical chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1994.

⁶⁵ GITELMAN, H. J. **Aluminum and Health: a critical review**. Nova York: Marcel Dekker, 1989.

⁶⁶ ANDRIOLO, A. **Guia de medicina ambulatorial e hospitalar da UNIFESP**. São Paulo: Manole, 2006. p. 256.

⁶⁷ MANUAL MERCK. Exames Laboratoriais e de Diagnóstico Comuns. Disponível em: <http://mmspf.msdonline.com.br/pacientes/manual_merck/secao_00/apendice_II.html>. Acesso em: 5 Mar. 2010.

⁶⁸ PERRELLI, G.; PIOLATTO, G. Tentative reference values for gold, silver and platinum: literature data analysis. **Sci. Total Environ**, v. 120, n. 1-2, p.93-96, 1992.

⁶⁹ BRASIL. ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 3

Mar. 2010.