

ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DE COMPLEXOS TETRACICLINA-LANTANÍDEOS PARA APLICAÇÕES BIOLÓGICAS

Flávia Rodrigues de Oliveira Silva*, Lilia Coronato Courrol**, Ronaldo D. Mansano*, Luis Vicente Gomes Tarelho***, Laércio Gomes***, Nilson Dias Vieira Júnior***

*LSI/EPUSP, São Paulo, SP, Brasil,

**FATEC-SP/CEETEPS, São Paulo, SP, Brasil,

***Centro de Lasers e Aplicações, IPEN/CNEN-SP, São Paulo, SP –Brasil.

e-mail: flavia.rodrigues@poli.usp.br

Resumo

Comparado com os materiais fluorescentes orgânicos tradicionais, os compostos de lantanídeos apresentam algumas características que os tornam atrativos por aumentarem a seletividade e sensibilidade em bioanálise: grandes “stokes-shift”, a forte intensidade de fluorescência da banda principal do complexo e tempo de decaimento longo. E Apresentam uma gama de aplicações: são usados como marcadores luminescentes em imunologia (fluoroimunoanálise), em Ressonância Magnética (imagens), em cromatografia gasosa, em cromatografia líquida de adsorção, em análises espectrofotométricas e como antioxidantes, determinação de peróxido de hidrogênio [5], entre outras. A determinação H_2O_2 tem uma variedade grande de aplicações, por exemplo, como sensor de glicose, baseado no aumento da luminescência de um complexo tetraciclina-lantanídeo devido ao H_2O_2 gerado enzimaticamente em concentrações fisiológicas de glicose.

Foi verificado também um aumento na luminescência do complexo tetraciclina-európio (EuTc) na presença de peróxido do uréia adicionado à solução aquosa de tetraciclina-európio.

As soluções foram preparadas com pH neutro e a luminescência visível dos lantanídeos foi detectada após uma incubação das amostras por 10 minutos.

Parâmetros ópticos como, absorção e a secção de choque de emissão, tempo de vida do Ln, índice de refração, densidade e probabilidade de transferência de energia foram obtidos.

Palavras-chave: lantanídeos, tetraciclina, peróxido de hidrogênio, transferência de energia, fluorescência.

Introdução

As propriedades luminescentes dos íons trivalentes de lantanídeos (Ln^{3+}) em soluções aquosas foram estudadas com a finalidade de desenvolver marcadores fluorescentes para aplicações [1] biomédicas. Embora tenham coeficientes de absorção fracos, é possível obter uma alta luminescência de complexos lantanídicos quelando estes íons fortemente na estrutura da tetraciclina. As tetraciclinas (figura 1) têm diversos grupos próton-ativos que oferecem possibilidades diferentes de complexação dos íons de lantanídeos

dependendo do pH [2]. Nestes sistemas, intensa luminescência do íon origina-se da transferência de energia intramolecular através do estado excitado do ligante ao nível de emissão do íon Ln^{3+} [3].

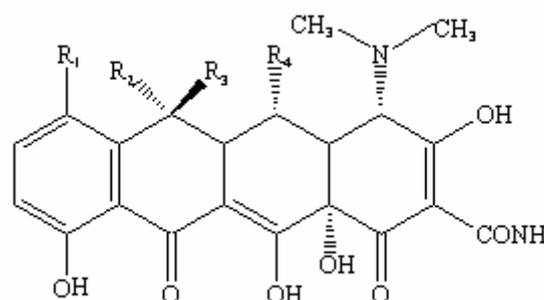


Figura 1 – Tetraciclina

Fórmula Molecular: $C_{22}H_{24}N_2O_8$

A luminescência dos íons lantanídeos provenientes das camadas 4f é eficientemente utilizada como alternativa aos marcadores fluorescentes moleculares, particularmente onde existem problemas de autofluorescência devido a suas propriedades ópticas características. Estas características incluem tempos de vida da fluorescência da ordem de mili ou microssegundos, emissões estreitas (<10 nm), grandes ‘Stokes-shift’, ausência de auto absorção, alta eficiência quântica (~1) e excelente solubilidade [4].

Um aumento significativo na luminescência dos lantanídeos particularmente nos complexos de tetraciclina-Európio (III), foi observado na presença do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) [5]. Este efeito pode ser usado para melhorar os limites de detecção na determinação da tetraciclina, mas parece ter um potencial ainda maior na biomedicina desde que quase todas as oxidases (enzimas) produzem H_2O_2 durante suas atividades [6]. Esse é também o primeiro marcador fluorescente a base de lantanídeo que pode ser excitado por laser de diodo de 405nm.

Neste trabalho nós estudamos as propriedades ópticas dos complexos tetraciclina-lantanídeo (Európio, Térbio, Itérbio, Neodímio, Hólmio e Érbio). Uma vez que os espectros de absorção destes lantanídeos ocorrem no visível, e infravermelho próximo, estudando complexos de tetraciclina-lantanídeo (LnTc) é possível mapear as melhores condições para obter uma formação eficiente do complexo.

Materiais e Métodos

Todos os sais inorgânicos eram de pureza analítica e foram obtidos do Sigma Aldrich e Molecular Probe. Todas as soluções foram preparadas em 13 mmol L⁻¹ 3-(N-Morpholino) ácido propanesulfônico (Mops de Carl Roth, Alemanha). A tetraciclina-HCl usada era padrão secundário gentilmente fornecida pela Indústria Farmacêutica Bunker Ltda. O peróxido de uréia 16% usado neste trabalho é uma composição de 16% de peróxido de uréia, 3% de Nitreto de Potássio 0,11% de Flúor da F & A Laboratório Farmacêutico Ltda.

Solução I: 2,7 g do Mops em 100 mL de água destilada com NaOH para ajustar o pH a 6.9.

Solução II: 63 mmol L⁻¹ de Ln³⁺ (Eu, Tb, Er, Ho, Nd, Yb). Correspondente a massa em gramas de LnCl₃.6H₂O em 10 mL da solução de Mops.

Solução III: 21 mmol L⁻¹ de solução de tetraciclina.

50,5 mg de tetraciclina em 50 mg de hidróclorato de tetraciclina em 10 mL da solução de Mops.

Solução IV: solução LnTc.

Misturamos 10 mL da solução II com 10 mL da solução III.

Os espectros de absorção de todas as amostras foram medidos em temperatura ambiente na escala 200 nm - 2500 nm usando um Espectrômetro Varian Cary 17 D. Os espectros de emissão foram obtidos excitando as amostras, após uma incubação de 10 minutos, pois a reação do peróxido é lenta, com uma lâmpada Xenônio de 300 watts. As emissões das amostras foram analisadas com um monocromador de 0,5 m (Spex) e detectados por uma Fotomultiplicadora. O sinal foi amplificado com um amplificador de sinal e frequência EG&G 7220 e processado por um computador.

Para determinar os tempos de vida foi usado um sistema da excitação que consiste em um oscilador paramétrico óptico ajustável (OPO de OPOTEK) bombeado pelos segundo e terceiro harmônicos de um laser Nd-YAG Q-switched da Quantel. Este sistema laser entrega pulsos de 20 mJ com duração de tempo de 4 ns e taxa da repetição de 10 Hz, e pode ser ajustado de 0,41 μm a 2,0 μm. Os tempos de vida de luminescência dos lantanídeos foram detectadas por uma fotomultiplicadora S-20 e analisados usando amplificador de sinal em evolução temporal (PAR 4402), e osciloscópio digital de 200 MHz Tektronix TDS 410. Os erros relativos nas medidas da emissão foram estimados para ser < 5% enquanto que os erros nas medidas do tempo de vida são < 10%.

Os índices de refração foram obtidos com um refratômetro de Zeiss Abbe e as densidades foram obtidas pelo método de Arquimedes.

Resultados

O espectro da solução III, tetraciclina em solução de água destilada e MOPs está representada na figura 2. Verificamos a partir deste espectro que a tetraciclina apresenta três bandas de absorção na

região do ultravioleta em torno de 249, 278 e 360 nm. Os espectros de absorção óptica de todas as soluções Lantanídeos-tetraciclina (LnTc) foram obtidos e são mostrados na Figura 3. Nessa figura nós observamos que os lantanídeos em estudo, Európio (Eu), Érbio (Er), Neodímio (Nd), Térbio (Tb) e Itérbio (Yb) podem formar complexos com a molécula da tetraciclina. Em todos os complexos LnTc, a banda de absorção da tetraciclina deslocou-se para a região do visível quando perturbada pelo íon lantanídeo. Quando comparado com a banda de absorção da tetraciclina, mostrada na figura 9, o complexo YbTc teve a menor alteração, ~ 5 nm, e o complexo EuTc teve a maior alteração, ~ 40 nm. A concentração de íons de lantanídeos é extremamente pequena e somente a banda da tetraciclina é observada no espectro de absorção.

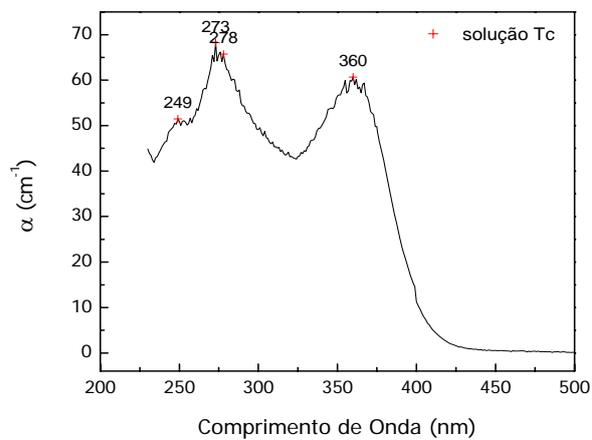


Figura 2 - Absorção óptica da tetraciclina.

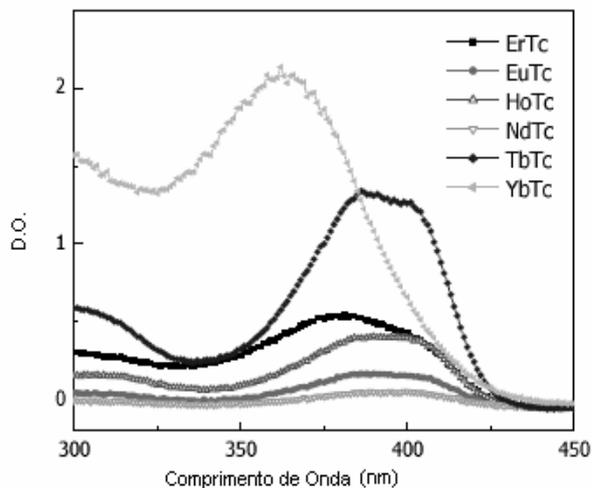


Figura 3. Absorção óptica de complexos LnTc.

Nessa figura nós observamos que os lantanídeos em estudo: Európio (Eu), Érbio (Er), Neodímio (Nd), Térbio (Tb) e Itérbio (Yb) podem formar complexos com a molécula da tetraciclina. Em todos os complexos LnTc, a banda de absorção da tetraciclina deslocou-se para esquerda quando

perturbada pelo íon do lantanídeo. O complexo YbTc teve a menor alteração, ~ 5 nm, e o complexo EuTc teve a maior alteração, ~ 40 nm. A concentração de íons de lantanídeos é extremamente pequena e somente a banda da tetraciclina é observada no espectro de absorção.

Para verificarmos qual o a melhor lantanídeo para formação do complexo com a tetraciclina, obtivemos o espectro de emissão da tetraciclina, que ocorre em torno de 520 nm (figura 4), e essa excitação é transferida ao íon de lantanídeo que emite luz com suas principais propriedades. Os lantanídeos estudados, Eu, Er, Ho e Nd têm banda de absorção na faixa de emissão da tetraciclina, já a banda absorção do Tb e Yb tem pouca ressonância com essa banda de emissão.

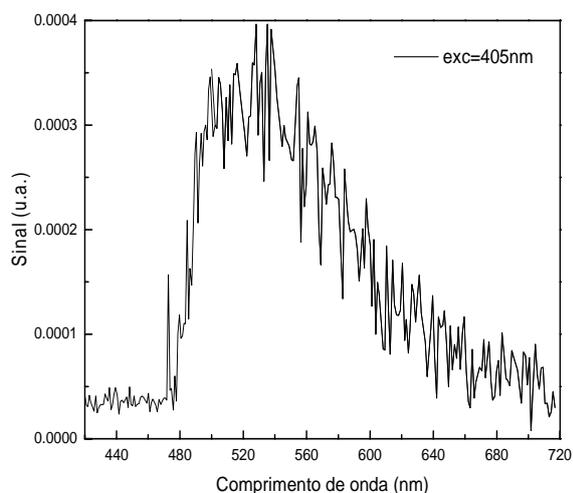


Figura 4. Emissão da Tetraciclina excitada a 405 nm

Como pode ser observado na figura abaixo (figura 5) o Európio tem seu nível de energia de absorção 5D_0 na mesma faixa de energia que ocorre a emissão da tetraciclina, isso significa que a absorção do Eu tem muita ressonância com a emissão da Tc, por outro lado o próximo nível de energia do Európio 7F_6 está distante o suficiente para que haja uma grande probabilidade da energia ser emitida em forma de fóton, ou seja, ocorre uma transição radiativa. Lembrando que as transições dipolo-elétricas seguem as seguintes regras de seleção: $\Delta J = 0, \pm 2, \pm 4, \pm 6$, excluindo $0 \leftrightarrow 0$.

Enquanto que no caso do Er, Ho e Nd há grandes chances dessa energia ser perdida em forma de calor (transição não-radiativa) justamente por que os níveis de energia são muito próximos. Já o Tb e o Yb, como dito anteriormente, não têm ressonância com a tetraciclina.

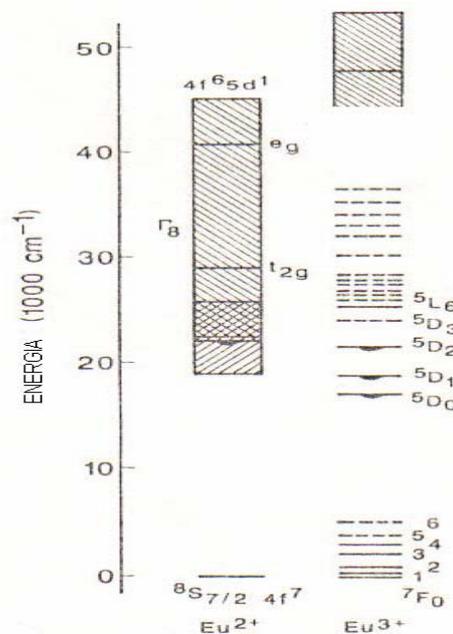


Figura 5 – Diagrama de energia do Európio

A intensidade da luminescência do Európio, cujos níveis de energia são mostrados na Figura 5, origina-se da transferência de energia intramolecular através do estado excitado da tetraciclina ao nível de emissão do Eu^{3+} . O processo de transferência de energia ressonante ocorre quando um doador em um estado eletronicamente excitado transfere sua energia de excitação a um aceitador vizinho. Se o espectro de emissão da molécula doadora sobrepuser o espectro de absorção do íon aceitador, e os dois estiverem dentro de um raio espacial mínimo, o doador tem uma probabilidade elevada de transferir sua energia de excitação ao aceitador através do acoplamento intermolecular dipolo-dipolo de longo alcance.

Uma teoria proposta por Theodor Förster [8] em 1940 descreveu inicialmente as interações moleculares envolvidas em transferência de energia ressonante. Förster desenvolveu também uma equação formal definindo o relacionamento entre a taxa de transferência, a distância entre cromóforos, e as propriedades espectrais dos cromóforos envolvidos.

Usando a teoria de Förster de transferência de energia, um processo não radiativo, para os complexos de tetraciclina-európio (EuTc) nós obtivemos diversos parâmetros importantes. O microparâmetro (C_{DA}) envolvido em transferência de energia dos estados excitados do doador (Tc) ao aceitador (Eu^{3+}) pode ser calculado por:

$$C_{DA} = \frac{R_c^{6(D-A)}}{\tau_D}$$

onde τ_D é o tempo de vida total do estado do doador sem a presença do aceitador. O raio crítico R_c é calculado usando o método da sobreposição das seções de choque de emissão (doador) e absorção

(aceitador) usando a seguinte expressão válida para transferência de energia ressonante:

$$R_c^6 = \frac{6c\tau_D}{(2\pi)^4 n^2} S(\lambda)$$

onde c é a velocidade de luz, n é o índice de refração do meio, e $S(\lambda)$ é a integral da sobreposição entre a secção de choque de emissão e absorção do doador e do aceitador ($4,88 \times 10^{-32} \text{ cm}^2$), respectivamente, calculados para transferência de $D-A$. A secção de choque da emissão do Tc foi obtida da emissão mostrada na figura 2:

$$\sigma_e(\lambda) = \frac{\lambda^4}{n^2 8\pi c \tau_R} \frac{SE(\lambda)}{\int SE(\lambda) d\lambda}$$

onde n é o índice de refração do complexo EuTc, $SE(\lambda)$ é o espectro de emissão, τ_R é o tempo de vida radiativo (considerada transição permitida dipolo-dipolo de $\sim 10\text{ns}$) e o tempo de vida da emissão do doador é de 25 ps [9].

Os espectros de absorção da solução $\text{EuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (solução II) foram medidos e foi estimada a secção de choque transversal de absorção do Eu^{3+} ($\sim 5 \times 10^{-18} \text{ cm}^2$, $\sigma_{\text{abs}} = \alpha / [\text{Ln}^{3+}]$).

A sobreposição observada prediz eficiente transferência de energia da Tc para o Eu^{3+} . O parâmetro microscópico de transferência de energia obtido usando o cálculo integral da sobreposição foi $C_{DA} \sim 3,15 \times 10^{-31} \text{ cm}^6/\text{s}$ e $R_c \sim 14,1 \text{ \AA}$. Para estes valores foi possível calcular a probabilidade de transferência de energia ($3,9 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$) dada por:

$$W_{DA} = \frac{C_{DA}}{R_c^6}$$

Com estes parâmetros nós obtivemos uma eficiência de transferência de energia dipolo-dipolo de somente 0,015%. Nós consideramos que o mecanismo de troca de elétrons de transferência de energia deve ser mais eficaz do que o mecanismo dipolo-dipolo no complexo EuTc. Para o mecanismo de troca, para rendimentos quânticos de luminescência de 50% nós obtivemos o $R_c = 2,6 \text{ \AA}$.

Os espectros de emissão dos complexos de LnTc também foram obtidos, excitando as amostras com uma lâmpada de Xenônio e um filtro em 405 nm. Somente o complexo de EuTc mostrou uma emissão vermelha forte em 619 nm no qual a intensidade é uma função do pH. Como é conhecido, a adição do peróxido de hidrogênio em solução com pH controlado resulta em um aumento na intensidade da banda de emissão. Uma concentração ideal em função do pH (7.0) foi obtida através de medidas de emissão (figura 6) e de tempo de vida da fluorescência (figura 7), adicionando um volume controlado de NaOH na solução IV.

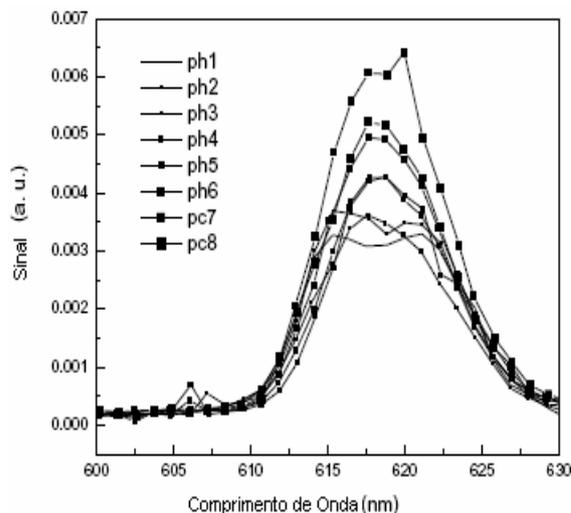


Figura 6. Efeitos do pH na intensidade de emissão do complexo EuTc. Cada ponto representa uma adição de 0,1mL de solução alcalina na anterior.

O pH neutro estabiliza a solução fazendo com que o íon Eu^{3+} ocupe sítios da tetraciclina formando o complexo EuTc, caso contrário, por exemplo para pH maiores ocorre a precipitação de $\text{Eu}(\text{OH})_3$, e para pH menores, o íon lantanídeo reagiria com ácidos dos MOPs o que causa uma diminuição na intensidade de fluorescência do complexo.

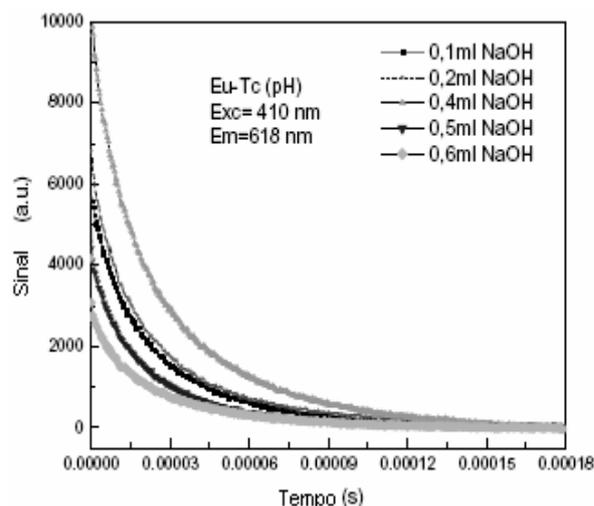
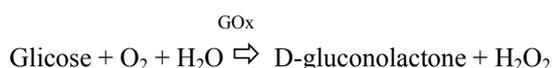


Figura 7. Mapeando a melhor condição de intensidade de pH para o complexo EuTc por tempo de vida de fluorescência.

Observou-se um pequeno encurtamento no tempo de vida da fluorescência ($40 \mu\text{s}$ a $20 \mu\text{s}$) com crescimento no pH.

Foi observado (figura 8) que com o acréscimo de peróxido de hidrogênio na solução EuTc, em pH controlado, há um aumento na intensidade de fluorescência, que é proporcional à concentração de H_2O_2 na solução [5]. Desta forma, o complexo EuTc pode ser usado como sonda de H_2O_2 . Lembrando que o H_2O_2 é um dos produtos da atividade de quase todas as oxidases, e isso possibilita um estudo quantitativo da atividade da respectiva enzima. Assim, através da detecção do peróxido de

hidrogênio consegue-se medir, indiretamente, a concentração de glicose, por exemplo:



Na condição de pH ideal foi observado, pela primeira vez, um aumento na luminescência do Európio com adição do peróxido de uréia na solução, como nós podemos ver em figura 8. A forma da banda de emissão e um deslocamento para a região azul com a composição das soluções, revelando que o íon Eu^{3+} pode ocupar locais diferentes na estrutura da molécula.

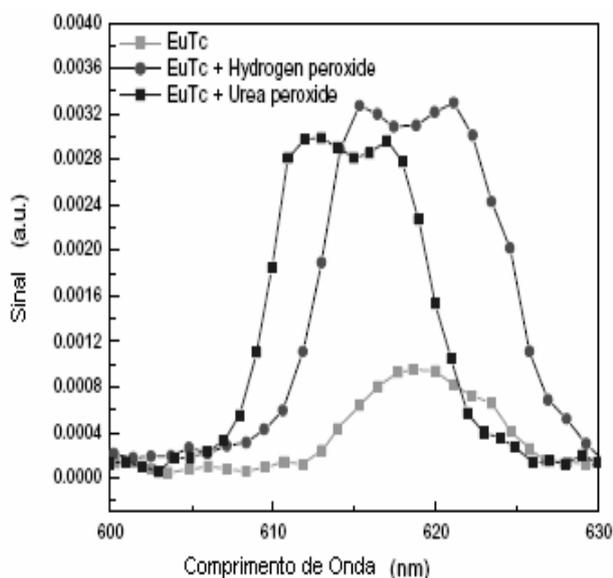


Figura 8. Emissão do complexo EuTc com adição de peróxido de hidrogênio e de peróxido de uréia.

Acreditamos que este aumento pode ser usado para determinar uréia em solução. A uréia é produzida primeiramente no fígado e secretada pelos rins e é o principal produto final do metabolismo animal. É o veículo preliminar para a remoção da amônia tóxica do corpo. A determinação da uréia é muito útil para que o médico avalie a função do rim dos pacientes. Em geral, aumentos no nível da uréia são associados com a nefrite, isquemia renal, obstrução do aparelho urinário, e determinadas doenças extras renais, doenças de fígado e diabetes. Os níveis diminuídos indicam a insuficiência hepática aguda [7].

Os índices de refração de cada amostra também foram medidos e os resultados são mostrados na tabela 1:

Complexo	Composição	Índice de Refração
Európio		
EuTc (amarelo)	$\text{EuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + Tetraciclina + MOPS	1,3385
EuTc (vermelho)	$\text{EuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + Tetraciclina + MOPS + luz UV	1,3465
EuTcPH (laranja)	$\text{EuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + Tetraciclina + MOPS + H_2O_2	1,3387
EuTcPC (amarelo)	$\text{EuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + Tetraciclina + MOPS + peróxido de uréia	1,3565
EuTcEdta (amarelo)	$\text{EuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + Tetraciclina + MOPS + EDTA	1,3370
Hólmio		
HoTc (amarelo escuro)	$\text{HoCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + Tetraciclina + MOPS	1,3380
Itérbio		
TbTc (amarelo)	$\text{TbCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + Tetraciclina + MOPS	1,3376
Neodímio		
NdTc (amarelo)	$\text{NdCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + Tetraciclina + MOPS	1,3560

Tabela 1. Índice de refração dos Lantanídeos estudados.

Para estudar a dependência do índice de refração com a concentração do lantanídeo, nós utilizamos o complexo de NdTc (por questões práticas e econômicas, porém poderíamos ter feito este estudo com qualquer outro Ln^{3+}) de maior concentração, preparando-o sempre o mesmo volume, controlado, adicionando a solução II em partes complementares na solução IV. O valor do índice de refração do complexo NdTc, como poderia ter sido escolhido qualquer outro, foi plotado num gráfico em função do coeficiente de absorção (α) de cada amostra e é mostrado na figura 9. Nós podemos observar para o índice de refração tem uma dependência linear com a concentração do Nd (α é proporcional a concentração). Este comportamento linear pode ser explicado considerando que a ampliação da concentração do Nd, promove uma ampliação na densidade da solução e conseqüentemente uma perda da velocidade da luz, aumentando, assim, o índice de refração.

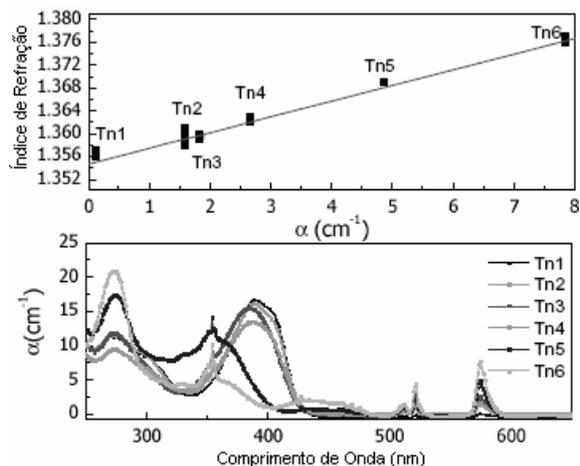


Figura 9 - Dependência do índice de refração de complexos de NdTc com coeficiente de absorção do Nd.

Conclusões

Os complexos LnTc foram estudados e somente o complexo de EuTc mostrou uma emissão elevada do lantanídeo. Este efeito pode ser atribuído às ramificações das emissões dos lantanídeos estudados, que levam a emissões não-radiativas (Er^{3+} , Ho^{3+} e Nd^{3+}) ou não-ressonantes com a banda de emissão da tetraciclina (Tb^{3+} e Yb^{3+}).

Um estudo do índice de refração das soluções foi feito mostrando que este parâmetro é muito importante para se estimar a concentração dos lantanídeos.

A transferência de energia entre o Tc e o Eu foi estudada e um raio crítico de interação de 14,1 Å para a transferência dipolo-dipolo foi obtido. Para o mecanismo de troca de cargas o raio crítico calculado foi de 2,6 Å.

Essa caracterização óptica pode ser utilizada para verificação das melhores condições do complexo EuTc como sonda de peróxido de hidrogênio em aplicações biomédicas em fluidos corpóreos, como sangue e urina.

Finalmente um aumento da emissão do Eu com introdução do peróxido de uréia na solução de EuTc sugere um método novo para a determinação do peróxido de uréia em soluções aquosas.

Agradecimento:

Gostaríamos de agradecer o apoio da FAPESP, pela bolsa concedida, processo 05/57403-3.

Bibliografia

- [1] S. Lis, M. Elbanowski, B. Makowska, Z. Hnatejko, J. of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 150, 233-247, (2002).
- [2] Chopra I., Hawkey P.M., e Hinton M., J. Antimicrob. Chemother. 29:245-277, (1992).
- [3] Buono-Core G.E., Li H, Marciniak B., Coord. Chem. Rev. 99, (1990).
- [4] Min Li e Selvin P.R., Bioconjugate Chem., 8, 127-132, (1997).
- [5] Rakicioglu Y., Perrin J.H., Schulman S.G., Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 20, 397-399, (1999).
- [6] M. S., Wu M., Wolfbeis O. S., Journal of Fluorescence, 14, 561-568, (2004).
- [7] Lowenthal A., Urea Cycle Diseases (Advances in Experimental Medicine and Biology, 153), Plenum Pub Corp, (1982).
- [8] Förster T., *Discuss. Farraday Soc.* 27, 7-17, (1959).
- [9] Schmeider S., Schmitt M., Brehm G., Reiher M., Matousek P, Towrie M, Photochemical & Photobiological Sciences, 2 (11),1107-1117, (2003).