

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 13/03/2028.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Câmpus de São José do
Rio Preto

Vytor Campos de Oliveira

Complexos luminescentes de Ir^{III} para identificação e quantificação
de proteína Albumina

Presidente Prudente

2026



Vytor Campos de Oliveira

**Complexos luminescentes de Ir^{III} para identificação e quantificação
de proteína Albumina**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Câmpus de São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio Marques de Lima

Coorientadora: Prof. Dr. Janaina Mantovan

Presidente Prudente

2026

O48c

Oliveira, Vytor Campos

Complexos luminescentes de Ir(III) para identificação e quantificação de proteína Albumina / Vytor Campos Oliveira. -- São José do Rio Preto, 2026

80 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Sergio Antonio Marques Lima

Coorientadora: Janaina Mantovan

1. Química. 2. Irídio(III). 3. Complexos heterolépticos. 4. Sensoriamento de Proteína. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Os potenciais impactos desta pesquisa envolvem o aprofundamento do entendimento dos processos fotofísicos em complexos luminescentes de Ir^{III} em solução, bem como a ampliação de suas aplicações em sistemas de detecção biomolecular. A exploração de suas propriedades emissivas contribui para o desenvolvimento de materiais com potencial uso em dispositivos ópticos e sensores luminescentes mais eficientes. Tais avanços podem repercutir em áreas estratégicas como ciências da vida, tecnologia e meio ambiente, ao favorecer metodologias analíticas mais sensíveis e o aprimoramento de materiais funcionais. Assim, os resultados obtidos tendem a impulsionar pesquisas com impacto científico, tecnológico e socioeconômico, fortalecendo setores relevantes para a sociedade contemporânea.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The potential impacts of this research include deepening the understanding of photophysical processes in luminescent Ir^{III} complexes in solution, as well as expanding their applications in biomolecular detection systems. The exploration of their emissive properties contributes to the development of materials with potential use in optical devices and more efficient luminescent sensors. Such advances may have implications in strategic areas such as life sciences, technology, and the environment, by enabling more sensitive analytical methodologies and improving functional materials. Therefore, the results obtained are expected to foster research with scientific, technological, and socioeconomic impact, strengthening sectors that are relevant to contemporary society.

Vytor Campos de Oliveira

Complexos luminescentes de Ir^{III} para identificação e quantificação de proteína Albumina

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Câmpus de São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Química.

Data da defesa: 13/03/2026

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Sergio Antonio Marques de Lima
UNESP – Faculdade de ciências e tecnologia - Campus de Presidente Prudente

Profa. Dra. Beatriz Eleuterio Goi
UNESP – Faculdade de ciências e tecnologia - Campus de Presidente Prudente

Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto
IQA/UNESP

Dedico este trabalho à Patrocínio Pereira de Campos.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer minha família, por todo o apoio durante os anos de graduação e mestrado, por me ajudarem a não desistir durante todos esses anos. Em especial, minha mãe, Petra Carla de Campos, que mesmo morando em outro país sempre esteve presente, sempre telefonando e conversando, sendo um porto seguro nos momentos difíceis; e a minha avó, Rose Maria de Campos, que sempre cuidou de mim, sendo uma segunda mãe na minha vida.

Ao meu Avô, que se não fosse por ele não teria nunca me interessado por cursar um curso relacionado a química, sempre sendo um exemplo a ser seguido, tanto como homem, quanto na área de estudo, um ótimo pai, avô e químico, gostaria que estivesse aqui para ver eu concluir essa etapa da minha vida.

Minhas irmãs, Giulia, que sempre cuidou de mim, sendo a melhor irmã mais velha que eu poderia pedir, e as duas mais novas, Mariah e Mellina, que me ligavam pedindo ajuda nas lições de matemática e para montar cubo mágico.

A todos meus amigos que escutavam minhas queixas, e me aturaram, não apenas durante a escrita desse texto: Carol, Vick, Gabs, Aressa, Sutti, Duda, Giovanni, Felipe, Gustavo, Rett, Gab.

Aos meus colegas de laboratório que me auxiliaram desde o começo da minha IC até os dias de hoje, sempre presentes, sendo mais que simples colegas de trabalho, mas sim amigos, Alessandra, Alessandro, André, Ariane, Augusto, Caique, Eduardo, Felipe, Filipe, Gabriel, Guilherme, Gustavo, João, Julia, Leonardo, Maisa, Maria Eduarda, Matheus, Renan, Rodolpho e Thiago. Em especial ao Felipe, que me auxiliou durante toda minha IC, me ensinando toda a base de laboratório, e a Alessandra e ao Renan, que estiveram me acompanhando durante todo o mestrado, sendo nas discussões ou nas correções do projeto e dos demais textos.

A Profa. Dr. Ana Maria Pires que me acompanhou durante toda minha jornada acadêmica, sempre dando muito apoio e auxílio em todas as áreas que era possível.

A Profa. Dr. Janaina Mantovan que aceitou a orientação deste trabalho, sempre estando disponível e auxiliando nas discussões, e sanando muitas dúvidas.

Ao Prof. Dr. Sergio Lima que em 2018 aceitou me orientar, e até hoje segue sendo um ótimo orientador, sempre dando o máximo apoio possível em todas as áreas, e pregando um ótimo convívio no laboratório.

A Profa. Dra. Beatriz Eleutério Góí, e Prof. Drs. Valdemiro Pereira de Carvalho Júnior pelas medias de FTIR.

Ao Prof. Dr. Eduardo René Pérez González, pelas medidas de ressonância magnética nuclear.

Ao Dr. Guilherme Dognani, pelas medidas de UV-vis.

Ao programa de pós-graduação em química do IBILCE-UNESP pela oportunidade de tornar meu sonho uma realidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88887.104492/2025-00, à qual agradeço.

“O universo tem um início, mas não tem fim. Infinito. As estrelas também têm um início, mas chegam ao fim da própria criação. Finitas.”

(Steins;Gate, 2011.)

RESUMO

Complexos luminescentes de Ir^{III} têm sido amplamente estudados devido à uma gama de aplicações, incluindo dispositivos moleculares de conversão de luz, OLEDs e detecção de moléculas biológicas e inorgânicas. Suas excelentes propriedades de emissão estão relacionadas ao alto acoplamento spin-órbita, o que permite a relaxação da regra de seleção de spin ao permitir misturar as multiplicidades no estado híbrido emissivo de baixa energia, ³LC–^{1,3}MLCT. Devido à influência significativa do ambiente sobre os estados de transferência de carga desses complexos, eles podem ser utilizados para a identificação e quantificação de analitos como proteínas, por exemplo a albumina de soro bovino (BSA). Nesse contexto, os bolsões hidrofóbicos da proteína isolam os complexos do meio hidrofílico externo, enquanto os grupos amino aumentam o pH desses sítios, podendo variar assim a emissão do complexo. A importância de identificar essa proteína está no seu papel crucial no tratamento de doenças como a cirrose hepática. Neste trabalho, dois complexos de Ir(III) foram sintetizados: K[Ir(Fppy)₂(bqdc)] e [Ir(Fppy)₂(bpdc)], onde os ligantes são definidos como Fppy = 2-(2,4-difluorofenil)piridina, bqdc = ácido 2,2'-biquinolina-4,4'-dicarboxílico e bpdc = ácido 2,2'-bipiridina-3,3'-dicarboxílico. Os complexos foram caracterizados por FTIR, espectrometria de massas e RMN de ¹H, confirmando a formação das estruturas propostas. O complexo K[Ir(Fppy)₂(bqdc)] (IrQ) apresentou emissão na região do vermelho, com máximo de banda em 610 nm quando excitado a 270 nm. De forma semelhante, o complexo [Ir(Fppy)₂(bpdc)] (IrP) apresentou emissão máxima em 550 nm, com o mesmo comprimento de onda de excitação. Para avaliar seu potencial como sensor da proteína BSA, o complexo IrQ foi solubilizado em tampão Britton–Robinson (BR) a pH 2,5, e as medições foram realizadas com e sem a proteína, variando a concentração do complexo. Observou-se que, na ausência da proteína, a emissão do complexo foi suprimida; no entanto, com a adição da proteína, a emissão foi restaurada. Consequentemente, a concentração ideal do complexo IrQ para detecção do tipo *turn-on* foi determinada como aproximadamente 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹. O teste para determinar o limite de detecção mostrou que o método é capaz de detectar uma concentração de ~37 nmol L⁻¹, mostrando o potencial do complexo IrQ no sensoriamento de alta sensibilidade da proteína BSA.

Palavras-chave: complexos heterolepticos, irídio(III), sensoriamento de proteína.

ABSTRACT

Luminescent Ir^{III} complexes have been widely studied due to their broad range of applications, including molecular light-converting devices, OLEDs, and the detection of biological and inorganic molecules. Their excellent emission properties are related to strong spin–orbit coupling, which allows relaxation of the spin selection rule band mix the multiplicity of the low-energy hybrid emissive state, ³LC–¹,³MLCT. Due to the significant influence of the environment on the charge transfer states of these complexes, they can be used for the identification and quantification of analytes such as proteins, for example bovine serum albumin (BSA). In this context, the hydrophobic pockets of the protein isolate the complexes from the external hydrophilic medium, while the amino groups increase the pH of these sites, thereby modulating the emission of the complex. The importance of identifying this protein lies in its crucial role in the treatment of diseases such as liver cirrhosis. In this work, two Ir(III) complexes were synthesized: K[Ir(Fppy)₂(bqdc)] and [Ir(Fppy)₂(bpdc)], where the ligands are defined as Fppy = 2-(2,4-difluorophenyl)pyridine, bqdc = 2,2'-biquinoline-4,4'-dicarboxylic acid, and bpdc = 2,2'-bipyridine-3,3'-dicarboxylic acid. The complexes were characterized by FTIR, mass spectrometry, and ¹H,¹³C NMR, confirming the formation of the proposed structures. The complex K[Ir(Fppy)₂(bqdc)] (IrQ) exhibited emission in the red region, with a band maximum at 610 nm when excited at 270 nm. Similarly, the complex [Ir(Fppy)₂(bpdc)] (IrP) showed maximum emission at 550 nm under the same excitation wavelength. To evaluate its potential as a BSA protein sensor, the IrQ complex was solubilized in Britton–Robinson (BR) buffer at pH 2.5, and measurements were performed in the absence and presence of the protein while varying the complex concentration. It was observed that, in the absence of the protein, the emission of the complex was quenched; however, upon addition of the protein, the emission was restored. Consequently, the optimal concentration of the IrQ complex for turn-on detection was determined to be approximately 1.0 × 10⁻⁵ mol L⁻¹. The test to determine the limit of detection showed that the method is capable of detecting a concentration of ~37 nmol L⁻¹, demonstrating the potential of the IrQ complex for BSA protein sensing with high sensitivity.

Keywords: heteroleptic complexes, iridium(III), protein sensing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama ilustrando as principais transições eletrônicas em complexos de Ir ^{III} .	16
Figura 2: Esquema da formação de um estado híbrido de menor energia singlete-triplete devido ao acoplamento spin-orbita.	17
Figura 3: Estrutura terciária da proteína BSA.	18
Figura 4: Espectros de emissão e excitação do complexo [Ir(fppy) ₂ (bpdc)] com variação de pH (esquerda), e curva de titulação potenciométrica do mesmo complexo (direita).	21
Figura 5: Esquema de síntese do dímero precursor de Ir ^{III} , [(fppy) ₂ Ir(μ-Cl) ₂ Ir(fppy)].	23
Figura 6: Reação entre o dímero precursor [Ir(fppy) ₂ (μ-Cl) ₂ Ir(fppy) ₂] e os ligantes ancilares bpdc e bqdc.	24
Figura 7: Espectros no FTIR para (a) dímero precursor, complexo IrQ e ligante bqdc e (b) dímero precursor, complexo IrP e ligante bpdc.	27
Figura 8: Ampliação da figura 7 na região entre 2000 a 900 cm ⁻¹	28
Figura 9: Espectro de massas para o complexo IrQ e as respectivas atribuições para cada pico.	29
Figura 10: Espectro de massas para o complexo IrP e as respectivas atribuições para cada pico.	29
Figura 11: Espectro de RMN H ¹ do complexo IrQ em metanol.	30
Figura 12: Espectro de RMN bidimensional do tipo COSY para o complexo IrQ.	31
Figura 13: Espectro de RMN C ¹³ do complexo IrQ em metanol.	31
Figura 14: Espectro de RMN bidimensional do tipo HSQC para o complexo IrQ.	32

Figura 15: Espectro de RMN F^{19} do complexo IrQ em metanol.	32
Figura 16: Espectros de absorção no ultravioleta visível do complexo de IrQ com variação do pH de 2,0 a 12,0.	33
Figura 17: Espectro de absorção no ultravioleta visível do complexo IrP, com a variação do pH, de 2,0 a 12,0.	36
Figura 18: Espectro de excitação do complexo de IrQ com variação de pH, de 12,0 a 2,0, utilizando tampão B.R.	38
Figura 19: Espectro de emissão do complexo IrQ com variação de pH, de 12,0 a 2,0 utilizando tampão B.R., filtro 390 nm, passo 100 nm/min a) espectros por intensidade e b) espectros normalizados.	39
Figura 20: a) Gráfico da intensidade máxima de emissão do complexo IrQ pela variação do pH. b) Gráfico do λ_{MAX} de emissão do complexo IrQ pela variação do pH.	40
Figura 21: Espectro de excitação do complexo IrP, λ_{Em} = 560 nm, filtro 390 nm e passo 100 nm/ min.	42
Figura 22: Espectros de emissão do complexo de IrP com variação de pH, de 12,0 a 2,0 utilizando tampão B.R., filtro de 390 nm, passo de 100 nm/min. (a) espectros por intensidade e(b) espectros normalizados.	43
Figura 23: a) Gráfico da intensidade máxima de emissão do complexo IrP pela variação do pH. b) Gráfico do λ_{MAX} de emissão do complexo IrP pela variação do pH.	44
Figura 24: Espectros de absorção na região do UV-Vis do complexo IrQ variando sua concentração, A: sem a presença de BSA; B: na presença de 100 nmol L ⁻¹ de BSA.	49
Figura 25: Ampliação de 300 a 900 nm dos espectros de absorção na região do UV-Vis do complexo IrQ variando sua concentração, A: sem proteína; B: com 100 nmol L ⁻¹ de BSA.	51
Figura 26: Gráfico da absorbância em 370 nm em função da concentração de complexo IrQ.	52

Figura 27: Espectros de excitação do complexo IrQ, com emissão em 610nm, A: sem proteína; B: com 100 nmol L ⁻¹ de BSA.	53
Figura 28: Espectros de emissão do complexo IrQ, com excitação em 370nm, A: sem proteína; B: com 100 nmol L ⁻¹ de BSA.	54
Figura 29: Gráfico da área da banda de emissão do complexo IrQ com e sem proteína BSA.	55
Figura 30: Espectro de absorção na região do UV-vis do complexo IrQ com concentração de 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ e variando a concentração de proteína BSA.	56
Figura 31: A) Espectro de absorção na região do UV-vis da proteína BSA com variação da concentração; B) gráfico da absorção em 280 nm em função da concentração de proteína BSA.	57
Figura 32: Gráfico da absorção em 270 e 370 nm do complexo IrQ, subtraindo-se a absorção da proteína BSA, em função da concentração de proteína.	58
Figura 33: A) Espectros de excitação do complexo IrQ, com emissão entre 595 e 625 nm variando a concentração de proteína BSA em solução; B) Espectros de excitação normalizados.	59
Figura 34: A) Espectros de emissão com excitação em 370 nm com a variação de concentração de proteína BSA; B) espectros normalizados.	60
Figura 35: Diagrama de cromaticidade para as soluções de IrQ, com o aumento da concentração de BSA.	61
Figura 36: Curva analítica da razão da emissão de cada solução pela solução Branco, em função da concentração de protein BSA em solução, com pH 2,5.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de Absorbância medidos em 270 nm em função do pH e de absortividade molar.	34
Tabela 2: Valores de Absorbância em 245 nm em função do pH, e valores de absortividade molar.	37
Tabela 3: Valores de concentração de complexo e BSA das soluções com seus respectivos códigos de entrada.	47
Tabela 4: concentrações das soluções de complexo IrQ e BSA e seus respectivos códigos de entrada.	48
Tabela 5: Valores de absortividade molar do complexo IrQ com e sem proteína.	52
Tabela 6: Coordenadas de cor das soluções de IrQ com proteína BSA, λ Dom e pureza de cor.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATR – *Attenuated Total Reflectance* (Refletância Total Atenuada)

BCG – *Bromocresol Green*

BCP – *Bromocresol Purple*

bpdc – Ácido 2,2'-bipiridina-3,3'-dicarboxílico

bqdc – Ácido 2,2'-biquinolina-4,4'-dicarboxílico

BR – Tampão Britton–Robinson

BSA – *Bovine Serum Albumin* (Albumina Sérica Bovina)

COSY – *Correlation Spectroscopy*

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ESI-TOF – *Electrospray Ionization Time-of-Flight*

FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

fppy – 2-(2,4-difluorofenil)piridina

HSA – *Human Serum Albumin*

HRMS – *High-Resolution Mass Spectrometry*

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

IrP – Complexo [Ir(fppy)₂(bpdc)]

IrQ – Complexo [Ir(fppy)₂(bqdc)]

ISC – *Intersystem Crossing*

LC – *Ligand-Centred*

LC-MS/MS – *Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry*

LLCT – *Ligand-to-Ligand Charge Transfer*

LMCT – *Ligand-to-Metal Charge Transfer*

LOD – *Limit of Detection* (Limite de Detecção)

MC – *Metal-Centred*

MLCT – *Metal-to-Ligand Charge Transfer*

NIR – *Near-Infrared* (Infravermelho Próximo)

NUV – *Near-Ultraviolet* (Ultravioleta Próximo)

OLED – *Organic Light-Emitting Diode*

PC-LED – *Phosphor-Converted Light-Emitting Diode*

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SOC – *Spin-Orbit Coupling*

UV-Vis – Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta-Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

ΔS – Variação do número quântico de spin total

δ – Deslocamento químico (ppm)

ϵ – Absortividade molar ($\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$)

ζ – Constante de acoplamento spin-órbita (cm^{-1})

λ – Comprimento de onda (nm)

ν – Frequência vibracional (cm^{-1})

Φ – Rendimento quântico de emissão

σ – Desvio padrão

A – Absorbância

C_0 – Concentração inicial

C_f – Concentração final

I – Intensidade de emissão

I_0 – Intensidade de emissão inicial

J – Constante de acoplamento escalar (Hz)

l – Caminho óptico da cubeta (cm)

m/z – Razão massa/carga

R^2 – Coeficiente de determinação

S – Número quântico de spin total

t_{2g} – Conjunto de orbitais d de simetria t_{2g} em campo octaédrico

π – Orbital molecular do tipo pi

π^* – Orbital molecular antiligante

SUMÁRIO

1: INTRODUÇÃO	15
1.1. COMPLEXOS DE IRÍDIO(III)	15
1.1.1. USO DE COMPLEXOS DE IRÍDIO(III) COMO SENSORES DE PROTEÍNAS	18
1.2. HISTÓRICO DE PESQUISA EM COMPLEXOS DE IRÍDIO(III) NO GRUPO DE PESQUISA LLUMES	20
1.3. OBJETIVOS	23
1.3.1. Objetivo geral	23
1.3.2. Objetivos específicos	23
2: COMPLEXOS HETEROLÉPTICOS DE IRÍDIO(III)	24
2.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	24
2.1.1. Síntese do dímero precursor	24
2.1.2. Síntese dos complexos heterolépticos de irídio(III)	24
2.1.3. Estudo da influência do ph na absorção e emissão	25
2.1.4. Técnicas de caracterização	26
2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
2.2.1. Caracterização por espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (FTIR)	27
2.2.2. Caracterização por espectroscopia de massas (HRMS, ESI-TOF)	29
2.2.3. Caracterização por ressonância magnética nuclear	31
2.2.3.1. Ressonância magnética nuclear de ¹ H	31
2.2.3.2. Ressonância magnética nuclear de ¹³ C.....	33
2.2.3.3. Ressonância magnética nuclear de ¹⁹ F.....	34
2.2.4. Caracterização por espectroscopia de absorção eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-VIS).....	35
2.2.5. Caracterização por espectroscopia de fotoluminescência	39
2.3. CONCLUSÕES PARCIAIS	47
3 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA BSA POR COMPLEXO DE IRÍDIO(III)	48
3.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	48
3.1.1. Testes para identificação de proteína bsa com complexo de irídio(III)	48

3.1.2.	Teste de limite de detecção de proteína bsa pelo complexo IrQ.....	50
3.2.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
3.2.1.	Concentração ideal de complexo	51
3.2.1.1.	Caracterização por espectroscopia de absorção eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-VIS).....	51
3.2.1.2.	Caracterização por espectroscopia de fotoluminescência	54
3.2.2.	Limite de detecção	57
3.2.2.1.	Caracterização por espectroscopia de absorção eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-VIS).....	57
3.2.2.2.	Caracterização por espectroscopia de fotoluminescência	60
3.3.	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67
	APÊNDICE A – ESPECTROS DE RMN ¹H DO COMPLEXO IRP.....	70
	APÊNDICE B – UV-VIS SOLUÇÕES PARA DETERMINAR CONCENTRAÇÃO IDEAL DE COMPLEXO	
	71	
	APÊNDICE C - PL SOLUÇÕES PARA DETERMINAR CONCENTRAÇÃO IDEAL DE COMPLEXO EM	
	TRIPLICATA 72	
	APÊNDICE D - UV-VIS SOLUÇÕES PARA DETERMINAR LOD EM TRIPLICATA	73
	APÊNDICE E – PL SOLUÇÕES PARA DETERMINAR LOD EM TRIPLICATA	74
	DADOS CURRICULARES	75

1: INTRODUÇÃO

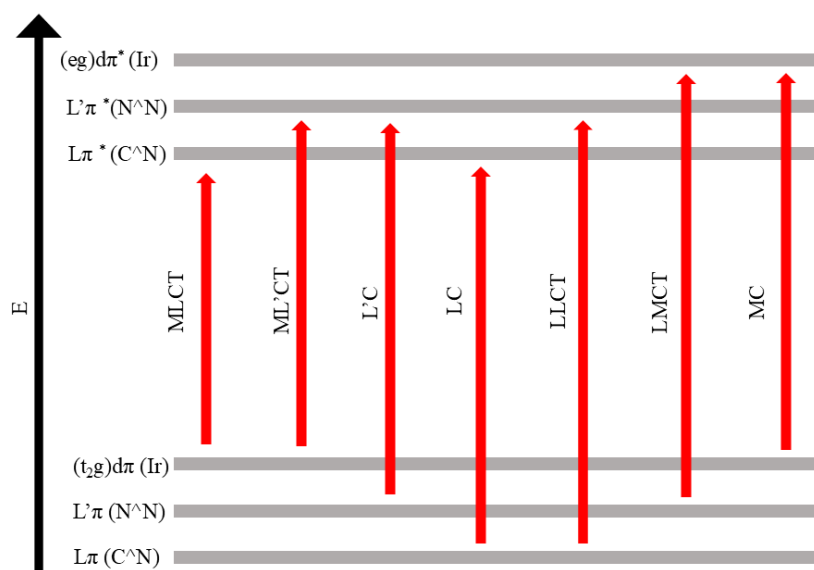
1.1. COMPLEXOS DE IRÍDIO(III)

Complexos de irídio(III) constituem atualmente uma das classes mais versáteis de emissores moleculares, impulsionando pesquisas em fotônica e optoeletrônica devido às suas interessantes propriedades químicas e fotofísicas, das quais possibilitam sua utilização em diferentes áreas, desde aplicações na área biomédica^[1], catálise^[2] e em dispositivos moleculares conversores de luz, como na fabricação de PC-LEDs e OLEDs^[3], destacando-se, em especial, sua versatilidade para aplicações biológicas, como na identificação e quantificação de proteínas e/ou outras macromoléculas^[4].

Algumas vantagens dos complexos luminescentes de Ir^{III} que possibilitam tais aplicações são seus valores de tempo de vida de estado excitado relativamente altos (tipicamente dezenas ou centenas de milisegundos), que podem ser modulados adequando-se à aplicação desejada; altos valores de rendimento quântico de emissão (chegando até 100% na ausência de oxigênio molecular) e a capacidade de modular alguns parâmetros fotofísicos como as absorções e cores de emissões, possibilitando uma gama de emissão desde o NUV (do inglês: *Near-UV*, ultravioleta próximo) até o NIR (do inglês: *near-IR*, infravermelho próximo)^[5, 6, 7].

Complexos de Ir^{III} são caracterizados por transições eletrônicas intramoleculares, dessa forma, essas transições podem partir de estados fundamentais dos ligantes ou do metal e se encaminhar para estados excitados também do ligante ou do metal. Considerando complexos heterolépticos, ainda são possíveis transições entre estados de diferentes ligantes. A Figura 1 apresenta um diagrama ilustrando as possibilidades de transições eletrônicas em complexos de Ir^{III}. Uma transição que ocorre a partir de um estado fundamental do Ir^{III} ($(t_{2g})d\pi(Ir)$) e se encaminha para um estado excitado do ligante ($L\pi(C^{\wedge}N)$ ou $L\pi(N^{\wedge}N)$) é chamada de MLCT (do inglês: *metal-to-ligand charge transfer*). Quando a transição ocorre entre estados do mesmo ligante é chamada de LC (do inglês: *ligand-centred*). Em transições que vão de um estado fundamental de um ligante para um estado excitado de outro ligante é chamada de LLCT (do inglês: *ligand-to-ligand charge transfer*), do ligante para o metal LMCT (do inglês: *ligand-to-metal charge transfer*), e por fim, do estado fundamental ($(t_{2g})d\pi(Ir)$) do metal para seu estado excitado ($(e_g)d\pi^*(Ir)$) é chamada de MC (do inglês: *metal-centred*)^[8].

Figura 1: Diagrama de energia representado as possíveis transições eletrônicas em complexos de Ir^{III}.

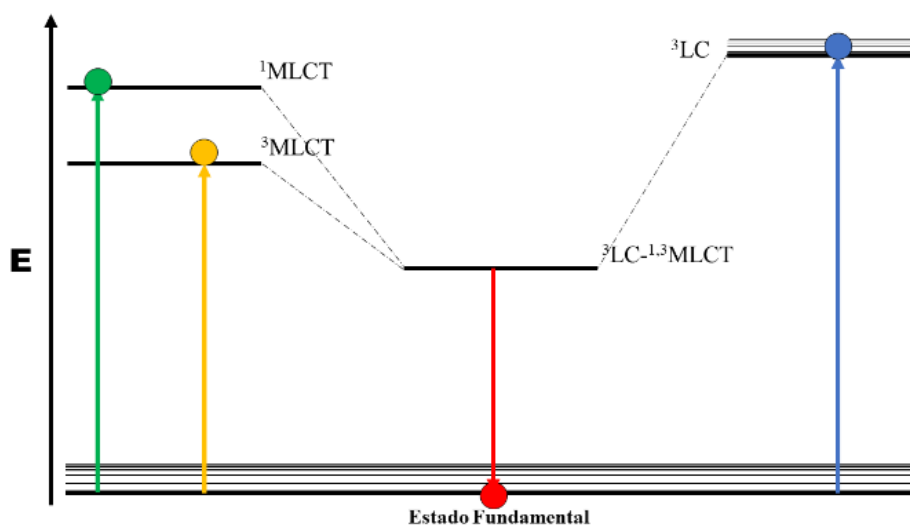


Fonte: Adaptada de^[9].

Os processos eficientes de emissão em complexos de irídio são resultado do forte efeito de acoplamento spin-órbita que o íon irídio^{III}, de grande massa atômica, apresenta ($\zeta = 4430 \text{ cm}^{-1}$, para o íon Ir^{III})^[10], resultando em uma relaxação da regra de seleção de spin. A regra de spin estabelece que uma transição eletrônica é permitida apenas quando não ocorre variação na multiplicidade de spin, ou seja, quando $\Delta S = 0$. Nesse contexto, considera-se o número quântico de spin total (S) e, conseqüentemente, a multiplicidade do estado eletrônico, dada por $(2S + 1)$ para os níveis eletrônicos envolvidos na transição. Essa regra representa um dos principais fatores que restringe de forma eficiente a ocorrência do cruzamento intersistemas (do inglês: ISC- *intersystem crossing*), uma vez que tal processo envolve a mudança de multiplicidade entre estados singletos e tripletos. O acoplamento spin-órbita (do inglês: SOC – *spin-orbit coupling*), por sua vez, mistura significativamente os estados excitados singlete $^1\text{MLCT}$ e tripletos ^3LC - $^3\text{MLCT}$, removendo em grande parte a natureza proibitiva por spin das transições, levando a uma fosforescência eficiente para esses complexos^[11]. Desta forma, há a formação de um estado excitado de caráter híbrido, proveniente das misturas de estados de diferentes multiplicidades, o ^3LC - $^1,^3\text{MLCT}$ ^[11], que surge da mistura do estado singlete $^1\text{MLCT}$ e tripleto $^3\text{MLCT}$ com o estado tripleto ^3LC centrado no ligante. Este estado híbrido relaxa as regras de seleção por spin, resultando em um

aumento da população eletrônica neste estado, e favorecendo uma fosforescência altamente eficiente^[12]. A Figura 2 ilustra um diagrama de energia indicando a formação deste estado híbrido $^3\text{LC-}^1,^3\text{MLCT}$.

Figura 2: Esquema da formação do estado híbrido excitado de menor energia singleto-triplete devido à ação do acoplamento spin-orbita que mistura os estados excitados do complexo.



Fonte: Adaptada de^[13].

A regra de seleção de Laporte ($\Delta L=1$) também é obedecida uma vez que os orbitais moleculares excitados de natureza π , oriundos da combinação de orbitais atômicos p , transicionam com orbitais d do metal. Desta forma a absorvidade molar dessas transições tende a ser bastante elevada, tipicamente da ordem de 10^3-6 .

No contexto do desenvolvimento de sondas luminescentes para aplicações biomoleculares, os complexos de irídio(III) têm despertado grande interesse devido às suas propriedades fotofísicas favoráveis, como alto rendimento quântica, estabilidade fotoquímica e possibilidade de ajuste da cor de emissão. Entretanto, um desafio recorrente para seu uso direto em sistemas biológicos é sua baixa solubilidade em meio aquoso.

Para viabilizar sua aplicação em ensaios biológicos, a escolha de ligantes torna-se estratégica, pois afeta diretamente as propriedades físico-químicas e a interação do complexo com biomoléculas. O aumento da solubilidade em meio aquoso pode ser alcançado através da inserção de grupos polares à estrutura do ligante, como por exemplo, ácidos carboxílicos,

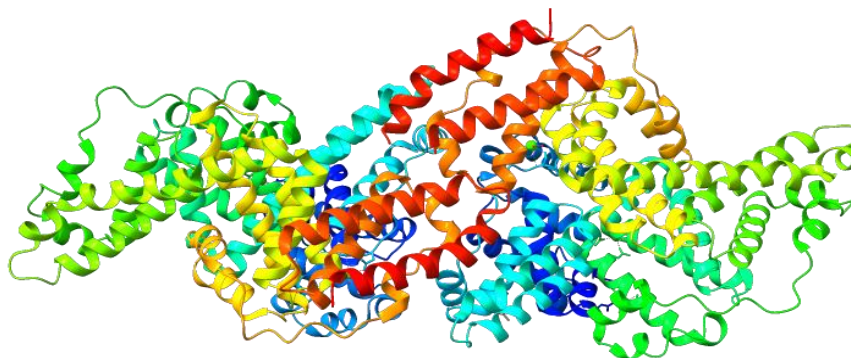
capazes de sofrer protonação ou desprotonação dependendo do pH fisiológico, alterando a organização eletrônica da molécula.

Além disso, o pH do meio exerce influência marcante sobre a emissão de complexos de Ir^{III} contendo ligantes com grupos ácidos carboxílicos, pois sabe-se que em condições ácidas, a intensidade de emissão tende a ser suprimida, enquanto em meio alcalino, observa-se, em geral, um aumento dessa intensidade^[14]. Esse efeito é particularmente relevante quando se objetiva utilizar tais complexos como sondas sensíveis a variações do microambiente proteico, como no caso da interação com a proteína BSA.

1.1.1. Uso de complexos de irídio(iii) como sensores de proteínas

A identificação e quantificação de proteínas é de grande relevância, visto a importância desse grupo de moléculas em todas as formas de vida, servindo desde transportadoras de metabólitos, produção de energia, até nos processos de transmissão de informação^[15]. Desta forma, o desenvolvimento de moléculas sensoras de proteínas vem sendo alvo de várias pesquisas, já que estudos nesse campo podem dar espaço ao desenvolvimento de métodos analíticos no diagnóstico e tratamento de doenças como o câncer ^[16]. A proteína albumina sérica bovina, BSA (do inglês: *bovine serum albumin protein*) é uma proteína globular amplamente utilizada como modelo em estudos bioquímicos e biofísicos devido à sua disponibilidade, baixo custo e elevado grau de homologia estrutural com a albumina sérica humana (HSA). Composta por aproximadamente 583 resíduos de aminoácidos, a BSA (Figura 3) apresenta uma estrutura terciária organizada em três domínios principais, cada um subdividido em duas subunidades, formando cavidades hidrofóbicas capazes de ligar diversas moléculas pequenas, incluindo fármacos, corantes e íons metálicos.

Figura 3: Estrutura terciária da proteína BSA.



A presença de albumina sérica na urina, condição conhecida como albuminúria, está diretamente associada a disfunções renais, uma vez que, em indivíduos saudáveis, a barreira de filtração glomerular impede a passagem significativa dessa proteína do plasma para o filtrado urinário. Alterações estruturais ou funcionais nos glomérulos, causadas por processos inflamatórios, hipertensão arterial ou diabetes mellitus, comprometem essa seletividade, permitindo o extravasamento de albumina para a urina. Assim, o aumento da concentração de albumina urinária é amplamente utilizado como um marcador precoce de dano renal, antecedendo muitas vezes a redução significativa da taxa de filtração glomerular. A detecção e quantificação de albumina na urina, especialmente em baixas concentrações, é uma ferramenta fundamental no diagnóstico e monitoramento da progressão de doenças renais^[17].

Essa proteína é abundante no plasma sanguíneo bovino e desempenha funções essenciais, como transporte de ácidos graxos, hormônios e metabólitos, além de contribuir para a manutenção da pressão osmótica. Sua capacidade de interação com diferentes ligantes e a presença de resíduos carregados, cuja protonação ou desprotonação depende do pH, tornam-na um sistema modelo ideal para investigar mecanismos de ligação e detecção de biomoléculas por sondas luminescentes.

Atualmente, a quantificação de albumina em fluidos biológicos é realizada predominantemente por métodos imunológicos, como o ensaio imunoenzimático (ELISA), bem como por métodos colorimétricos baseados em corantes, incluindo bromocresol *green* (BCG) e bromocresol *purple* (BCP), além de técnicas instrumentais mais sofisticadas, como cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). Embora o ELISA apresente elevada sensibilidade e especificidade, sua aplicação é limitada pelo alto custo,

necessidade de anticorpos específicos, múltiplas etapas de preparo e tempo prolongado de análise. Métodos colorimétricos, por sua vez, são amplamente utilizados em rotina clínica devido à simplicidade, porém sofrem com interferências de outras proteínas e baixa seletividade em baixas concentrações. Técnicas baseadas em LC-MS/MS oferecem excelente precisão analítica, mas requerem instrumentação complexa, operadores especializados e não são adequadas para análises rápidas ou triagens. Nesse contexto, há crescente interesse no desenvolvimento de métodos alternativos baseados em sensores ópticos, capazes de fornecer respostas rápidas, sensíveis e potencialmente portáteis para a detecção de albumina^[19].

Dentro deste contexto, a utilização de complexos de Ir^{III} como sensores de proteínas, como a albumina, ocorre por meio da interação do complexo aniônico com essas cavidades, cujas cargas variam conforme a composição de aminoácidos e o pH do meio. Essa interação altera a estrutura eletrônica do complexo, modificando seus níveis energéticos e, conseqüentemente, sua emissão. A partir dessa modificação espectral, torna-se possível utilizar os complexos de Ir^{III} em estudos analíticos voltados à identificação e quantificação de proteínas^[18].

1.2. HISTÓRICO DE PESQUISA EM COMPLEXOS DE IRÍDIO(III) NO GRUPO DE PESQUISA LLuMeS

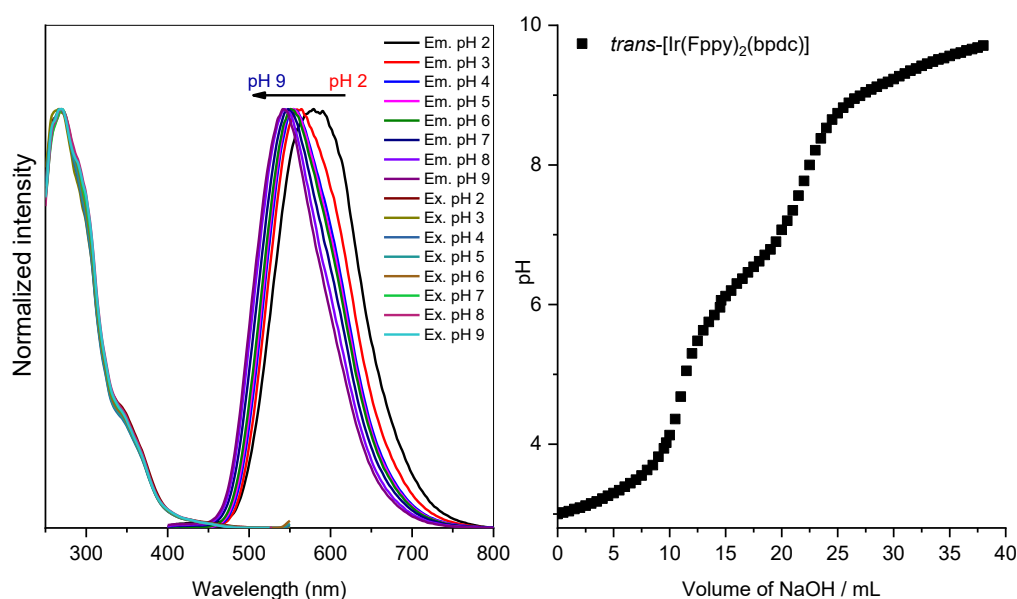
Para contextualizar, o estudo de complexos de Ir^{III} é um dos interesses de investigação no grupo de pesquisa LLuMeS (Laboratório de Luminescência em Materiais e Sensores), coordenado pelos professores doutores Sergio Antonio Marques de Lima e Ana Maria Pires na FCT-Unesp, campus de Presidente Prudente, especificamente linha de pesquisa do Prof. Dr. Sergio. Este estudo em questão iniciou-se em 2013 e desde então, proporcionou a consolidação de amplo conhecimento e expertise no estudo de materiais luminescentes à base de complexos de Ir^{III}.

O grupo já vem produzindo complexos luminescentes de Ir^{III} em duas etapas, na qual a primeira etapa, baseada na rota clássica de Nonoyama^[20], é a síntese do complexo dímero de irídio com um ligante ciclometalante do tipo C^N e íons cloreto em ponte, seguido da adição do terceiro ligante para a formação do complexo final, que pode ser homoléptico ou heteroléptico. Esta síntese forma complexos estáveis e com alto rendimento, podendo chegar até 80%.

Tendo isso em vista, e também a vasta possibilidade de aplicações para esses materiais, como em dispositivos conversores de luz e sensoriamento tanto de grupos orgânicos quanto inorgânicos^[21], esta proposta de trabalho foca no estudo e na determinação de parâmetros ideais para o sensoriamento de proteína. Uma vez que para esse tipo de aplicação biológica necessita-se que o meio seja aquoso, é importante que os complexos sejam hidrossolúveis. Para tal é possível selecionar ligantes que apresentem grupos carboxila^[13], como o bqdc e o bpdc (respectivamente 2,2'-biquinolina-4,4'-diácido carboxílico e 2,2'-bipiridina-3,3'-diácido carboxílico) que apresentam dois grupos carboxilas (vide Figura 6), ligantes que demonstraram grande potencial para aplicações em meio biológico. Esses ligantes também causam um abaixamento do nível excitado do complexo, fazendo com que a emissão caia em regiões do vermelho (bqdc) e do amarelo (bpdc). Essas regiões de emissão são importantes para uma possível aplicação em meio biológico para bioimageamento, pois difere da autofluorescência do meio biológico, que ocorre, geralmente, na região do azul.

Estudos prévios, também realizados em nosso grupo de pesquisa^[22], mostram que com a variação do pH do meio, a emissão de complexos de Ir^{III} sofrem variação. Este estudo foi primeiramente realizado com um complexo [Ir(fppy)₂(bpdc)] o qual demonstrou certo potencial para aplicação no sensoriamento de pH, conforme pode ser visto na Figura 4, que mostra como o espectro de emissão do complexo se desloca do vermelho para o azul conforme o pH do meio aumenta.

Figura 4: Espectros de emissão e excitação do complexo $[\text{Ir}(\text{fppy})_2(\text{bpdc})]$ com variação de pH, e curva de titulação potenciométrica do mesmo complexo.



Fonte: [20].

Também em nosso grupo de pesquisa, João Paulo Gelamos^[23], durante seu trabalho de mestrado, estudou o aperfeiçoamento de protocolos de conjugação da proteína Albumina Sérica Bovina (BSA) a nanopartículas de sílica dopadas com terras raras para aplicações em imunoenaios.

Sabe-se que o estudo da quantificação de proteína BSA é de grande relevância, visto sua importância para identificação de doenças, como a cirrose hepática, em que a proteína é responsável por regular o nível plasmático. Desta forma, sua identificação pode auxiliar no diagnóstico e no tratamento desta doença^[24].

Estudos indicam que complexos de Ir(III) apresentam seletividade na detecção de albumina sérica^[4, 25]. Em meio ácido, a emissão do complexo é suprimida, enquanto a proteína sofre desnaturação reversível, levando à abertura parcial de sua estrutura e à exposição de bolsões hidrofóbicos^[26]. Nessa condição, o complexo pode se alojar nessas regiões internas, ficando protegido do ambiente ácido extremo. Além disso, a presença de grupos amina na proteína contribui para a restauração da emissão do complexo, permitindo assim a identificação da albumina.

Considerando os pontos discutidos e a experiência já consolidada pelo grupo de pesquisa no estudo de sistemas baseados em complexos de Ir^{III}, estabeleceu-se a motivação

para o desenvolvimento deste trabalho, com foco na investigação sistemática de propriedades fotofísicas relevantes para aplicações em meio biológico. Dessa forma, no período de 2024 até o presente momento, no âmbito do desenvolvimento do mestrado, foi conduzido o estudo que será apresentado nesta dissertação de mestrado.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral sintetizar e caracterizar dois novos complexos de Ir^{III} para emissores no vermelho e no amarelo para aplicação como sensores de Albumina de Soro Bovino (BSA) em solução ácida.

1.3.2. Objetivos específicos

- Sintetize e caracterizações estruturais e fotofísica dos complexos heterolépticos de irídio^{III} com os ligantes fppy (2-(2,4-difluorofenil)piridina), bqdc (2,2'-biquinolina-4,4'-diácido carboxílico) e bpdc (2,2'-bipiridina-3,3'-diácido carboxílico).
- Estudar a influência do pH (2,0 a 12,0) na emissão dos complexos, utilizando o tampão B.R. (Britton-Robinson).
- Verificar a sensibilidade da emissão dos complexos em meio ácido (pH 2,5) na presença de proteína BSA.
- Construir uma curva de calibração através da intensidade de emissão dos complexos em função da concentração da proteína BSA.

3.3. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, observou-se que a emissão do complexo IrQ apresenta elevada sensibilidade quando exposto à proteína BSA em meio ácido (pH 2,5). A concentração do complexo que demonstrou maior resposta foi de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, apresentando aumento significativo tanto na emissão quanto na absorção, especialmente considerando a banda em 370nm.

O complexo IrQ também apresentou um deslocamento significativo no máximo de emissão com o aumento da concentração de proteína, o que reforça o comportamento característico de complexos de Ir^{III}. Como a emissão nesses sistemas não é intrínseca ao centro metálico, mas fortemente dependente dos ligantes, observa-se influência direta do meio em que o complexo se encontra, resultando em efeitos rigidocrômico e solvatocrômico.

Adicionalmente, a determinação do limite de detecção (LOD) demonstrou que o complexo é capaz de detectar concentrações até 37 nmol L⁻¹ (2,4 mg L⁻¹), valor intermediário se considerarmos o LOD referente as absorções em 270 e 370 nm (57 e 28 nmol L⁻¹).

A detecção referente a banda de emissão do complexo encontra-se dentro da faixa relevante para a identificação de disfunções renais, considerando que concentrações urinárias de proteína em torno de ~ 30 mg L⁻¹ já são consideradas alarmantes, sendo capaz de detectar em uma faixa de 2,4mg L⁻¹ a 24,5 g L⁻¹. Dessa forma, o complexo IrQ se mostrou-se um candidato promissor para aplicações de sensoriamento de proteína em urina.

REFERÊNCIAS

- [1] CANISARES, Felipe S. M. *et al.* Red-emitting heteroleptic iridium(III) complexes: photophysical and cell labeling study. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 21, n. 6, p. 1077–1090, 1 jun. 2022a.
- [2] LIU, Xiao *et al.* Heterogeneous Catalysis for Water Oxidation by an Iridium Complex Immobilized on Bipyridine-Periodic Mesoporous Organosilica. **Angewandte Chemie**, v. 128, n. 28, p. 8075–8079, 4 jul. 2016b.
- [3] CANISARES, Felipe S. M. *et al.* Red-emitting heteroleptic iridium(III) complexes: photophysical and cell labeling study. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 21, n. 6, p. 1077–1090, 1 jun. 2022c.
- [4] HUANG, Chao *et al.* Synthesis and application of a water-soluble phosphorescent iridium complex as turn-on sensing material for human serum albumin. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 7, p. 2330–2336, 2018d.
- [5] KESSLER, Florian *et al.* Near-UV to red-emitting charged bis-cyclometallated iridium(III) complexes for light-emitting electrochemical cells. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 1, p. 180–191, 7 jan. 2012e.
- [6] SILVA, Renan C. *et al.* Featuring long-lifetime deep-red emitting iridium(III) complexes with high colour purity: insights into the excited state dynamics from spectroscopic and theoretical perspectives. **Dalton Transactions**, v. 53, n. 12, p. 5466–5477, 28 fev. 2024f.
- [7] STONELAKE, Thomas M. *et al.* Spectroscopic and Theoretical Investigation of Color Tuning in Deep-Red Luminescent Iridium(III) Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 59, n. 4, p. 2266–2277, 17 fev. 2020g.
- [8] YOU, Youngmin; PARK, Soo Young. Phosphorescent iridium(III) complexes: Toward high phosphorescence quantum efficiency through ligand control. **Journal of the Chemical Society. Dalton Transactions**, n. 8, p. 1267–1282, 10 fev. 2009h.
- [9] CAIKE SILVA, Renan. **ESTUDOS FOTOFÍSICOS DE COMPLEXOS BIMETÁLICOS DE IRÍDIO(III)-LANTANÍDEOS(III) PARA APLICAÇÃO EM CONCENTRADORES SOLARES LUMINESCENTES.** [S.l.: S.n.].
- [10] ZANONI, Kassio P. S. *et al.* Blue-green iridium(III) emitter and comprehensive photophysical elucidation of heteroleptic cyclometalated iridium(III) complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 4089–4099, 21 abr. 2014j.

- [11] LAMANSKY, S. *et al.* Synthesis and characterization of phosphorescent cyclometalated iridium complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1704–1711, 26 mar. 2001k.
- [12] FELIPE DA SILVA MANRIQUE CANISARES. **Complexos heterolépticos e heterobimetálicos de Eu(III) e Ir(III) utilizando ligantes ácidos carboxílicos e bases de Schiff**. Dissertação (Mestrado em Química)—São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 28 fev. 2019l.
- [13] CANISARES, Felipe S. M. *et al.* Syntheses and characterization of Schiff base ligands and their Ir(III) complexes as coating for phosphor-converted LEDs. **Optik**, v. 219, 1 out. 2020m.
- [14] SILVA, Renan C. *et al.* Featuring long-lifetime deep-red emitting iridium(III) complexes with high colour purity: insights into the excited state dynamics from spectroscopic and theoretical perspectives. **Dalton Transactions**, v. 53, n. 12, p. 5466–5477, 28 fev. 2024n.
- [15] NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. [S.l.: S.n.].
- [16] NARAYAN, Shoba *et al.* BSA binding to silica capped gold nanostructures: Effect of surface cap and conjugation design on nanostructure-BSA interface. **RSC Advances**, v. 4, n. 3, p. 1412–1420, 2014p.
- [17] SEEGMILLER, Jesse C.; BACHMANN, Lorin M. **Urine Albumin Measurements in Clinical Diagnostics**. **Clinical Chemistry** Oxford University Press, , 1 fev. 2024q.
- [18] ZHENG, Kangle *et al.* Measurement of the total protein in serum by biuret method with uncertainty evaluation. **Measurement: Journal of the International Measurement Confederation**, v. 112, p. 16–21, 1 dez. 2017r.
- [19] XU, Jian Fei *et al.* **Detection Methods and Research Progress of Human Serum Albumin**. **Critical Reviews in Analytical Chemistry** Taylor and Francis Ltd., , 2022s.
- [20] NONOYAMA, Matsuo. nonoyama1974. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 47, n. 3, p. 767–768, mar. 1974t.
- [21] YOSHIHARA, Toshitada *et al.* Mitochondria-targeted oxygen probes based on cationic iridium complexes with a 5-amino-1, 10-phenanthroline ligand. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 299, p. 172–182, 15 fev. 2015u.
- [22] THESIS, Ph D. **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” Instituto de Química Campus de Araraquara INVESTIGATION OF d, f, AND INTERMETALLIC COMPLEXES AND THE STRATEGIES TO APPLY THEM IN SOLID-STATE LIGHTING DEVICES, OXYGEN SENSING, AND CELL LABELING STUDY**. [S.l.: S.n.].

- [23] GELAMOS, João Paulo *et al.* Up-converter nanophosphor Y₂O₂S:Er,Yb aminofunctionalized containing or not spherical silica conjugated with BSA. **Journal of Luminescence**, v. 129, n. 12, p. 1726–1730, dez. 2009w.
- [24] YU, Chih Hao *et al.* Immobilization of BSA on silica-coated magnetic iron oxide nanoparticle. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 2, p. 537–543, 15 jan. 2009x.
- [25] CHEN, Qixiang *et al.* A novel cyclometallated iridium(III) complex based dual-mode phosphorescent probe for detection of acidity and bovine serum albumin. **Analytical Methods**, v. 11, n. 23, p. 3033–3040, 21 jun. 2019y.
- [26] DE RESENDE, Luiz Filipe Tsarbopoulos *et al.* Revisiting the conformational transition model for the pH dependence of BSA structure using photoluminescence, circular dichroism, and ellipsometric Raman spectroscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 259, 1 fev. 2024z.
- [27] SCHÖRKHUBER, Christian; KLAPURI, Anssi; SONTACCHI, Alois. **PITCH SHIFTING OF AUDIO SIGNALS USING THE CONSTANT-Q TRANSFORM**. [*S.l.: S.n.*].
- [28] SILVA, Renan C. *et al.* Featuring long-lifetime deep-red emitting iridium(III) complexes with high colour purity: insights into the excited state dynamics from spectroscopic and theoretical perspectives. **Dalton Transactions**, v. 53, n. 12, p. 5466–5477, 28 fev. 2024ab.
- [29] TELLINGHUISEN, Joel. Calibration: Detection, Quantification, and Confidence Limits Are (Almost) Exact When the Data Variance Function Is Known. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 14, p. 8715–8722, 10 jun. 2019ac.