

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química – Câmpus de Araraquara

FERNANDO EDUARDO MATURI

Proteínas fluorescentes como sensibilizadores de emissão em nanopartículas contendo Eu^{3+}

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro

Araraquara
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

M445p Maturi, Fernando Eduardo
Proteínas fluorescentes como sensibilizadores de
emissão em nanopartículas contendo Eu^{3+} / Fernando
Eduardo Maturi. – Araraquara : [s.n.], 2018
80 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Sidney José Lima Ribeiro

1. Nanopartículas. 2. Proteínas recombinantes.
3. Európio. 4. Bioconjugados. 5. Energia - Transferência.
I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Proteínas fluorescentes como sensibilizadores de emissão em nanopartículas contendo Eu^{3+} "

AUTOR: FERNANDO EDUARDO MATURI

ORIENTADOR: SIDNEY JOSE LIMA RIBEIRO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



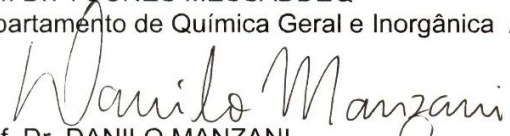
Prof. Dr. SIDNEY JOSE LIMA RIBEIRO

Departamento de Química Geral e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. YOUNES MESSADDEQ

Departamento de Química Geral e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. DANILO MANZANI

Departamento de Química e Física Molecular / Instituto de Química de São Carlos - USP - São Carlos

Araraquara, 25 de julho de 2018

DADOS CURRICULARES

Dados pessoais

Nome: Fernando Eduardo Maturi

Data de nascimento: 11/02/1991

Nacionalidade: Brasileiro

Naturalidade: Matão-SP

Estado Civil: Solteiro

Filiação: Fernando César Maturi e Sandra Eleni Félix Maturi

Formação Acadêmica

Licenciado em Química.

Curso de Licenciatura em Química concluído em Julho de 2016 no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Araraquara.

Formação Complementar

Intercâmbio Científico: Estágio de pesquisa realizado no Massachusetts Institute of Technology (MIT), Chemical Engineering Department, em Cambridge nos Estados Unidos, no período de 20 de Fevereiro a 30 de Agosto de 2017. Supervisor: Prof. Dr. Bradley D. Olsen.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao povo brasileiro que, mesmo muitas vezes sem nem saber, financia o desenvolvimento científico e tecnológico no país pela contribuição realizada com o pagamento de seus impostos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por toda a misericórdia que tem dispensado sobre mim, me concedendo saúde e por sempre ter me guiado por um caminho iluminado ao lado de pessoas maravilhosas.

Agradeço ao Prof. Dr. Sidney por todos os ensinamentos, confiança, amizade, paciência e oportunidades concedidas. Sem nenhuma dúvida, este trabalho e tudo aquilo que dele deriva não seriam possíveis sem a sua imensa contribuição.

Agradeço ao Prof. Dr. Bradley Olsen por ter gentilmente me acolhido junto ao seu grupo de pesquisa no MIT, me proporcionando um aprendizado único do qual nunca irei me esquecer.

Agradeço de coração aos amigos que conquistei ao longo desses anos no Instituto de Química, principalmente àquelas amizades firmadas durante a graduação. Évelin, Fabi, Gabi e Maybis, estar ao lado de vocês me mostrou que muitas vezes o melhor remédio para a dor é uma risada arrancada despretensiosamente.

Agradeço imensamente aos amigos do Laboratório de Materiais Fotônicos pelos conselhos e ensinamentos. Ariane, César, Chanchal, Danilo, Gabriel, Gustavo, Hernane, Juliana, Juliane, Karina, Laís(es), Maurício, Molíria, Rafael(éis), Robson, Sajjad, Samira, Sílvia, Tâmara, Vanessa, York e aos demais, vocês me mostraram que fazer ciência é muito mais gratificante ao lado de pessoas com bom coração. Agradeço também ao Prof. Dr. Édison e Prof. Dr. Marcelo por toda a ajuda que me concederam ao longo desses anos, direta ou indiretamente.

Agradeço aos colegas do Olsen Lab, que com muita paciência me acolheram e ensinaram, tornando minha estadia muito mais agradável. Aaron, Carrie, Danielle, Daphne, Helen, Hursh, Rachele, Reggie, Sieun, Takuya and Yung-Jung: you guys are awesome!

Agradeço à Profa. Dra. Andréa e à Tássia do Laboratório de Espectroscopia de Materiais Funcionais (LEMAF) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC, USP) por todo o auxílio com as medidas de tempo de vida de emissão das proteínas fluorescentes e dos bioconjugados.

Agradeço aos meus amigos de longa data, junto dos quais sempre pude compartilhar momentos de imensa alegria. Alessandro, Camila, Carla, Edra, Gustavo, Juliana, Lucimara, Mayra, Paolo, Robert, Roger, Tiago(s), Weliton e Wilder, com vocês aprendi que o fardo dessa jornada chamada vida é muito mais leve quando se tem bons companheiros para ajudar a carregá-lo.

Agradeço grandemente aos meus avós, tios e primos, de mais perto ou de mais longe, que sempre me apoiaram. Mesmo muitas vezes tendo que abdicar de estar com vocês para realizar

meus estudos, nunca poderei descrever o quão feliz sou por ter vocês como maiores referências em minha vida.

Agradeço às agências de fomento brasileiras CAPES pela bolsa concedida e FAPESP pelo auxílio financeiro para a minha estadia no MIT (Processo 15/50382-2).

Agradeço à minha namorada, que ao longo desses dois anos sempre me apoiou, com muita compreensão e principalmente paciência. Mesmo com a distância, cercados de incertezas e angústias, nunca lhe faltou palavras de consolo e um abraço reconfortante para me fazer seguir em frente. Por tudo, meu mais sincero obrigado e profundo eu te amo!

Por último, mas não menos importante, agradeço incondicionalmente aos meus pais e irmã. Não há motivação maior que saber que, mesmo em situações adversas, vocês fizeram o possível e impossível para que eu pudesse ter uma vida digna e chegar onde eu cheguei. Espero que algum dia eu possa retribuir de alguma maneira todo o esforço e amor que me dedicaram. O título de mestre lhes cabe muito melhor do que a mim, pois tenho e sempre terei vocês como meus maiores professores. Amo vocês!

“(...) A ciência incha mas o amor edifica. E, se alguém cuida saber alguma coisa, ainda não sabe como convém saber.”

(I Aos Coríntios Capítulo 8, versos 1-2)

RESUMO

Este trabalho descreve o preparo de bioconjugados obtidos pela associação das proteínas fluorescentes Azurite, EGFP, mTangerine e mCherry com nanopartículas de ortovanadato de ítrio dopadas com európio ($\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$) para o estudo de processos de transferência de energia que viabilizem o aumento da emissão do íon Eu^{3+} . A reação em estado sólido do carbonato de sódio com o precursor metavanadato de sódio foi utilizada para a obtenção do ortovanadato de sódio, o qual foi empregado na síntese das nanopartículas pelo método de coprecipitação. As nanopartículas obtidas apresentaram diâmetro médio de 44 nm e foram funcionalizadas com o grupo maleimida pela reação do citrato com a 2-maleimidoetilamina através do acoplamento carbodiimida EDC/Sulfo-NHS para posterior bioconjugação com as proteínas fluorescentes. Sob excitação na região do UV, as nanopartículas apresentaram intensa emissão na região vermelha, característica da transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ do Eu^{3+} em 618 nm.

Plasmídeos contendo os genes de codificação das proteínas Azurite e mTangerine foram construídos, subclonados em vetores pQE-9 e geneticamente modificados para expressão em linhagens de *E. coli* apropriadas. As proteínas EGFP e mCherry também foram expressas a partir de plasmídeos previamente preparados, seguidas de purificação por cromatografia de afinidade juntamente com as proteínas Azurite e mTangerine. O rendimento médio de expressão obtido foi de 90 mg L^{-1} e as 4 proteínas expressas foram bioconjugadas às nanopartículas de Eu^{3+} sintetizadas através da reação *click* tiol-maleimida para estudos de transferência de energia.

Os resultados obtidos mostram que, sob excitação em 307 nm, a energia proveniente da emissão das proteínas Azurite e EGFP é não-radiativamente transferida para o nível emissor $^5\text{D}_0$ do Eu^{3+} , aumentando tanto a intensidade quanto o tempo de vida de emissão das nanopartículas. Um aumento de 4,3 e 2,5 vezes da emissão do Eu^{3+} foi observado após a bioconjugação das nanopartículas com as proteínas Azurite e EGFP, respectivamente. No entanto, as proteínas mTangerine e mCherry não se mostraram viáveis para a sensibilização do Eu^{3+} .

Palavras-chaves: Nanopartículas de európio, proteínas fluorescentes, lantanídeos, transferência de energia, bioconjugados.

ABSTRACT

This work describes the preparation of bioconjugates through the combination of Azurite, EGFP, mTangerine and mCherry fluorescent proteins with europium doped yttrium orthovanadate nanoparticles ($\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$) for energy transfer studies aiming the sensitization of Eu^{3+} emission. The solid state reaction between sodium carbonate and sodium metavanadate was performed to obtain the sodium orthovanadate, which was used for the nanoparticles synthesis by the co-precipitation method. The obtained nanoparticles present mean diameter of 44 nm and were functionalized with maleimide group through carbodiimide EDC/Sulfo-NHS coupling for further bioconjugation with the fluorescent proteins. Under UV excitation, the nanoparticles displayed strong red emission, characteristic of the $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ Eu^{3+} transition at 618 nm.

Plasmids containing the Azurite and mTangerine genes were developed, cloned into pQE-9 vector and mutated for expression in *E. coli* strains. The EGFP and mCherry proteins were also expressed from previously prepared plasmids, followed by affinity chromatography purification along with the Azurite and mTangerine proteins. The mean expression yield was 90 mg L^{-1} and all proteins were conjugated with the nanoparticles through thiol-maleimide click chemistry.

The results showed that under 307 nm excitation, Azurite and EGFP emission energy is non-radiatively transferred to Eu^{3+} $^5\text{D}_0$ emitting level, increasing both emission lifetime and intensity of the nanoparticles. The bioconjugation of Azurite and EGFP yields a 4.3 and 2.5-fold Eu^{3+} emission increase, respectively. However, mTangerine and mCherry are not suitable for Eu^{3+} sensitization.

Keywords: Europium nanoparticles, fluorescent proteins, lanthanides, energy transfer, bioconjugates.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação da luminescência mediante aos diversos tipos de fontes de excitação utilizados (a) e esquema representando a paridade dos elétrons em níveis singlete e triplete (b). O diagrama de Jablonski (c) ilustra a absorção de luz (I) que pode gerar fluorescência (II) ou fosforescência (III).	20
Figura 2 - Representação da estrutura cristalina da GFP (a) e formação do seu grupo cromóforo (b).	21
Figura 3 - Desenvolvimento das FPs Azurite, EGFP, mTangerine e mCherry. A proteína mCherry também recebe aminoácidos provenientes da EGFP, além de 4 aminoácidos como espaçadores na posição denominada 6a-d para aumentar sua fluorescência.	22
Figura 4 - Ligante NTA na forma protonada (a) e representação da imobilização do complexo Ni-NTA em esferas de agarose (b).	24
Figura 5 - Esquema representativo do vetor de expressão pQE-9 com promotor T5 e resistência à ampicilina. Adaptado do site do fornecedor.	26
Figura 6 - Esquema representativo da sensibilização de luminescência do íon lantanídeo Eu^{3+} . Inicialmente, um ligante pode ser excitado por luz UV (a). O nível singlete no estado excitado pode sofrer fluorescência (b), mas se ocorrer um cruzamento inter-sistemas, o estado triplete pode fosforescer (c). A energia do estado triplete também pode ser transferida ao Eu^{3+} , ocorrendo a emissão (d).	28
Figura 7 - Esquema representativo demonstrando as condições necessárias para a ocorrência de FRET entre duas moléculas fluorescentes. A energia de emissão do doador deve ser absorvida pelo receptor para que se ocorra FRET (a). Para uma distância menor que 10 nm, a energia pode ser transferida do doador para o receptor (b). FRET ocorrerá apenas se houver uma orientação adequada entre doador e receptor (c).	30
Figura 8 - Funcionalização das Eu-NPs com o grupo maleimida e posterior bioconjugação com as FPs obtidas. O mesmo procedimento foi utilizado para as proteínas Azurite, mTangerine e mCherry.	41
Figura 9 - Difratoograma de raios X do precursor NaVO_3 (a), do $\alpha\text{-NaVO}_3$ - PDF 32-1197 (b) e do $\beta\text{-NaVO}_3$ - PDF 32-1198 (c). As linhas em vermelho, azul e verde destacam o sinal mais intenso observado para o precursor e os principais padrões de difração relativos às fases α e β , respectivamente.	46
Figura 10 - Espectro de MAS-RMN (14 kHz) do ^{51}V do NaVO_3 (a). Os picos referentes à transição central (+1/2 e -1/2) das duas fases cristalinas $\alpha\text{-NaVO}_3$ e $\beta\text{-NaVO}_3$ estão identificadas	

com o asterisco. O quadro em destaque mostra a região ampliada dos picos referente às duas fases cristalinas. Representação das cadeias de metavanadato no α - NaVO_3 (b) e β - NaVO_3 (c).	47
Figura 11 - Espectro 2D de TQ-MAS de RMN de ^{23}Na do precursor NaVO_3 (a) e as projeções extraídas da dimensão F2 para cada sítio de sódio (b).	48
Figura 12 - Comparação entre o espectro de MAS-RMN de ^{23}Na do NaVO_3 e a simulação do espectro experimental. A imagem em destaque mostra a decomposição de cada um dos sítios de sódio não equivalentes.	49
Figura 13 - Espectro de MAS-RMN (14 kHz) de ^{51}V do NaVO_3 após o tratamento térmico. O pico referente à transição central (+1/2 e -1/2) da fase cristalina α - NaVO_3 está identificado com um asterisco.	50
Figura 14 - Espectro 2D de TQ-MAS de RMN de ^{23}Na do precursor NaVO_3 após o tratamento térmico (a) e as projeções extraídas da dimensão F2 para cada sítio de sódio (b).	51
Figura 15 - Comparação entre o espectro de MAS-RMN de ^{23}Na do NaVO_3 após o tratamento térmico (TT) e a simulação do espectro experimental. A imagem em destaque mostra a decomposição de cada um dos sítios de sódio não equivalentes.	51
Figura 16 - Espectros Raman na região de 100 à 1000 cm^{-1} destacando os modos vibracionais característicos do precursor NaVO_3 utilizado (a) e do Na_3VO_4 sintetizado (b).	53
Figura 17 - Espectro de MAS-RMN de ^{51}V (14 kHz) do Na_3VO_4 . As transições centrais estão denotadas pelo asterisco e o quadro em destaque mostra a região ampliada dessas transições.	54
Figura 18 - Difratoograma de raios X das nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ e do YVO_4 (PDF 72-861).	55
Figura 19 - Espectro de MAS-RMN de ^{51}V (14 kHz) das nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ em estado sólido. As transições centrais estão denotadas pelo asterisco e o quadro em destaque mostra a região ampliada dessas transições.	56
Figura 20 - Imagens de HRTEM (a) e SAED das nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ preparadas (b).	57
Figura 21 - Espectro de EDS das nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (a). A imagem em destaque mostra a região onde foi realizado o mapeamento. Raio hidrodinâmico das nanopartículas (b).	57
Figura 22 - Espectros de excitação monitorando a emissão em 618 nm e de emissão com excitação em 307 nm das Eu-NPs obtidas após a funcionalização (a). A linha tracejada denota	

a região de 390 à 470 nm do espectro de excitação ampliada. Diagrama esquemático dos níveis de energia do Eu^{3+} mostrando as transições responsáveis pela emissão das Eu-NPs (b)..... 58

Figura 23 - Gel de agarose 1% revelado com SYBR® Safe contendo o DNA do vetor pQE-9 e das proteínas Azurite (a) e mTangerine (b) após a digestão. Os números nas colunas à esquerda e direita indicam os padrões de referência utilizados, com valores em kb..... 60

Figura 24 - Gel de SDS-PAGE 12% revelado com Coomassie Brilliant Blue das proteínas Azurite (a), EGFP (b), mTangerine (c) e mCherry (d) após purificação. Os valores marcados próximos às bandas correspondem ao valor de massa molecular calculado pela sequência de aminoácidos. A coluna à esquerda mostra o padrão de massa molecular utilizado, em kDa... 62

Figura 25 - Espectros de absorção (linha tracejada) e de emissão sob excitação em 280 nm (linha contínua) das proteínas Azurite (a), EGFP (b), mTangerine (c) e mCherry (d). A imagem em destaque mostra, da esquerda para a direita, as soluções das proteínas Azurite, EGFP, mTangerine e mCherry irradiadas com luz branca (superior) e com luz ultravioleta (inferior). 63

Figura 26 - Espectros de excitação monitorando a emissão em 618 nm (a) e de emissão sob excitação em 307 nm (b) das nanopartículas de Eu^{3+} e de seus conjugados com a proteína Azurite. O quadro em b mostra a intensidade relativa da emissão do Eu^{3+} (i/i_0 , onde i_0 é a intensidade integrada da transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ das Eu-NPs na ausência de proteína e i é a intensidade integrada da mesma transição no bioconjugado Azurite/Eu-NPs) em função da concentração de Azurite. 65

Figura 27 - Espectros de excitação monitorando a emissão em 618 nm (a) e de emissão sob excitação em 307 nm (b) das nanopartículas de Eu^{3+} e de seus conjugados com a proteína EGFP. O quadro em b mostra a intensidade relativa da emissão do Eu^{3+} (intensidade integrada da transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$) em função da concentração de EGFP..... 66

Figura 28 - Espectros de excitação monitorando a emissão em 618 nm (a) e de emissão sob excitação em 307 nm (b) das nanopartículas de Eu^{3+} e de seus conjugados com a proteína mTangerine. O quadro em b mostra a intensidade relativa da emissão do Eu^{3+} (intensidade integrada da transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$) em função da concentração de mTangerine..... 68

Figura 29 - Espectros de excitação monitorando a emissão em 618 nm (a) e de emissão sob excitação em 307 nm (b) das nanopartículas de Eu^{3+} e de seus conjugados com a proteína mCherry. O quadro em b mostra a intensidade relativa da emissão do Eu^{3+} (intensidade integrada da transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$) em função da concentração de mCherry..... 69

Figura 30 - Esquema representativo do diagrama de níveis de energia do íon Eu^{3+} e das FPs utilizadas. Como os níveis de energia das proteínas não são tão bem definidos quanto os dos íons lantanídeos, eles são apresentados como o máximo de sua emissão apenas para propósito de comparação. O nível emissor $^5\text{D}_0$ do Eu^{3+} está destacado com um losango. 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos <i>primers</i> utilizados.....	36
Tabela 2 - Programa de temperatura utilizado na reação de PCR.	39
Tabela 3 - Desvio químico isotrópico (δ_{iso}) constante quadrupolar (C_q) e parâmetro de simetria (η_q) calculados a partir dos espectros de MAS-RMN e TQ-MAS de ^{23}Na do precursor NaVO_3	49
Tabela 4 - Desvio químico isotrópico (δ_{iso}) constante quadrupolar (C_q) e parâmetro de simetria (η_q) calculados a partir dos espectros de MAS-RMN e TQ-MAS de ^{23}Na do $\alpha\text{-NaVO}_3$ obtido.	52
Tabela 5 - Atribuição das bandas Raman observadas para o NaVO_3 e Na_3VO_4	53
Tabela 6 - Sequência de aminoácido e estrutura das proteínas Azurite, EGFP, mTangerine e mCherry, incluindo o 6xHis-Tag. Os aminoácidos presentes nos grupos cromóforos encontram-se em destaque.	61
Tabela 7 - Determinação espectrofotométrica do rendimento de expressão das FPs.....	62
Tabela 8 - Comprimentos de onda de absorção e emissão das FPs obtidas.	64
Tabela 9 - Concentração final das proteínas após bioconjugação com as Eu-NPs e nomenclatura adotada para cada uma das amostras obtidas.....	64
Tabela 10 - Tempo de vida de emissão dos bioconjugados obtidos com a proteína Azurite. O tempo de vida do Eu^{3+} (τ_{Eu}) foi determinado com excitação em 307 nm e monitorando sua emissão em 618 nm enquanto o tempo de vida da Azurite (τ_{Azurite}) foi determinado com excitação em 290 nm e monitorando sua emissão em 450 nm.....	66
Tabela 11 - Tempo de vida de emissão dos bioconjugados obtidos com a proteína EGFP. O tempo de vida do Eu^{3+} (τ_{Eu}) foi determinado com excitação em 307 nm e monitorando sua emissão em 618 nm enquanto o tempo de vida da Azurite (τ_{EGFP}) foi determinado com excitação em 290 nm e monitorando sua emissão em 510 nm.....	67
Tabela 12 - Tempo de vida de emissão dos bioconjugados obtidos com a proteína mTangerine. O tempo de vida do Eu^{3+} (τ_{Eu}) foi determinado com excitação em 307 nm e monitorando sua emissão em 618 nm enquanto o tempo de vida da mTangerine ($\tau_{\text{mTangerine}}$) foi determinado com excitação em 290 nm e monitorando sua emissão em 585 nm.....	68
Tabela 13 - Tempo de vida de emissão dos bioconjugados obtidos com a proteína mCherry. O tempo de vida do Eu^{3+} (τ_{Eu}) foi determinado com excitação em 307 nm e monitorando sua emissão em 618 nm enquanto o tempo de vida da mTangerine (τ_{mCherry}) foi determinado com excitação em 290 nm e monitorando sua emissão em 610 nm.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

Simbologia e nomenclatura padrão utilizada para aminoácidos.

Código de uma letra	Código de três letras	Nome
A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido aspártico (Aspartato)
E	Glu	Ácido glutâmico (Glutamato)
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina

Simbologia e nomenclatura padrão utilizada para nucleotídeos.

Código de uma letra	Nome
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina

Demais abreviaturas utilizadas.

bp	pares de bases
BME	β -mercaptoetanol
DO ₆₀₀	densidade óptica em 600 nm
DRX	Difratograma de raios X
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	hidrocloro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kb	kilo pares de bases
kDa	kilodalton
MWCO	valor de corte de massa molecular
Ni-NTA	<i>nickel nitrilotriacetic acid</i>
NIR	infravermelho próximo
NTA	ácido nitrilotriacético
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDF	<i>Powder Diffraction File</i>
RMN	ressonância magnética nuclear
RPM	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
Sulfo-NHS	N-hidroxisulfosuccinimida
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TCEP	tris-(2-carboxietil)fosfina
Tris	tris-(hidroximetil)aminometano
UV	ultravioleta
UV-Vis	ultravioleta visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Proteínas fluorescentes	20
1.1.1	Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados	23
1.1.2	DNA recombinante.....	25
1.2	Lantanídeos.....	26
1.2.1	Nanopartículas de Eu^{3+}	28
1.3	Transferência de energia	29
2	OBJETIVOS.....	32
2.1	Objetivos específicos	32
3	MATERIAIS	33
3.1	Linhagens.....	33
3.2	Meio de cultura	34
3.2.1	LB	34
3.2.2	LB ágar	34
3.3	Tampões e soluções	34
3.3.1	Tampão Tris.....	34
3.3.2	Tampão para lise celular.....	34
3.3.3	Tampão TAE	35
3.3.4	Tampão de amostra (Laemmli 6x).....	35
3.3.5	Soluções para cromatografia de afinidade.....	35
3.4	Oligonucleotídeos <i>primers</i>	35
4	METODOLOGIA.....	37
4.1	Síntese das nanopartículas de Eu^{3+}	37
4.2	Funcionalização das nanopartículas.....	38
4.3	Construção dos plasmídeos.....	38

4.3.1	Reação em cadeia da polimerase	39
4.4	Mutagênese sítio dirigida	39
4.5	Expressão das proteínas	40
4.6	Purificação das proteínas	40
4.7	Bioconjugação das proteínas com as nanopartículas	41
5	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	42
5.1	Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível.....	42
5.2	Espectroscopia de fluorescência	42
5.3	Espectroscopia de fotoluminescência	42
5.4	Espectroscopia de espalhamento Raman	43
5.5	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	43
5.6	Difratometria de raios X	44
5.7	Microscopia eletrônica de transmissão	44
5.8	Espalhamento dinâmico de luz	44
5.9	Eletroforese em gel de agarose	44
5.10	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	45
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	46
6.1	Caracterização das nanopartículas de $\text{YVO}_4\text{:Eu}^{3+}$	46
6.2	Expressão e purificação das proteínas fluorescentes	60
6.3	Bioconjugados de proteínas fluorescentes com nanopartículas de Eu^{3+}	64
7	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

Entre a diversidade de substâncias existentes, os compostos emissores de luz merecem destaque pela variedade de aplicações tecnológicas às quais podem ser empregados. A emissão de luz pode ocorrer por dois caminhos distintos: por incandescência, que é a emissão gerada pelo aquecimento, e por luminescência, que é a “luz fria” emitida em menores temperaturas a partir de outras fontes de energia. Os dispositivos luminescentes fazem parte da civilização moderna e podem ser encontrados em diferentes tipos de lâmpadas, televisões, *displays* móveis, diodos emissores de luz (LED, *light emitting diodes*) e sinalizadores (MURTHY; VIRK, 2014). A luminescência consiste na absorção de energia proveniente de uma fonte de excitação, que promove os elétrons do sistema para um maior nível de energia (estado excitado), e no subsequente retorno desses elétrons para seu estado fundamental, que é acompanhado da emissão de fótons (NIYAMA et al., 2004; MURTHY; VIRK, 2014).

Devido à grande variedade de fontes de excitação existentes, a luminescência é comumente classificada de acordo com o tipo da fonte de excitação utilizada. A fotoluminescência ocorre pela excitação por luz UV-Vis, a radioluminescência é gerada pela excitação proveniente de radiação nuclear (partículas α , partículas β e raios γ) e a excitação por feixes de elétrons é chamada de catodoluminescência. A luminescência também pode ser gerada por energia mecânica (triboluminescência) ou por reações químicas (quimioluminescência), que recebe o nome de bioluminescência quando se dá por processos bioquímicos (MCKEEVER, 1985). No caso da fotoluminescência, ainda é possível realizar subclassificações de acordo com o tempo decorrido entre a excitação e o retorno ao estado fundamental (tempo de vida de emissão, τ), que depende da natureza dos níveis de energia envolvidos na transição eletrônica (LAKOWICZ, 1999; MURTHY; VIRK, 2014).

Um nível de energia que apresenta multiplicidade igual a 1 é chamado de nível singlete (S) e seu estado excitado apresenta um elétron com orientação oposta ao elétron presente em seu estado fundamental. A emissão proveniente da transição eletrônica entre esses dois estados ocorre rapidamente, com valores de τ na ordem de nanossegundos, sendo denominada fluorescência (BALDO; THOMPSON; FORREST, 2000). Os níveis de energia com multiplicidade igual a 3 são denominados níveis triplete (T), onde seu estado excitado abriga um elétron com mesma orientação que o elétron presente no seu estado fundamental. Nesse caso, a emissão ocorre em uma taxa muito menor, com valores de τ tipicamente maiores que milissegundos, recebendo o nome de fosforescência (LAKOWICZ, 1999; BALDO; THOMPSON; FORREST, 2000). Um ponto importante a ser destacado é o fato de nem sempre

ser possível distinguir se a emissão ocorre por fluorescência ou fosforescência (LAKOWICZ, 1999; MURTHY; VIRK, 2014), mas a sua compreensão se faz necessária para determinar onde podem ser melhor empregadas (Figura 1).

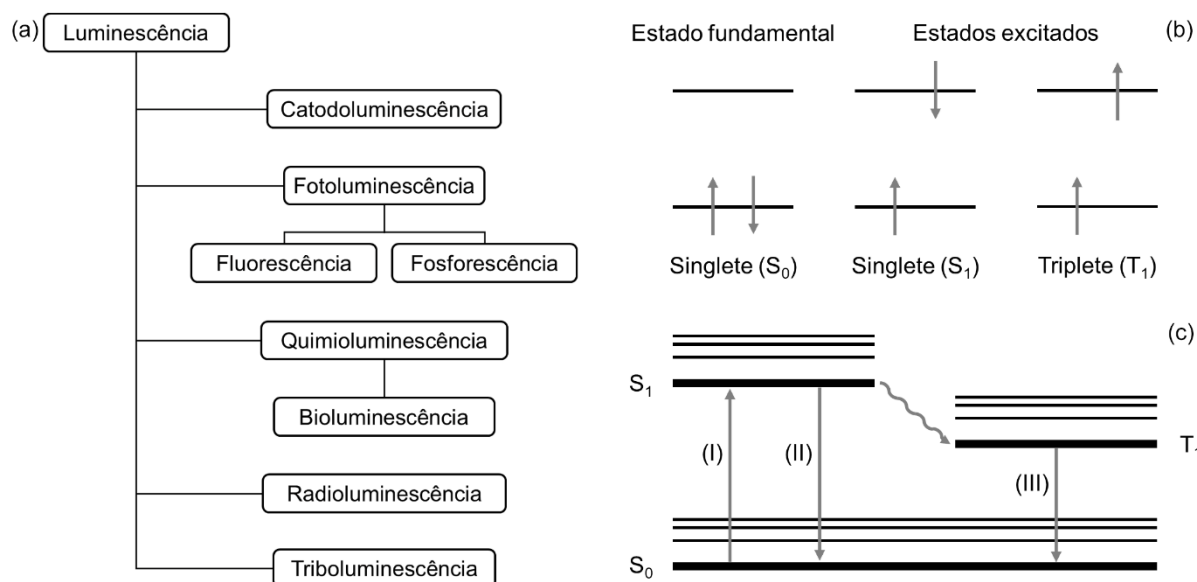


Figura 1 - Classificação da luminescência mediante aos diversos tipos de fontes de excitação utilizados (a) e esquema representando a paridade dos elétrons em níveis singlete e triplete (b). O diagrama de Jablonski (c) ilustra a absorção de luz (I) que pode gerar fluorescência (II) ou fosforescência (III).

O fenômeno de fotoluminescência é especialmente importante para aplicações na área de fotônica, como a produção de lasers e guias de onda, o desenvolvimento de marcadores biológicos e sensores químicos e a fabricação de dispositivos emissores de luz. Entre as classes de compostos mais utilizadas para esses fins, podem ser destacados os metais de transição, corantes orgânicos, complexos e nanopartículas de íons lantanídeos (BLASSE; GRABMAIER, 1994). Biomoléculas como proteínas fluorescentes também tem sido amplamente empregadas, principalmente em aplicações envolvendo imageamento celular (PISTON; KREMERS, 2007).

1.1 Proteínas fluorescentes

O uso de proteínas fluorescentes (FPs, do inglês *fluorescent proteins*) em biotecnologia foi disseminado após a descoberta e elucidação das propriedades estruturais e fluorescentes da proteína denominada GFP (*green fluorescent protein*) (TSIEN, 1998). Durante a década de 60, a proteína GFP foi inicialmente observada por Shimomura *et al.* (1962) junto com a proteína aequorina presente na água viva *Aequorea victoria*. Anos mais tarde a GFP foi isolada e caracterizada, mostrando que a bioluminescência da *Aequorea victoria*, com emissão de luz

verde na região de 510 nm, ocorria pela transferência de energia da aequorina para a GFP (MORISE; SHIMOMURA; JOHNSON, 1974). Apenas em 1996 a estrutura cristalina da GFP foi reportada (ORMÖ et al., 1996), mostrando que essa proteína é constituída por 238 resíduos de aminoácidos que se organizam na forma de 11 folhas β antiparalelas que se dispõem como um barril que abriga o grupo cromóforo responsável por sua fluorescência (Figura 2.a). O grupo cromóforo da GFP é constituído pelos resíduos de aminoácidos Ser, Tyr e Gly nas posições 65, 66 e 67 da sequência da proteína, respectivamente. A disposição tridimensional desses três resíduos de aminoácidos permite a ocorrência de uma série de reações intramoleculares que, na presença de O_2 , contribuem para a formação de um anel imidazolinona altamente conjugado, o qual é responsável pelas propriedades fluorescentes da GFP (Figura 2.b) (DAY; DAVIDSON, 2009).

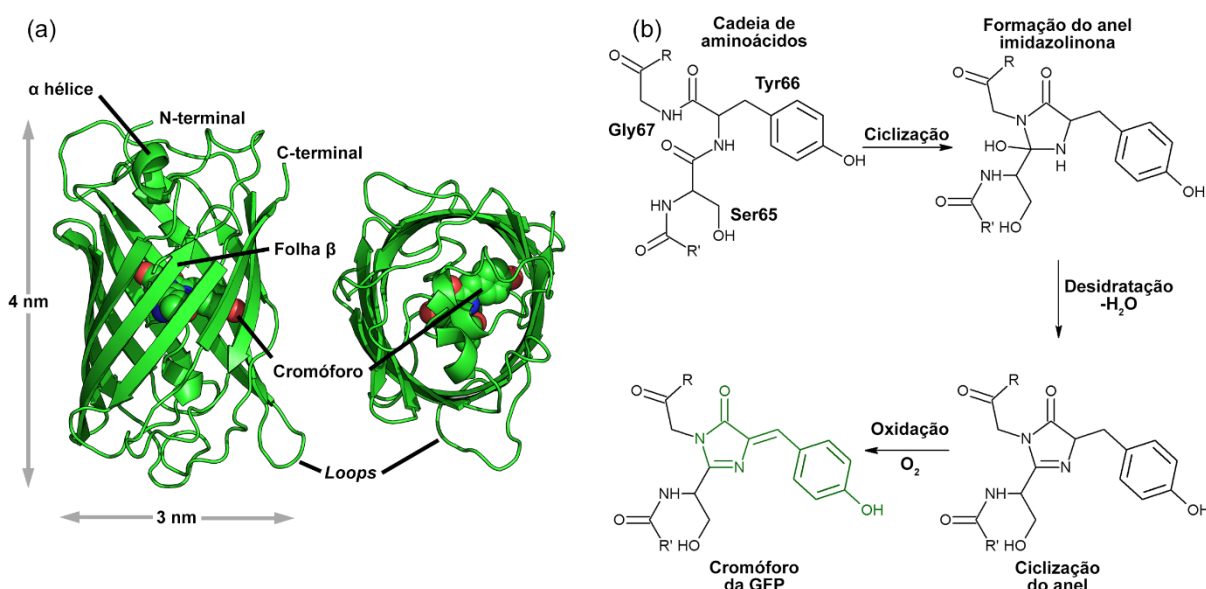


Figura 2 - Representação da estrutura cristalina da GFP (a) e formação do seu grupo cromóforo (b).

O emprego de técnicas de engenharia genética para a modificação do grupo cromóforo da GFP possibilitou o desenvolvimento de novas FPs com emissão em diferentes regiões do espectro visível, além de melhorias relacionadas à fotoestabilidade e maior rendimento quântico (TSIEN, 1998; PATTERSON; DAY; PISTON, 2001; ZHANG et al., 2002). A proteína Azurite, por exemplo, é uma versão com maior fotoestabilidade que sua precursora BFP (*blue fluorescent protein*), uma proteína derivada da GFP que apresenta emissão na região azul do espectro eletromagnético (MENA et al., 2006). A proteína EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) também foi obtida por mutações na GFP e apresenta maior brilho e melhor eficiência

para sua conformação durante a expressão, mantendo sua emissão verde (ROYANT; NOIRCLERC-SAVOYE, 2011).

Anos mais tarde, a proteína DsRed foi isolada do coral *Discosoma sp.*, obtida na forma tetramérica com emissão de coloração vermelha e apresentando algumas similaridades estruturais à GFP (SHANER et al., 2004). Através de mutações realizadas na DsRed a proteína monomérica mRFP1 foi produzida, servindo como precursora para o desenvolvimento das “mFruits”, que são FPs nomeadas com os nomes das frutas que apresentam a cor característica dos seus comprimentos de onda de emissão (SHANER, 2013). As proteínas mTangerine e mCherry, por exemplo, apresentam emissão nas regiões laranja e vermelha do espectro eletromagnético (SHANER et al., 2004).

As proteínas Azurite, EGFP, mTangerine e mCherry se destacam porque apresentam algumas vantagens em relação às demais FPs, como maior fotoestabilidade, diferentes comprimentos de onda de emissão na região visível do espectro eletromagnético e absorção tanto na região do visível quanto do UV. O trabalho de engenharia genética realizado por Mena *et al.* (2006), Shaner *et al.* (2004) e Cormack *et al.* (1996) no desenvolvimento dessas proteínas encontra-se sumarizado na Figura 3. Os códigos representam as mutações empregadas em cada etapa, onde a primeira e última letras mostram os resíduos de aminoácido original e após a mutação, respectivamente, e o número indica sua posição na sequência de aminoácidos.

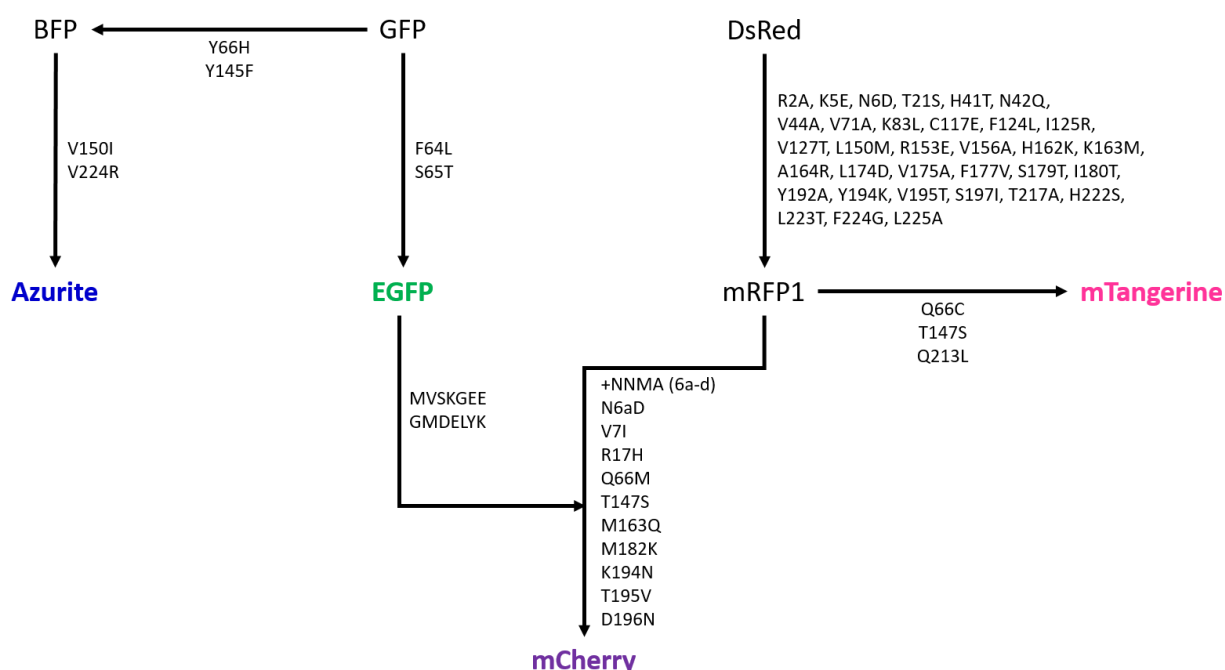


Figura 3 - Desenvolvimento das FPs Azurite, EGFP, mTangerine e mCherry. A proteína mCherry também recebe aminoácidos provenientes da EGFP, além de 4 aminoácidos como espaçadores na posição denominada 6a-d para aumentar sua fluorescência.

Além das propriedades fluorescentes, a facilidade de se inserir o gene responsável pela produção das FPs em outros organismos através de técnicas de biologia molecular, como o uso de DNA recombinante, popularizou o emprego de FPs no estudo de sistemas biológicos. A engenharia genética também permitiu realizar pequenas modificações nas FPs, facilitando sua purificação por cromatografia de afinidade.

1.1.1 Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados

A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC, *immobilized metal affinity chromatography*) é uma técnica de separação que consiste em utilizar um íon metálico imobilizado em uma matriz como sítio de coordenação para alguns aminoácidos (GABERC-POREKAR; MENART, 2001). A histidina é o aminoácido que exibe a maior afinidade por íons metálicos, pois o anel imidazol presente em sua cadeia lateral apresenta uma elevada densidade eletrônica, o que o torna um bom grupo doador de elétrons e facilita sua coordenação com íons metálicos (BORNHORST; FALKE, 2000). Íons de metais de transição como Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} e Fe^{3+} são bons receptores de elétrons e, por isso, complexos desses metais são comumente inseridos em matrizes de imobilização para coordenação com resíduos de histidina. A imobilização ocorre pela ancoragem do complexo em uma matriz polimérica insolúvel, como agarose ou poliacrilamida, formando uma resina em que o ligante se encontra covalentemente ligado à superfície do polímero (CUATRECASAS, 1970).

A resina de agarose contendo o complexo Ni-NTA é a mais utilizada para a purificação de proteínas recombinantes por IMAC, pois esse complexo apresenta elevada afinidade por histidina e baixa taxa de lixiviação, além de ser possível utilizar hidrocarbonetos com tamanhos de cadeia distintas como elo de ligação entre a matriz de agarose e o ligante NTA (CUATRECASAS, 1970; BORNHORST; FALKE, 2000; GABERC-POREKAR; MENART, 2001). Nesse complexo, o Ni^{2+} apresenta número de coordenação 6 e o NTA é um ligante tetradentado, de maneira que os dois sítios de coordenação restantes são ocupados por moléculas de água, que podem ser substituídas posteriormente por resíduos de histidina presentes na sequência das proteínas (Figura 4).

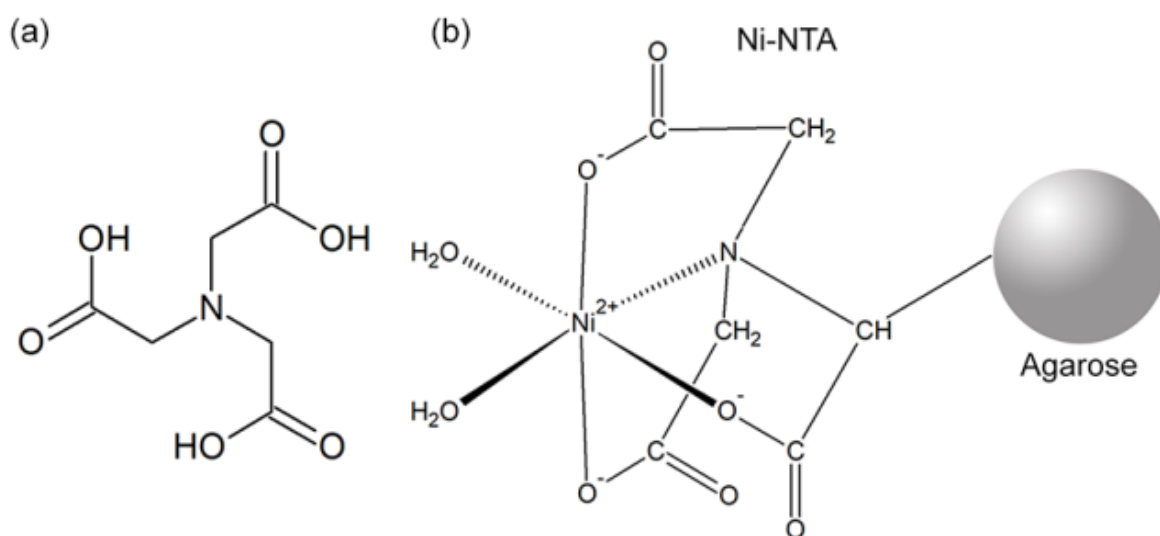


Figura 4 - Ligante NTA na forma protonada (a) e representação da imobilização do complexo Ni-NTA em esferas de agarose (b).

Apesar de ser possível substituir as moléculas de água por resíduos nativos de histidina, a substituição apenas ocorrerá se esses resíduos estiverem expostos na superfície da proteína e se apresentarem distância adequada, orientação favorável e sítios múltiplos disponíveis para coordenação com o íon metálico (GABERC-POREKAR; MENART, 2005). A abordagem empregada para melhorar a eficiência de purificação utilizando Ni-NTA é a engenharia genética para inserção de marcadores de poli-histidina no início ou fim da sequência das proteínas, que consistem em repetições de resíduos de histidina (GABERC-POREKAR; MENART, 2005). O marcador mais utilizado é o 6xHis-Tag, repetição com 6 resíduos de histidina que não afeta a estrutura e função da proteína e pode ser inserido na sua região N- ou C-terminal utilizando diferentes vetores de expressão (CROWE et al., 1994).

Como a interação com o Ni-NTA não depende da estrutura terciária do 6xHis-Tag, a purificação pode ser realizada mesmo sob condições desnaturantes, permitindo que a proteína de interesse se mantenha ligada ao complexo enquanto biomoléculas indesejadas podem ser removidas por lavagem (CROWE et al., 1994). Após a lavagem a proteína pode ser eluída ajustando o pH ou adicionando uma solução com alto teor de imidazol, resultando na obtenção da proteína com elevado grau de pureza (BORNHORST; FALKE, 2000). No final do processo a resina utilizada pode ser armazenada para reutilização, o que torna a IMAC viável para purificação em larga escala de proteínas com interesse para a indústria e em diversas áreas de pesquisa (GABERC-POREKAR; MENART, 2001).

1.1.2 DNA recombinante

A produção de diferentes tipos de proteínas através do uso de DNA recombinante (rDNA) tem sido largamente empregada devido aos avanços recentes nas áreas de genômica, proteômica e bioinformática, o que tornou essa a abordagem a mais empregada para a obtenção de FPs (YOUNG; BRITTON; ROBINSON, 2012). A tecnologia de rDNA consiste em modificar o material genético de interesse (inserto) extraído de um organismo e recombiná-lo com uma molécula de DNA que pode ser introduzida e replicada em uma célula hospedeira (vetor) (LODISH et al., 2003; KHAN et al., 2016). Os fragmentos de DNA utilizados para essa finalidade são obtidos empregando endonucleases de restrição, que são enzimas que promovem a clivagem do DNA em sítios específicos de reconhecimento (PRAY, 2008). Dessa maneira, o rDNA é obtido a partir da combinação desses fragmentos de DNA provenientes de fontes distintas utilizando a enzima DNA ligase (PRAY, 2008).

A nova molécula de DNA sintética obtida por rDNA se assemelha aos plasmídeos, que são moléculas de fita dupla de DNA circular encontradas em microrganismos. Os plasmídeos não carregam informações cromossômicas, mas contêm os genes que conferem resistência à antibióticos, por isso é possível preparar moléculas de rDNA contendo os genes de codificação das FPs para a incorporação (transformação) e replicação em células bacterianas como as de *E. coli* (LODISH et al., 2003).

A produção de proteínas (expressão gênica) se inicia no núcleo celular, onde ocorre a transcrição do DNA em RNA mensageiro (mRNA), que é posteriormente utilizado para a tradução da sequência de nucleotídeos na sequência de aminoácidos da FP no citoplasma. A expressão de FPs por células de *E. coli* pode ser induzida pela adição de uma substância (indutor) que aciona a transcrição do gene da FP em proteína, a qual pode ser separada do meio celular e purificada por técnicas cromatográficas (CUATRECASAS, 1970). Devido à popularização do uso da tecnologia de rDNA, as proteínas obtidas por essa abordagem são comumente chamadas de proteínas recombinantes.

Entre a diversidade de vetores disponíveis, o pQE-9 tem sido bastante utilizado porque é adequado para a obtenção de elevados rendimentos de expressão de proteínas recombinantes contendo 6xHis-Tag, podendo ser mantido em linhagens de *E. coli* contendo o plasmídeo repressor pREP4, como a linhagem SG13009 (CROWE et al., 1994; QIAGEN, 2003). O pQE-9 (Figura 5) é um vetor de expressão com 3.439 bp derivado do plasmídeo pDS contendo o promotor T5 e resistência à ampicilina, onde o múltiplo sítio de clonagem (MSC) se encontra *in frame* com o 6xHis-Tag na região N-terminal (BUJARD et al., 1987; QIAGEN, 2003).

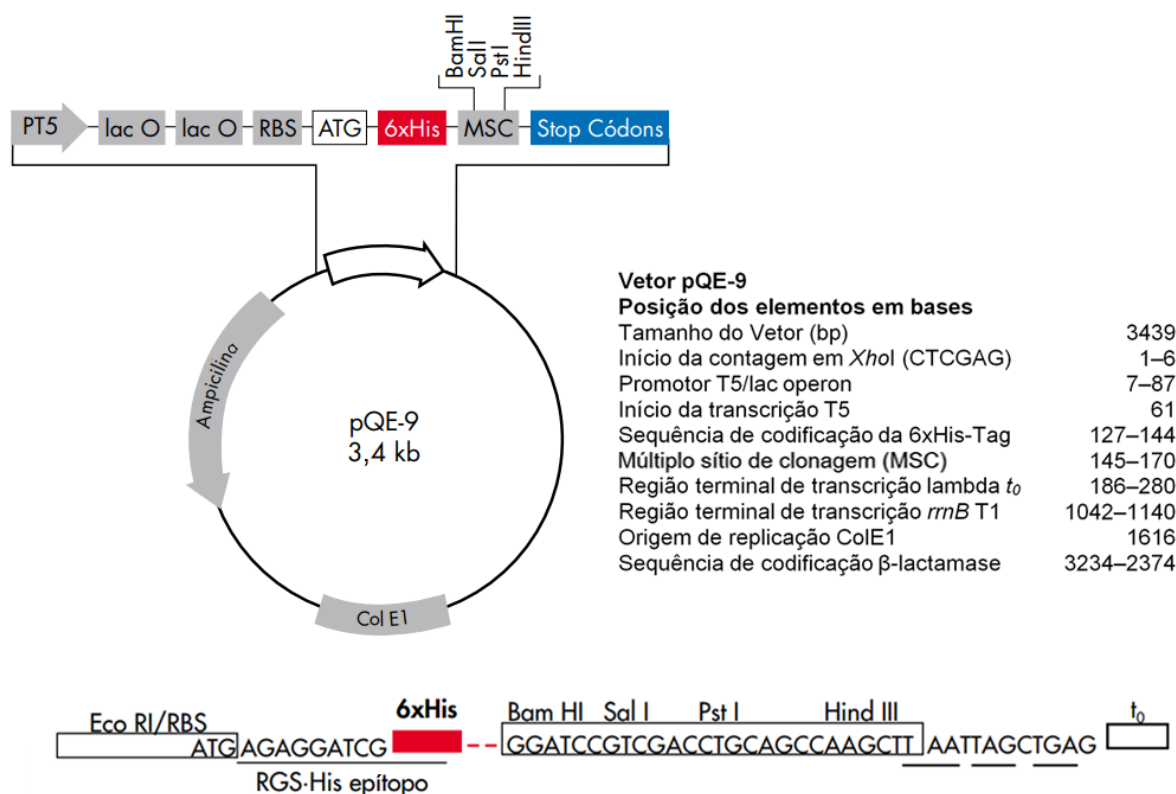


Figura 5 - Esquema representativo do vetor de expressão pQE-9 com promotor T5 e resistência à ampicilina. Adaptado do site do fornecedor.

1.2 Lantanídeos

O grupo de elementos denominado lantanídeos (Ln) é constituído pelos 15 metais do bloco f da Tabela Periódica, que vão do Lantânio ($Z=57$) ao Lutécio ($Z=71$). Os Ln apresentam a configuração eletrônica genérica $[Xe]4f^n5d^16s^2$, com n variando de 0 (La) a 14 (Lu), sendo seus íons trivalentes (Ln^{3+}) o estado de oxidação mais estável em soluções aquosas, os quais apresentam a configuração $[Xe]4f^n$ (BÜNZLI, 2006). Devido às suas características particulares, Ln^{3+} têm sido amplamente utilizados em distintas áreas de interesse. Diagnóstico e terapia de câncer (TEO; TERMINI; GRAY, 2016), geração e amplificação de luz em lasers (WEBER, 1980), guias de onda e vidros para fibras ópticas (YANG et al., 2017; GALLEANI et al., 2018), biosensores (GONZÁLEZ-VERA et al., 2017) e bioimagem (DONG et al., 2015) são apenas algumas das aplicações possíveis.

A configuração eletrônica dos íons Ln^{3+} é responsável por suas propriedades ópticas únicas, pois os orbitais $5s^2$ e $5p^6$ preenchidos blindam os elétrons $4f$ de interações com a vizinhança (BÜNZLI, 2006). Dessa forma, transições intraconfiguracionais $4f-4f$ ocorrem

devido à camada 4f semipreenchida, resultando em bandas finas de absorção e emissão, altos rendimentos quânticos de luminescência, elevados tempos de vida de emissão e luminescência entre as regiões do UV e NIR do espectro eletromagnético (CARLOS et al., 2009). Transições intraconfiguracionais são proibidas segundo as regras de seleção de Laporte porque não ocorre a mudança da paridade dos elétrons (BLASSE; BRIL, 1970), mas as transições 4f-4f são parcialmente permitidas para os Ln^{3+} contidos em uma matriz porque o efeito do campo cristalino induz a mistura dos níveis 4f com níveis de maior energia (BLASSE; BRIL, 1970; BINNEMANS, 2015). Como consequência, essas transições são observadas nos espectros de absorção e excitação como bandas com baixos coeficientes de absortividade molar ($1 < \epsilon < 10 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), tornando ineficiente a excitação direta dos Ln^{3+} (CARLOS et al., 2009; MOORE et al., 2009).

O processo de sensibilização de luminescência, conhecido também como efeito antena, tem sido utilizado para superar essa limitação, de maneira que a excitação é feita na vizinhança e em seguida a energia é transferida para o Ln^{3+} (Figura 6) (BÜNZLI, 2016). A sensibilização pode ser obtida pela reação de Ln^{3+} com ligantes cromóforos, onde um ligante com elevada absortividade molar absorve a energia e posteriormente a transfere para a emissão do centro metálico, ou então pela dopagem de matrizes cristalinas com baixo grau de simetria e baixa energia de fônon, aumentando a probabilidade de ocorrência das transições f-f (AGBO; ABERGEL, 2016).

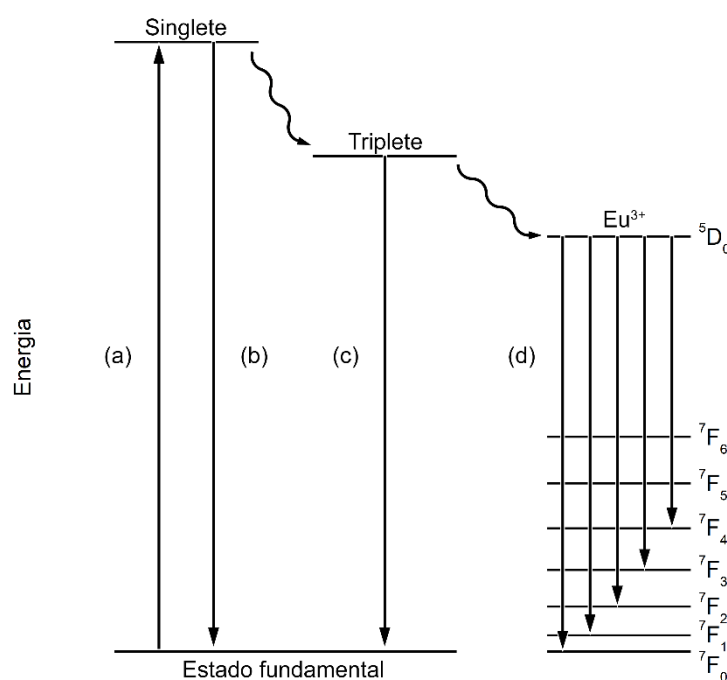


Figura 6 - Esquema representativo da sensibilização de luminescência do íon lantanídeo Eu^{3+} . Inicialmente, um ligante pode ser excitado por luz UV (a). O nível singlete no estado excitado pode sofrer fluorescência (b), mas se ocorrer um cruzamento inter-sistemas, o estado triplete pode fosforescer (c). A energia do estado triplete também pode ser transferida ao Eu^{3+} , ocorrendo a emissão (d).

1.2.1 Nanopartículas de Eu^{3+}

O íon európio trivalente (Eu^{3+}) se destaca entre os demais Ln^{3+} por suas características particulares, como emissão na região do visível adequada para o uso em sistemas biológicos, maior tempo de vida de emissão e menor sensibilidade à extinção de emissão por transferência vibracional à vizinhança (HEFFERN; MATOSZIUK; MEADE, 2014). Devido ao seu estado não degenerado, as intensidades relativas de suas transições $^5\text{D}_0$ nos espectros de absorção e de emissão podem ser utilizadas para determinar o ambiente local do Eu^{3+} , o que o torna uma excelente sonda espectroscópica (BINNEMANS, 2015). Sob excitação de luz UV, o Eu^{3+} apresenta intensa emissão vermelha, que pode ser observada tanto em complexos quanto em nanopartículas, tornando-o o íon lantanídeo mais utilizado na síntese de nanopartículas luminescentes para aplicações biomédicas (BINNEMANS, 2015; SYAMCHAND; SONY, 2015).

Uma das nanopartículas contendo Eu^{3+} (Eu-NPs) mais conhecidas é o ortovanadato de ítrio dopado com Eu^{3+} ($\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$), que foi inicialmente utilizado como componente para emissão vermelha em televisões coloridas de tubo de raios catódicos (LEVINE; PALILLA,

1964). A emissão do Eu^{3+} nesse composto pode ocorrer tanto por fotoluminescência quanto por catodoluminescência (UITERT et al., 1962; LEVINE; PALILLA, 1964). A emissão por fotoluminescência é viabilizada porque a matriz de YVO_4 apresenta um estado de transferência de carga em 31.200 cm^{-1} (BLASSE; BRIL, 1970), onde ocorre a transferência de energia do grupo ortovanadato no estado excitado para o Eu^{3+} a partir da absorção de luz UV, na mesma região onde há a absorção e emissão de grupos cromóforos como os aminoácidos aromáticos (TEALE; WEBER, 1957; HUIGNARD et al., 2003). A vantagem de se utilizar nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ está relacionada com os métodos simples de obtenção, que podem ser realizados por via húmida, como coprecipitação ou síntese hidrotermal (RIWOTZKI; HAASE, 1998; GIAUME et al., 2005).

1.3 Transferência de energia

A escolha de compostos emissores de luz que apresentem propriedades ópticas adequadas e boa biocompatibilidade é de extrema importância para o estudo de organismos vivos. Uma das técnicas mais utilizadas para essa finalidade são os ensaios envolvendo transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET, do inglês *fluorescence resonance energy transfer*), que permitem um maior grau de sensibilidade, reprodutibilidade, resolução e especificidade para o estudo de sistemas biológicos (ROWLAND et al., 2015). O processo denominado FRET é um fenômeno físico que ocorre entre moléculas fluorescentes que estejam suficientemente próximas, de modo que a energia é transferida de uma molécula no estado excitado (doador) para outra (receptor) de forma não radiativa (SEKAR; PERIASAMY, 2003).

Alguns requisitos precisam ser atendidos para que haja a ocorrência de FRET entre duas moléculas. Entre eles, o principal fator que demonstra a possibilidade de se ocorrer FRET é a sobreposição do espectro de emissão do doador com o espectro de excitação do receptor (CLEGG, 1995). Por se tratar de um fenômeno físico, é necessário que as moléculas estejam suficientemente próximas para que se ocorra FRET, com uma distância menor que 10 nm (BROUSSARD et al., 2013). A orientação correta entre as moléculas também é um fator determinante para a ocorrência de FRET, pois a transferência de energia depende da orientação adequada dos momentos de dipolo do doador e receptor (KHRENOVA et al., 2015). As condições necessárias para a ocorrência de FRET encontram-se ilustradas na Figura 7.

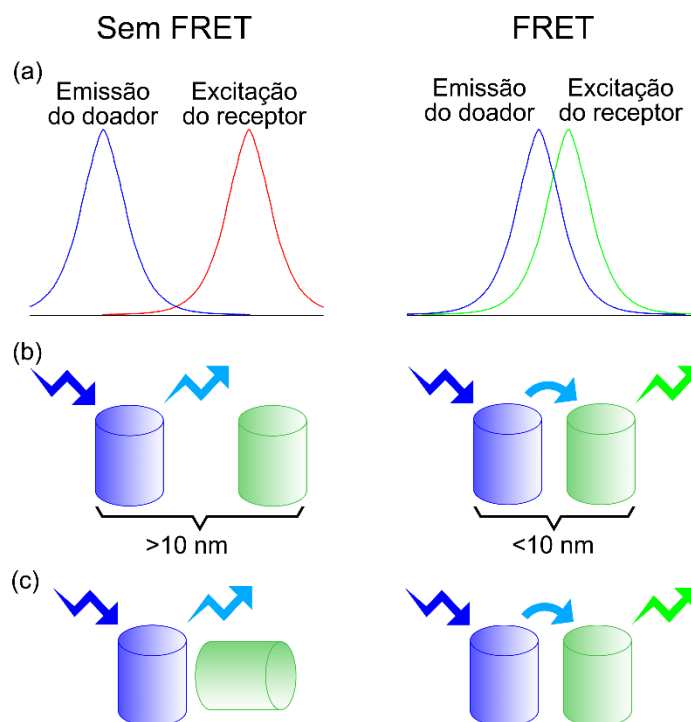


Figura 7 - Esquema representativo demonstrando as condições necessárias para a ocorrência de FRET entre duas moléculas fluorescentes. A energia de emissão do doador deve ser absorvida pelo receptor para que se ocorra FRET (a). Para uma distância menor que 10 nm, a energia pode ser transferida do doador para o receptor (b). FRET ocorrerá apenas se houver uma orientação adequada entre doador e receptor (c).

As FPs têm sido amplamente empregadas em estudos baseados em FRET porque, além de apresentarem elevada biocompatibilidade (ROWLAND et al., 2015), a diversidade de FPs atualmente disponíveis permite a escolha de pares adequados para a sobreposição espectral entre doador e receptor (KREMERS et al., 2011). Além disso, é possível utilizar a tecnologia de rDNA para se obter pares de proteínas covalentemente ligados, apresentando assim a orientação e distância adequadas para a ocorrência de transferência de energia (SHANER; STEINBACH; TSIEN, 2005). Apesar de apresentarem uma menor taxa de fotodegradação que moléculas menores, a fotoestabilidade ainda é a maior limitação encontrada para o uso de FPs em aplicações envolvendo FRET, por isso é necessário escolher cuidadosamente as proteínas que serão utilizadas para essa finalidade (SHANER; STEINBACH; TSIEN, 2005; SHANER et al., 2008).

O íon Eu^{3+} também se mostra como uma excelente escolha para aplicações envolvendo FRET, pois seu elevado tempo de vida na ordem de milissegundos e as bandas finas de emissão na região vermelha do espectro eletromagnético o tornam um bom doador para FRET (GEISSLER et al., 2014). Os problemas relacionados à citotoxicidade das Eu-NPs podem ser

contornados realizando o recobrimento das nanopartículas com sílica, que apresenta baixa citotoxicidade e boa biocompatibilidade (YANG et al., 2011).

A combinação de FPs e compostos de Eu^{3+} também é uma alternativa interessante para o uso em FRET, pois pares FP- Eu^{3+} podem ser utilizados para excitação pulsada com detecção em atraso, eliminando sinais de fluorescência não específicos que aparecem antes da emissão do lantanídeo, facilitando a identificação da emissão do Eu^{3+} em meio biológico (RAJENDRAN; YAPICI; MILLER, 2014). Curiosamente, alguns estudos envolvendo Eu^{3+} têm mostrado resultados diferentes do esperado para aplicações envolvendo FRET, como transferência de energia onde não há sobreposição suficiente entre os espectros do doador e receptor (VUOJOLA; LAMMINMÄKI; SOUKKA, 2009), além de emissão do receptor em comprimentos de onda menores que a emissão do doador (LAITALA; HEMMILÄ, 2005). Nessa perspectiva, proteínas e peptídeos podem ser utilizadas para a sensibilização da emissão de Eu-NPs, onde o íon Eu^{3+} age como receptor na presença de aminoácidos aromáticos (LIMA et al., 2016).

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral o preparo de bioconjugados contendo proteínas fluorescentes e nanopartículas dopadas com Eu^{3+} para o estudo de processos de transferência de energia que viabilizem o aumento da emissão do íon Eu^{3+} .

2.1 Objetivos específicos

Para que o objetivo geral desse trabalho pudesse ser alcançado, os seguintes objetivos específicos foram implementados:

- Síntese e caracterização de nanopartículas dopadas com Eu^{3+} ;
- Construção de plasmídeos;
- Expressão e purificação de diferentes proteínas fluorescentes;
- Bioconjugação de proteínas fluorescentes com nanopartículas contendo Eu^{3+} ;
- Caracterização estrutural e óptica dos materiais obtidos;
- Estudos de transferência de energia.

3 MATERIAIS

Os reagentes empregados na síntese e funcionalização das nanopartículas apresentam grau analítico e foram fornecidos pela Sigma-Aldrich. Os reagentes empregados na construção dos plasmídeos e na expressão e purificação das proteínas fluorescentes apresentam grau analítico e foram fornecidos pela Merck, Gold Biotechnology e Thermo Fisher Scientific. As endonucleases de restrição *Bam*HI e *Hind*III de alta fidelidade foram fornecidas pela New England Biolabs (NEB) e os oligonucleotídeos *primers* foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies (IDT). As linhagens de *E. coli* NEB5 α , SG13009 e Tuner (DE3) foram fornecidas pela NEB, Qiagen e Novagen, respectivamente. Os genes das proteínas Azurite e mTangerine foram adquiridos da empresa GenScript (Piscataway, NJ-EUA), enquanto os plasmídeos contendo as proteínas EGFP e mCherry foram gentilmente cedidos pelo Olsen Lab (Chemical Engineering Department, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA-EUA).

3.1 Linhagens

Diferentes linhagens de *E. coli* foram utilizadas neste trabalho para a amplificação dos plasmídeos construídos e para a expressão das proteínas recombinantes Azurite, EGFP, mCherry e mTangerine. As seguintes linhagens foram utilizadas:

NEB5 α : células competentes derivadas da linhagem DH5 α para o preparo de plasmídeos (ANTON; RALEIGH, 2016).

Genótipo: *fhuA2 Δ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ 80 Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*

SG13009: células competentes para alto nível de expressão de proteínas recombinantes (GOTTESMAN; HALPERN; TRISLER, 1981).

Genótipo: *F⁻ his pyrD Δ lon-100 rpsL*

Tuner (DE3): células competentes derivadas da linhagem BL21 para níveis ajustáveis de expressão de proteínas recombinantes.

Genótipo: *F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm lacY1(DE3)*

3.2 Meio de cultura

O meio de cultura LB (do inglês *Lysogenic Broth*) (BERTANI, 1951) foi empregado na amplificação dos plasmídeos construídos e na expressão das proteínas recombinantes utilizando as diferentes linhagens de *E. coli*.

3.2.1 LB

Meio líquido composto por triptona 1,0% (m/v), extrato de levedura 0,5% (m/v) e NaCl 1,0% (m/v) em água ultrapura. A solução resultante foi esterilizada em autoclave e armazenada a 4 °C, sendo suplementada com o antibiótico ampicilina (0,2 mg L⁻¹) antes do uso.

3.2.2 LB ágar

Meio sólido composto por triptona 1,0% (m/v), extrato de levedura 0,5% (m/v), NaCl 1,0% (m/v) e agarose 1,5% (m/v) em água ultrapura. A solução obtida foi esterilizada em autoclave e resfriada até 60 °C para a adição do antibiótico ampicilina (0,2 mg L⁻¹) e então transferida para placas de Petri de poliestireno. Após total resfriamento, as placas de Petri foram armazenadas a 4 °C para posterior uso.

3.3 Tampões e soluções

3.3.1 Tampão Tris

O tampão Tris foi utilizado para diálise e armazenamento das soluções de proteínas. O tampão foi obtido pelo preparo de uma solução estoque de Tris (200 mmol L⁻¹) e ajustando o pH em 8,0 pela adição de NaOH. Para uso, a solução estoque foi diluída para 20 mmol L⁻¹.

3.3.2 Tampão para lise celular

Essa solução tampão foi utilizada para a ruptura da membrana plasmática das células de *E. coli* durante a etapa de purificação das proteínas. O preparo desse tampão foi realizado pela adição de NaH₂PO₄ (50 mmol L⁻¹), NaCl (300 mmol L⁻¹), imidazol (10 mmol L⁻¹) e BME (10 mmol L⁻¹) em água, com pH=8,0 ajustado pela adição de NaOH.

3.3.3 Tampão TAE

O tampão TAE foi empregado no preparo do gel de agarose utilizado na separação dos genes das proteínas após digestão com as endonucleases de restrição. Esse tampão foi preparado pela adição de Tris (40 mmol L^{-1}), ácido acético glacial (20 mmol L^{-1}) e EDTA ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) em água, com $\text{pH}=7,6$.

3.3.4 Tampão de amostra (Laemmli 6x)

O tampão de amostra foi utilizado para proporcionar as condições necessárias para a desnaturação das proteínas durante a análise por SDS-PAGE, bem como corante para visualizar o progresso da eletroforese. O preparo do tampão foi realizado pela adição de glicerol (50%), BME (9%), SDS (9%), Tris-HCl (375 mmol L^{-1}) e azul de bromofenol (0,03%) em água, com $\text{pH}=6,8$.

3.3.5 Soluções para cromatografia de afinidade

Essas soluções foram empregadas na lavagem e eluição das proteínas durante a purificação por IMAC. Ambas as soluções foram preparadas em água e com pH ajustado em 8,0 pela adição de NaOH, diferenciando-se pelo caráter redutor da solução de eluição devido à maior concentração de imidazol.

Solução de lavagem: NaH_2PO_4 (50 mmol L^{-1}), NaCl (300 mmol L^{-1}), BME (20 mmol L^{-1}) e imidazol (10 mmol L^{-1});

Solução de eluição: NaH_2PO_4 (50 mmol L^{-1}), NaCl (300 mmol L^{-1}), BME (20 mmol L^{-1}) e imidazol (300 mmol L^{-1}).

3.4 Oligonucleotídeos *primers*

Os oligonucleotídeos *primers* foram desenvolvidos para a construção dos plasmídeos contendo a sequência das proteínas Azurite e mTangerine no vetor de expressão pQE-9, bem como para a mutagênese sítio dirigida realizada para a inserção de resíduos de cisteína na sequência das mesmas proteínas. A Tabela 1 mostra todos os *primers* desenvolvidos e utilizados neste trabalho.

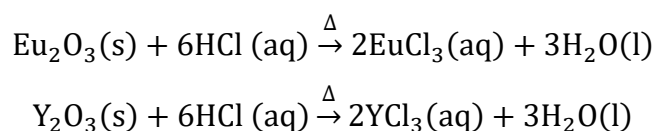
Tabela 1 - Oligonucleotídeos *primers* utilizados.

Primer	Sequência de Nucleotídeos
Azurite-Fwd	5'-GATT <u>Aggatcc</u> ATGTCTAAAGGTGAAGAATT-3' (sítio de restrição para a enzima <i>Bam</i> HI sublinhado)
Azurite-Rev	5'-TAGAT <u>aagctt</u> TTAACTAGTTTTGTACAATTCAT-3' (sítio de restrição para a enzima <i>Hind</i> III sublinhado)
mTangerine-Fwd	5'-GATT <u>Aggatcc</u> GCCTCCTCCGAGGACGTCAT-3' (sítio de restrição para a enzima <i>Bam</i> HI sublinhado)
mTangerine-Rev	5'-TAGAT <u>aagctt</u> TTAACTAGTTTTGTACAATTCAT-3' (sítio de restrição para a enzima <i>Hind</i> III sublinhado)
AzuriteS208C-Fwd	5'-TTTCGTTTGGATCTTTGCATAAGGCTGATTGGGTGG-3'
AzuriteS208C-Rev	5'-CCACCCAATCAGCCTTATGCAAAGATCCAAACGAAA-3'
mTangerineS131C-Fwd	5'-GGGCCGTCGCAGGGGAAGTTGGTG-3'
mTangerineS131C-Rev	5'-CACCAACTTCCCCTGCGACGGCCC-3'

4 METODOLOGIA

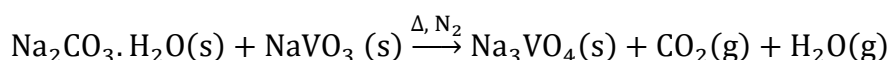
4.1 Síntese das nanopartículas de Eu^{3+}

As Eu-NPs utilizadas neste trabalho foram obtidas pela dopagem do ortovanadato de ítrio com európio ($\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$) utilizando o método de coprecipitação. Primeiramente, soluções estoques dos cloretos de ítrio e európio foram obtidas pela dissolução de seus respectivos óxidos (Y_2O_3 , 14,2 mmol, 3,2 g; Eu_2O_3 , 14,2 mmol, 5,0 g) em ácido clorídrico concentrado (HCl , 85,2 mmol, 7,12 mL) sob agitação e aquecimento constantes até total dissolução, conforme as reações representadas a seguir.



As soluções permaneceram em aquecimento para a remoção do excesso de HCl com adição contínua de água deionizada ultrapura até atingirem $\text{pH} \sim 5$. A concentração das soluções aquosas de YCl_3 e EuCl_3 obtidas foi determinada por titulação com EDTA, sendo diluídas para uma concentração final de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. As soluções foram combinadas em uma razão molar de $\text{Y}^{3+}:\text{Eu}^{3+}$ igual a 0,9:0,1 (solução $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de $(\text{Y}_{0,9}\text{Eu}_{0,1})\text{Cl}_3$) com a finalidade de se obter uma dopagem de 10 mol% de Eu^{3+} nas nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$.

Em seguida, a síntese das Eu-NPs foi realizada em duas etapas, conforme previamente reportado na literatura (BARKER; HOOPER, 1973; GIAUME et al., 2005). Na primeira etapa, o ortovanadato de sódio (Na_3VO_4) foi preparado pela reação no estado sólido do carbonato de sódio monohidratado ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 24,2 mmol, 3,0 g) com o metavanadato de sódio (NaVO_3 , 24,6 mmol, 3,0 g) a 600°C em atmosfera de nitrogênio por 24 h, segundo a reação abaixo representada. O NaVO_3 utilizado foi previamente aquecido a 450°C para a obtenção da fase cristalina $\alpha\text{-NaVO}_3$.



Na segunda etapa, uma solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de citrato de sódio (0,75 mmol, 7,5 mL) foi adicionada sob agitação à solução de $(\text{Y}_{0,9}\text{Eu}_{0,1})\text{Cl}_3$ (1 mmol, 10 mL) previamente preparada. Nesse ponto, houve a formação de um precipitado branco (citrato de ítrio e európio), o qual foi

completamente dissolvido após a adição de uma solução aquosa do Na_3VO_4 (0,75 mmol, 7,5 mL) preparado na primeira etapa. A solução final obtida foi mantida sob agitação e aquecimento à 60 °C por 45 min para a formação das nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ estabilizadas por íons citrato devido à decomposição térmica do complexo polimérico de ítrio/citrato/ortovanadato inicialmente formado. Além de estabilizar as nanopartículas em suspensão evitando sua aglomeração, o citrato atua como sítio para posterior funcionalização das nanopartículas. Após resfriamento até temperatura ambiente, as nanopartículas foram dialisadas em água deionizada ultrapura por 72 h e armazenadas a 4 °C.

4.2 Funcionalização das nanopartículas

O grupo maleimida foi adicionado às nanopartículas pela reação do citrato com a 2-maleimidoetilamina através do acoplamento carbodiimida EDC/Sulfo-NHS. Esse grupo foi escolhido para a funcionalização das nanopartículas por reagir especificamente com o grupamento tiol, então a bioconjugação das Eu-NPs com as FPs pode ser realizada pela reação tiol-eno entre a dupla ligação do grupo maleimida com o tiol presente na cadeia lateral do resíduo de cisteína inserido na sequência de aminoácidos das proteínas (Seção 4.4).

A funcionalização foi realizada adicionando hidrocloreto de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC, 5 mmol) à 20 mL de suspensão coloidal de Eu-NPs (15 mmol) e mantida sob agitação por 2 horas. BME (24 µL) foi adicionado à solução para desativar o excesso de EDC e em seguida foram adicionados 10,0 mg de trifluoroacetato de 2-maleimidoetilamina, mantendo a agitação por 4 horas. No final, a solução resultante foi dialisada em água deionizada ultrapura por 30 horas e armazenada a 4 °C. Os grupos maleimida foram quantificados por um kit de quantificação por fluorescência de grupos maleimida (Amplite™ Fluorimetric Maleimide Quantitation Kit *Green Fluorescence*, AAT Bioquest).

4.3 Construção dos plasmídeos

A construção dos plasmídeos foi realizada pela inserção dos genes de codificação das proteínas Azurite e mTangerine (insertos) no vetor de expressão pQE-9 (N-Terminus pQE Vector Set, Qiagen). Nessa abordagem, a sequência de DNA correspondente a cada uma das proteínas foi amplificada por PCR (AUSUBEL et al., 1987) utilizando os *primers* previamente desenvolvidos (Tabela 1), seguido pela digestão com as endonucleases de restrição *Bam*HI e

*Hind*III de alta fidelidade e pela posterior reação de ligação com o vetor utilizando a enzima DNA ligase (NEB).

Os novos plasmídeos pQE-9/Azurite e pQE-9/mTangerine foram obtidos após a ligação dos insertos com o vetor em uma razão molar de 3:1, respectivamente. Os plasmídeos recombinantes foram isolados de células *E. coli* NEB5 α a partir do inóculo crescido em meio de cultura LB suplementado com ampicilina. Em seguida, o DNA plasmidial foi extraído e purificado usando um Miniprep Kit (QIAprep Spin, Qiagen) para a verificação da construção correta dos mesmos por sequenciamento de DNA pelo método de Sanger. Os plasmídeos pQE-9/EGFP e pQE-9/mCherry foram utilizados como recebidos do Olsen Lab.

4.3.1 Reação em cadeia da polimerase

Para a amplificação das sequências de DNA das proteínas Azurite e mTangerine, foi preparada uma solução contendo 10 μ L de uma solução do DNA molde das proteínas (0,1 ng μ L⁻¹), 1,25 μ L do *primer* Fwd (10 μ mol L⁻¹), 1,25 μ L do *primer* Rev (10 μ mol L⁻¹) e 12,5 μ L do Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (NEB). A reação de PCR foi realizada em um termociclador seguindo o programa da Tabela 2.

Tabela 2 - Programa de temperatura utilizado na reação de PCR.

Etapas	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	98 °C	30 segundos
Anelamento	98 °C	10 segundos
(35 ciclos)	X °C	30 segundos
	72 °C	30 segundos
Extensão final	72 °C	5 minutos
Espera	4 °C	-

X refere-se à temperatura de anelamento calculada para cada um dos *primers* utilizados.

Os fragmentos amplificados por PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Seção 5.9) e purificados utilizando o kit E.Z.N.A.[®] Cycle Pure Kit (Omega Bio-tek).

4.4 Mutagênese sítio dirigida

A mutagênese sítio dirigida (MSD) foi utilizada para inserir resíduos de cisteína suscetíveis à reação tiol-eno nas proteínas utilizadas. Resíduos de cisteína (C) e serina (S) apresentam similaridade estrutural, então resíduos de serina presentes nos *loops* fora do barril β da estrutura das proteínas foram escolhidos como sítios de mutação. Para as proteínas Azurite

e mTangerine foram realizadas as mutações S208C e S131C, respectivamente. O código utilizado representa a posição do resíduo original de serina na sequência da proteína que foi substituído por uma cisteína. Não foi realizada nenhuma mutação na proteína EGFP devido à presença de um resíduo de cisteína reativo entre a região N-terminal e o 6xHis-Tag e a proteína mCherry utilizada já foi recebida contendo a mutação S131C. A MSD foi realizada utilizando o QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) com os *primers* previamente desenvolvidos (Tabela 1). Após a MSD, o DNA plasmidial foi purificado usando um Miniprep Kit e sequenciado para verificar a presença da cisteína. No decorrer deste trabalho foram utilizadas apenas as proteínas contendo as mutações supracitadas.

4.5 Expressão das proteínas

Após a confirmação da sequência, os plasmídeos foram transformados em células de *E. coli* Tuner (DE3) para a proteína EGFP e SG13009 para as demais proteínas, utilizadas posteriormente para o cultivo em placas contendo o meio LB ágar suplementado com ampicilina. Colônias foram selecionadas para o preparo de culturas *overnight* (5 mL) e então crescidas em meio LB com antibiótico a 37 °C em um agitador rotatório. O meio de cultura inicial foi então utilizado para a inoculação de 1 L de meio LB com ampicilina monitorando a DO₆₀₀ a cada 30 minutos. Após atingir DO₆₀₀≈1,00, a expressão das proteínas foi induzida pela adição de IPTG (1,0 mmol L⁻¹) e as células foram coletadas por centrifugação (10.000 g, 20 minutos a 4 °C) após 16 horas de crescimento a 30 °C (com exceção da EGFP, onde as células foram mantidas a 25 °C). Os precipitados obtidos foram armazenados a -80 °C.

4.6 Purificação das proteínas

Após atingir a temperatura ambiente, os precipitados previamente obtidos foram ressuspensos em tampão para lise celular e incubados com lisozima (1 mg mL⁻¹) a 4 °C por 30 minutos. No final, a suspensão obtida foi submetida a ultrassom e clarificada por centrifugação durante 1 hora a 12.500 RPM (4 °C). Devido à presença do 6xHis-Tag na região N-terminal das proteínas, a técnica de IMAC foi empregada na sua purificação. As soluções de proteínas obtidas foram incubadas com resina de agarose contendo Ni-NTA sob agitação por 12 horas a 4 °C para a imobilização das proteínas e depois transferidas para uma coluna de sílica. As proteínas foram lavadas duas vezes com a solução de lavagem para a remoção de biomoléculas indesejadas e em seguida eluídas utilizando três porções da solução de eluição. No final, cada

uma das proteínas foi transferida para uma membrana de acetato de celulose (MWCO = 3,5 kDa) e dialisadas em tampão Tris por 30 horas sob agitação a 4 °C. A pureza das proteínas Azurite, EGFP, mTangerine e mCherry foi confirmada por SDS-PAGE (Seção 5.10).

4.7 Bioconjugação das proteínas com as nanopartículas

As proteínas obtidas foram bioconjugadas com as nanopartículas de Eu^{3+} usando a reação de acoplamento tiol-eno entre a cisteína das proteínas e o grupo maleimida presente nas Eu-NPs funcionalizadas (HOYLE; BOWMAN, 2010; NORTHROP; FRAYNE; CHOUDHARY, 2015). Soluções de cada uma das proteínas com as concentrações de 3,00, 2,25, 1,50 e 0,75 mg mL⁻¹ foram incubadas com TCEP (10x em relação à concentração de proteína) por 45 minutos para a redução das ligações dissulfeto. As Eu-NPs funcionalizadas (1,5 mmol) foram adicionadas em uma razão volumétrica de 5:1 às proteínas e o meio reacional foi mantido sob agitação a 4 °C por 20 horas. As proteínas que não reagiram foram separadas dos bioconjugados por sucessivas filtrações e ressuspensão em água deionizada ultrapura usando filtros de centrífuga (MWCO = 30 kDa, Millipore Ultra-15, Millipore). A quantificação de proteínas nos bioconjugados foi determinada por espectrofotometria utilizando os coeficientes de extinção das proteínas reportados na literatura. Um esquema representativo da funcionalização das nanopartículas e de sua bioconjugação com as proteínas é apresentado na Figura 8.

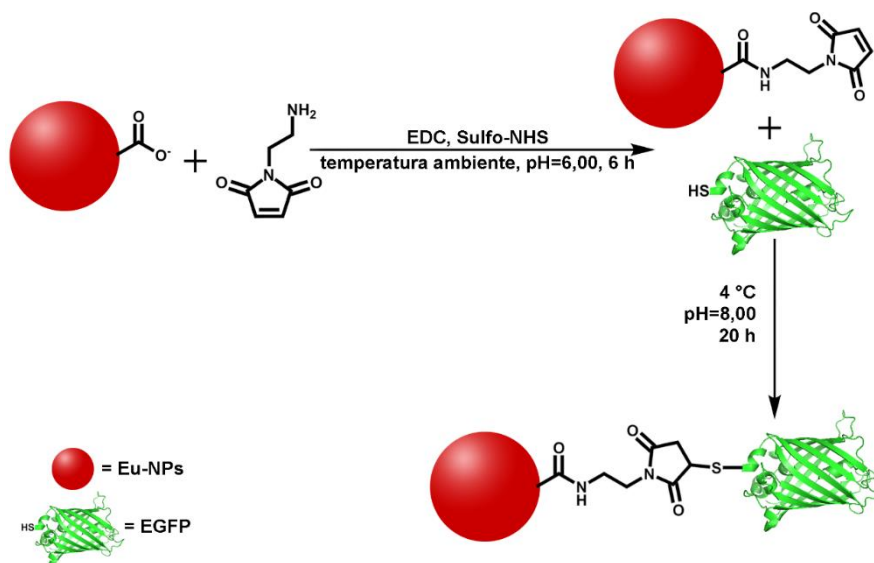


Figura 8 - Funcionalização das Eu-NPs com o grupo maleimida e posterior bioconjugação com as FPs obtidas. O mesmo procedimento foi utilizado para as proteínas Azurite, mTangerine e mCherry.

5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

As técnicas de caracterização empregadas nesse trabalho foram realizadas utilizando os equipamentos das dependências do Instituto de Química (IQ) da Unesp de Araraquara (SP, Brasil), do Laboratório de Espectroscopia de Materiais Funcionais (LEMAF) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC, USP), do *Institute for Soldier Nanotechnologies* e Olsen Lab no MIT (Cambridge, MA, Estados Unidos) e do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) em Campinas (SP, Brasil).

5.1 Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível

Os espectros de absorção na região do UV-Vis foram obtidos em um espectrofotômetro Varian modelo Cary 50 no MIT. As medidas em solução foram realizadas no modo de absorbância na região de 200 a 800 nm com resolução de 0,5 nm utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm em temperatura ambiente.

5.2 Espectroscopia de fluorescência

Os espectros de fluorescência das proteínas foram registrados em um leitor de microplacas multimodal Tecan Infinite modelo M200 no MIT. As medidas foram realizadas com as soluções das proteínas em temperatura ambiente com 1 nm de resolução e 280 nm como comprimento de onda de excitação.

5.3 Espectroscopia de fotoluminescência

As propriedades fotoluminescentes das suspensões coloidais de Eu-NPs e dos bioconjugados em solução foram estudadas no MIT em um espectrofluorímetro Horiba Jobin Yvon Fluorolog modelo FL3-222 equipado com uma fotomultiplicadora Hamamatsu R928 e lâmpadas contínua e pulsada de Xe (450 W) como fonte de excitação. Curvas de decaimento de emissão para o íon Eu^{3+} foram obtidas no mesmo equipamento enquanto as curvas de decaimento de emissão das proteínas foram obtidas no LEMAF em um espectrofluorímetro Horiba Jobin Yvon Fluorolog FL-1050 com excitação em 290 nm. O tempo de vida do estado excitado das nanopartículas, proteínas e bioconjugados foi determinado pelo ajuste das curvas obtidas com funções de decaimento exponencial de primeira ordem ($I = I_0 \exp(-t/\tau)$).

5.4 Espectroscopia de espalhamento Raman

Os espectros Raman foram registrados em um microscópio óptico acoplado a um espectrômetro Raman Horiba Jobin Yvon modelo LabRAM HR 800 no IQ, operando com um laser de He-Ne em 632,8 nm e equipado com uma câmera CCD modelo DU420A-OE-325. Uma lente de aumento de 50x, fenda de 100 μm e uma grade de difração de 1800 linhas mm^{-1} foram utilizadas para a realização das medidas.

5.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN uni (1D) e bidimensionais (2D) dos isótopos de ^{23}Na e ^{51}V foram coletados utilizando a técnica de rotação em torno do ângulo mágico (MAS, do inglês *magic angle spinning*) em um espectrômetro Bruker modelo Avance III 400 WB HD no IQ, operando em 105,84 e 105,18 MHz (9,4 T), respectivamente. As amostras foram analisadas na forma de pó em uma sonda de 4 mm utilizando um rotor de alumina.

Os espectros 1D de MAS-RMN do ^{51}V foram obtidos com um pulso de excitação de 0,8 μs e tempo de relaxação de 0,5 s. Para a identificação do sinal foram coletados dois espectros com rotações de 12 e 14 kHz. Os espectros foram referenciados a partir da referência secundária óxido de vanádio(V), V_2O_5 (-621 ppm).

Os espectros 1D de MAS-RMN do ^{23}Na foram coletados sob com rotação de 14 kHz, utilizando um pulso de excitação de 1,0 μs , e tempo de relaxação de 60 s. Os espectros foram referenciados a partir do cloreto de sódio, NaCl 1,0 mol L^{-1} .

Os espectros 2D de ^{23}Na TQ-MAS (TQ, do inglês *triple quantum*) foram obtidos utilizando a sequência de pulso *z-filter* e aquisição com rotor sincronizado na dimensão direta (MEDEK; HARWOOD; FRYDMAN, 1995; AMOUREUX; FERNANDEZ; STEUERNAGEL, 1996), utilizando os seguintes parâmetros: comprimento dos pulsos 7,1 μs e 2,6 μs para o primeiro e segundo pulsos, aplicados com uma frequência de nutação de 96 kHz para o núcleo de ^{23}Na e 10 μs o terceiro pulso fraco aplicado, com frequência de nutação de 25 kHz para o núcleo de ^{23}Na . A detecção do sinal na dimensão t_1 foi realizada com tempo de amostragem de 0,6 ms.

A simulação dos espectros de 1D do ^{23}Na , assim como a fração de cada sitio de sódio não equivalente foram realizadas utilizando o *software* dmfit (MASSIOT et al., 2002).

5.6 Difractometria de raios X

Os difratogramas de raios X foram coletados em temperatura ambiente em um difratômetro Rigaku modelo RINT 2000 no IQ, utilizando a radiação da borda $K\alpha$ do cobre ($\text{Cu-K}\alpha$, $\lambda=1,54 \text{ \AA}$) sob corrente de 50 mA e tensão de 40 kV. As medidas foram realizadas com as amostras pulverizadas, com resolução de $0,02^\circ$ e varredura de 2θ entre 5° e 90° .

5.7 Microscopia eletrônica de transmissão

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (*High Resolution Transmission Electron Microscopy*, HRTEM), difração de elétrons de área selecionada (*Selected Area Electron Diffraction*, SAED) e espectroscopia por energia dispersiva de raios x (EDS, do inglês *energy dispersive x-ray spectroscopy*) das Eu-NPs foram obtidas em um microscópio eletrônico de transmissão FEI Company modelo Titan Themis Cubed no LNNano, operando a 300 kV com dupla correção de aberração. Para a aquisição das imagens, as nanopartículas foram depositadas sobre grades de cobre (400 Mesh) previamente tratadas com CH_2Cl_2 para a remoção do recobrimento de Formvar.

5.8 Espalhamento dinâmico de luz

O raio hidrodinâmico das nanopartículas foi determinado pela técnica de espalhamento dinâmico de luz em um equipamento Wyatt modelo DynaPro Nanostar no MIT. As medidas foram realizadas a 20°C com um laser de 658 nm operando a 12 mW e o detector posicionado a 90° do feixe incidente. O índice de polidispersividade foi calculado utilizando o *software* DYNAMICS®.

5.9 Eletroforese em gel de agarose

Os genes das proteínas amplificados por PCR e do vetor de expressão pQE-9, antes e após a digestão com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Hind*III, foram separados em gel de agarose 1% com o tampão TAE 1x contendo o corante SYBR® Safe em um sistema de eletroforese horizontal Sub-Cell® GT Cell da Bio-Rad no MIT. Para os genes separados após a digestão, o DNA foi extraído e purificado utilizando um kit de extração de gel (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) para a realização da reação de ligação entre insertos e vetor.

5.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida

O grau de pureza das proteínas expressas foi verificado através de SDS-PAGE. Um volume de 5 μ L das amostras foi diluído em igual volume de água, ao qual foi adicionado 2 μ L de tampão de amostra. As amostras foram fervidas por 5 minutos a 95 °C, centrifugadas e aplicadas no gel. Os géis de 12% de poliacrilamida com 1 mm de espessura foram preparados e submetidos a uma corrente de 400 mA, com voltagem constante de 200 V em um sistema de mini-gel Mini-PROTEAN Tetra Cell da Bio-Rad no MIT. Após sua obtenção, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue e posteriormente digitalizados utilizando o sistema de documentação de géis Gel Doc™ XR+ da Bio-Rad.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos estão baseados na síntese e caracterização estrutural e óptica das nanopartículas de Eu^{3+} , na construção dos plasmídeos, expressão e purificação das proteínas fluorescentes, assim como na obtenção de bioconjugados de proteínas fluorescentes com nanopartículas de Eu^{3+} para estudos de transferência de energia.

6.1 Caracterização das nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$

O metavanadato de sódio pode ser encontrado em duas fases cristalinas distintas. Na fase cristalina α , os átomos de vanádio se encontram coordenados a 4 átomos de oxigênio e as cadeias de VO_3 estão unidas por tetraedros de VO_4 (MARUMO et al., 1974). A fase cristalina β apresenta os átomos de vanádio coordenados a 5 átomos de oxigênio, formando bipirâmides trigonais distorcidas de VO_5 (KATO; TAKAYAMA, 1984). Desse modo, o precursor NaVO_3 utilizado no preparo do Na_3VO_4 empregado na síntese das nanopartículas foi analisado por difratometria de raios X (Figura 9) para verificar qual a fase cristalina presente em sua constituição.

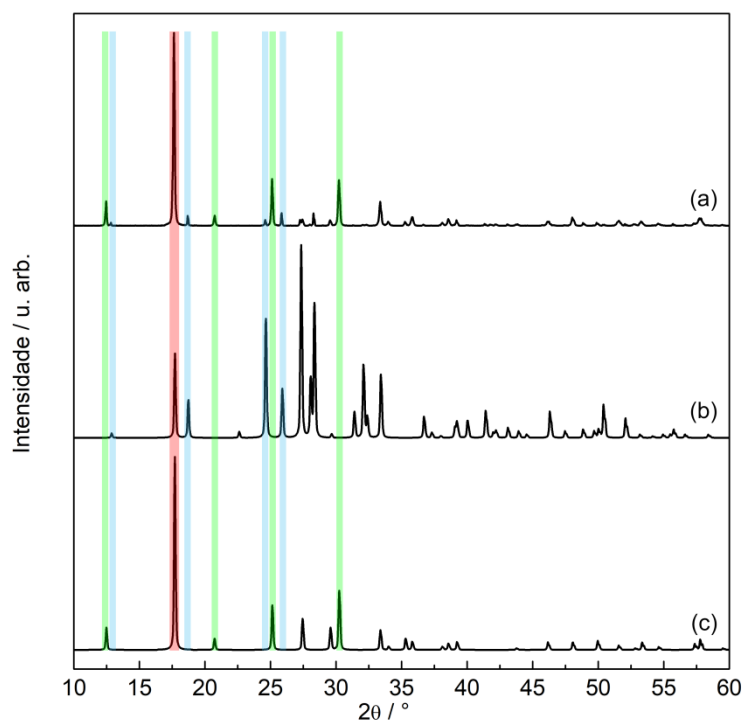


Figura 9 - Difratoograma de raios X do precursor NaVO_3 (a), do $\alpha\text{-NaVO}_3$ - PDF 32-1197 (b) e do $\beta\text{-NaVO}_3$ - PDF 32-1198 (c). As linhas em vermelho, azul e verde destacam o sinal mais intenso observado para o precursor e os principais padrões de difração relativos às fases α e β , respectivamente.

O sinal de maior intensidade observado no DRX do precursor NaVO_3 pode ser atribuído tanto ao plano cristalino (200) do $\alpha\text{-NaVO}_3$ quanto ao plano (110) do $\beta\text{-NaVO}_3$, ambos em 2θ igual a $17,72^\circ$ (MORRIS et al., 1981). O precursor apresenta os planos cristalinos (110), (020), (-121) e (-220) observados em valores de 2θ iguais a $12,88$, $18,74$, $24,64$ e $25,90^\circ$, respectivamente, característicos do $\alpha\text{-NaVO}_3$. No entanto, os sinais observados para os valores de 2θ iguais a $12,48$, $20,74$, $25,14$ e $30,24^\circ$ correspondem aos planos cristalinos (020), (120), (130) e (140), respectivamente, os quais são característicos do $\beta\text{-NaVO}_3$, indicando que o NaVO_3 utilizado apresenta as fases cristalinas α e β em sua composição. A mistura das duas fases também pode ser observada pelo espectro de MAS-RMN do isótopo de ^{51}V do NaVO_3 (Figura 10).

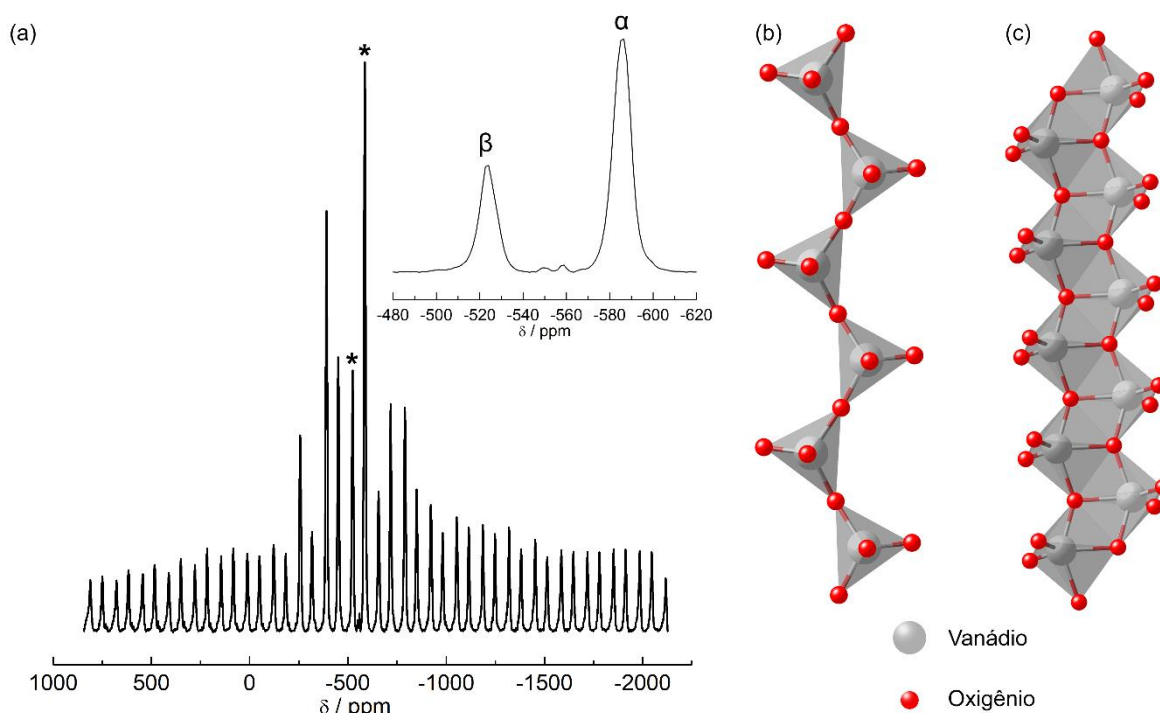


Figura 10 - Espectro de MAS-RMN (14 kHz) do ^{51}V do NaVO_3 (a). Os picos referentes à transição central (+1/2 e -1/2) das duas fases cristalinas $\alpha\text{-NaVO}_3$ e $\beta\text{-NaVO}_3$ estão identificadas com o asterisco. O quadro em destaque mostra a região ampliada dos picos referente às duas fases cristalinas. Representação das cadeias de metavanadato no $\alpha\text{-NaVO}_3$ (b) e $\beta\text{-NaVO}_3$ (c).

Na fase $\alpha\text{-NaVO}_3$ os tetraedros estão interligados por um átomo de oxigênio, enquanto na fase $\beta\text{-NaVO}_3$ as bipirâmides estão interligadas por dois átomos de oxigênio. Essa variação na geometria do poliedro do vanádio nas duas fases cristalinas pode ser diferenciada por RMN devido à diferença do campo magnético local, gerando assim os dois sinais distintos e bem separados no espectro, como pode ser observado em -585 e -523 ppm na Figura 10, referentes aos sítios de vanádio nas fases cristalinas $\alpha\text{-NaVO}_3$ e $\beta\text{-NaVO}_3$, respectivamente (SKIBSTED

et al., 1993). Apesar de não apresentar linhas tão bem separadas quando o espectro de ^{51}V , o espectro de MAS-RMN do isótopo de ^{23}Na também pode ser empregado para verificar a mistura de fases cristalinas no precursor. O experimento 2D de TQ-MAS permite a observação resolvida dos sítios não equivalentes de sódio do precursor NaVO_3 , como mostra a Figura 11.

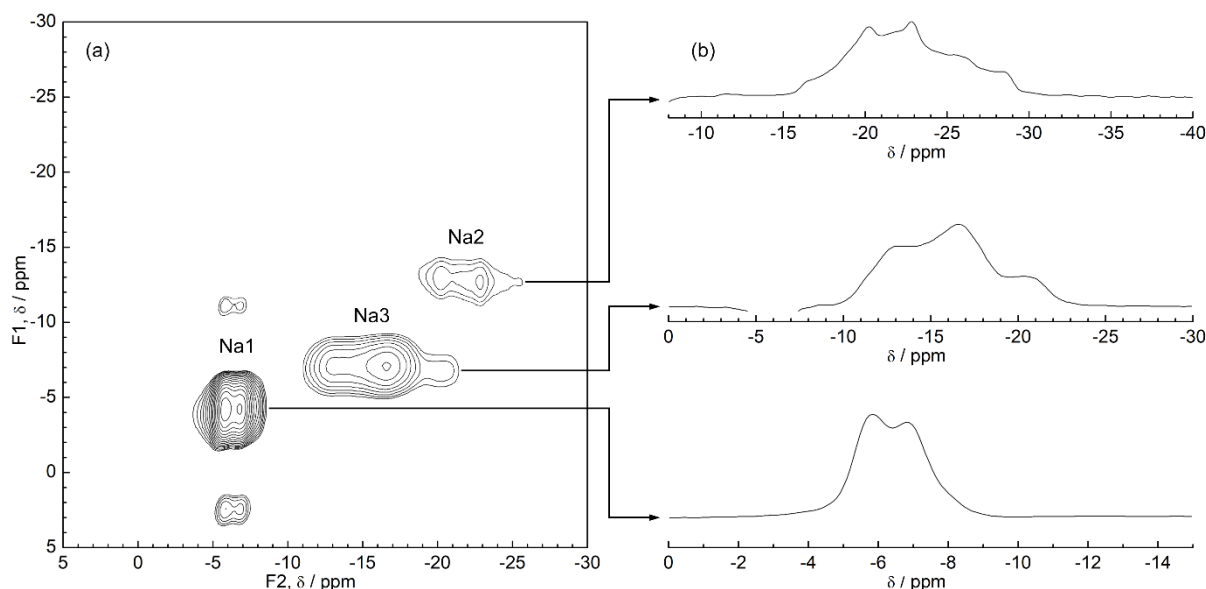


Figura 11 - Espectro 2D de TQ-MAS de RMN de ^{23}Na do precursor NaVO_3 (a) e as projeções extraídas da dimensão F2 para cada sítio de sódio (b).

Os átomos de sódio no $\alpha\text{-NaVO}_3$ se encontram em duas posições não equivalentes (Na1 e Na2) em sua estrutura cristalina (MARUMO et al., 1974), enquanto todos os átomos de sódio no $\beta\text{-NaVO}_3$ (Na3) são equivalentes (KATO; TAKAYAMA, 1984). Desse modo, os três sítios não equivalentes observados no espectro 2D de TQ-MAS correspondem à presença das fases cristalinas α e β no NaVO_3 . Os sinais não identificados no espectro 2D da Figura 11.a correspondem às bandas laterais do sítio Na1. Considerando a existência dos três sítios de sódio não equivalentes no precursor, os espectros 1D de ^{23}Na também foram simulados e comparados com os espectros de MAS-RMN do isótopo de ^{23}Na obtidos para o NaVO_3 utilizado (Figura 12).

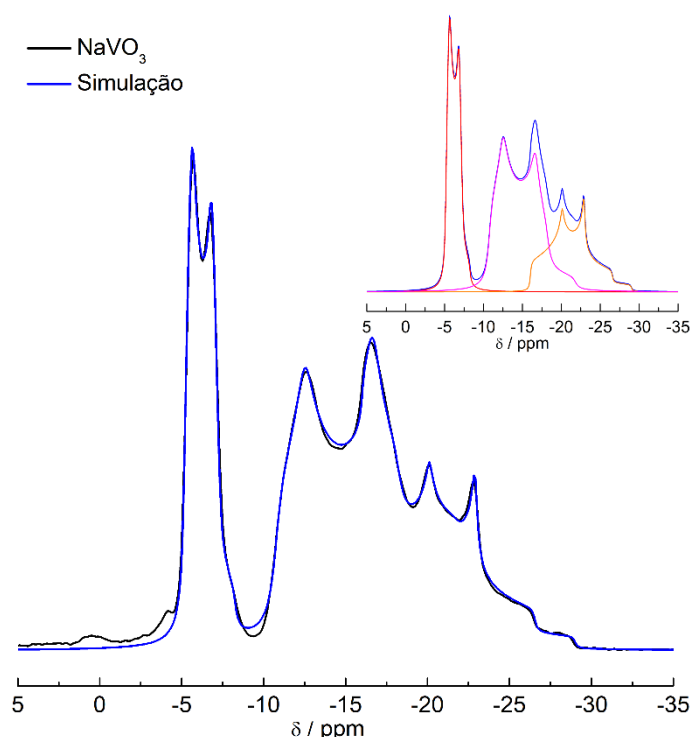


Figura 12 - Comparação entre o espectro de MAS-RMN de ^{23}Na do NaVO_3 e a simulação do espectro experimental. A imagem em destaque mostra a decomposição de cada um dos sítios de sódio não equivalentes.

O padrão de pó observado para o espectro de MAS-RMN de ^{23}Na é consistente com os espectros reportados na literatura (SKIBSTED et al., 1993), mostrando que o precursor NaVO_3 é constituído pelas fases cristalinas $\alpha\text{-NaVO}_3$ e $\beta\text{-NaVO}_3$. A partir dos valores do desvio químico extraídos do centro de massa das dimensões F1 e F2 do espectro 2D de TQ-MAS de ^{23}Na (Figura 11) foi possível simular os valores de desvio químico isotrópico (δ_{iso}), da constante quadrupolar (C_q) e do parâmetro de simetria (η_q) do precursor NaVO_3 . Os mesmos valores também foram simulados e extraídos a partir dos espectros 1D de MAS-RMN de ^{23}Na (Figura 12), conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Desvio químico isotrópico (δ_{iso}) constante quadrupolar (C_q) e parâmetro de simetria (η_q) calculados a partir dos espectros de MAS-RMN e TQ-MAS de ^{23}Na do precursor NaVO_3 .

Experimento	Sítio	δ_{iso}	C_q	η_q
MAS-RMN	Na1	-4,9	768,7	0,23
	Na2	-15,7	1506,8	0,56
	Na3	-9,8	1456,4	0,26
TQ-MAS	Na1	-4,8	800,0	
	Na2	-16,4	1680,0	
	Na3	-10,1	1581,0	

Os valores calculados a partir dos espectros 1D e 2D de ^{23}Na estão de acordo com os dados de NaVO_3 reportados previamente (SKIBSTED et al., 1993), o que confirma a mistura das fases α e β no NaVO_3 utilizado. Apesar do precursor conter as duas fases em sua composição, o $\beta\text{-NaVO}_3$ é conhecido por ser a fase cristalina estável em menores temperaturas, o qual se converte irreversivelmente para a fase cristalina $\alpha\text{-NaVO}_3$ quando aquecido acima de $405\text{ }^\circ\text{C}$ (LUKÁCS; STRUSIEVICI, 1962). Dessa maneira, a obtenção de apenas uma fase cristalina ($\alpha\text{-NaVO}_3$) no precursor foi assegurada pelo seu aquecimento a $450\text{ }^\circ\text{C}$, como mostra o espectro de MAS-RMN do isótopo de ^{51}V do NaVO_3 após o tratamento térmico (Figura 13).

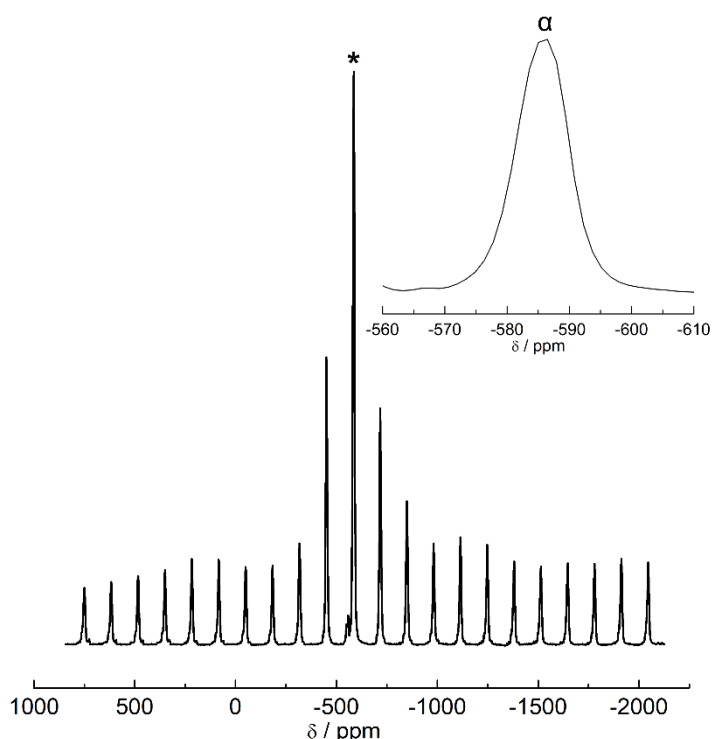


Figura 13 - Espectro de MAS-RMN (14 kHz) de ^{51}V do NaVO_3 após o tratamento térmico. O pico referente à transição central (+1/2 e -1/2) da fase cristalina $\alpha\text{-NaVO}_3$ está identificado com um asterisco.

O único sinal observado em -586 ppm corresponde ao sítio de vanádio no $\alpha\text{-NaVO}_3$ (SKIBSTED et al., 1993), indicando a obtenção de uma única fase cristalina após o tratamento térmico realizado. O experimento 2D de TQ-MAS também permitiu a identificação resolvida dos sítios de sódio (Figura 14), de modo que os sinais identificados no espectro 2D correspondem aos dois sítios de sódio não equivalentes no $\alpha\text{-NaVO}_3$ (MARUMO et al., 1974), mostrando a conversão do $\beta\text{-NaVO}_3$ em $\alpha\text{-NaVO}_3$ após o tratamento térmico realizado. Os sinais não identificados no espectro 2D da Figura 14.a correspondem às bandas laterais do sítio Na1 .

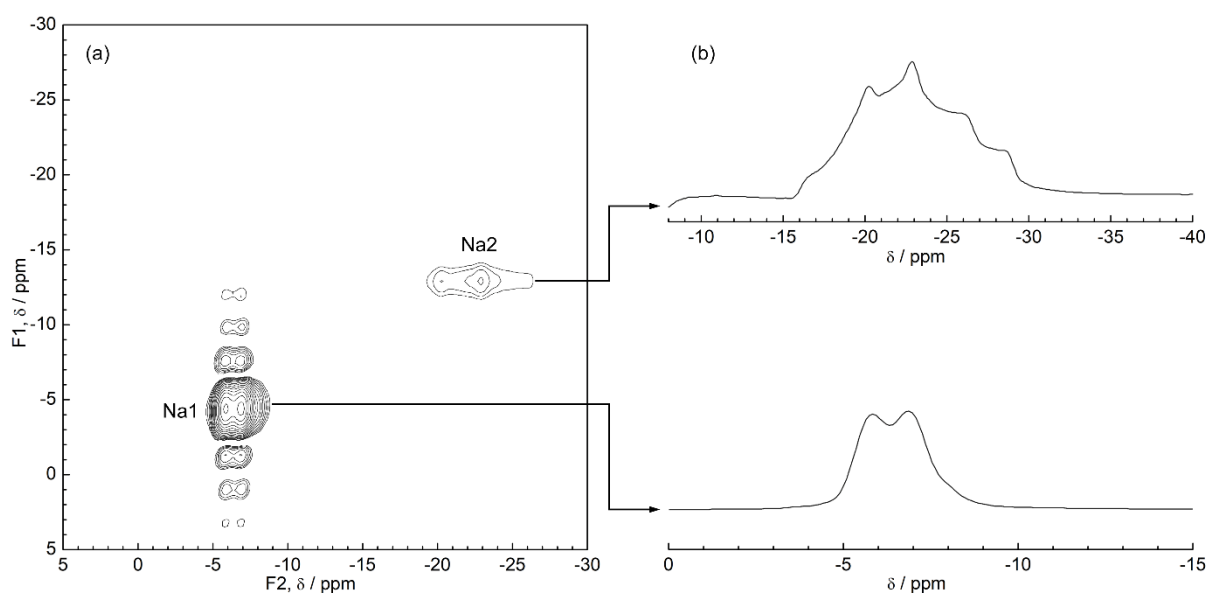


Figura 14 - Espectro 2D de TQ-MAS de RMN de ^{23}Na do precursor NaVO_3 após o tratamento térmico (a) e as projeções extraídas da dimensão F2 para cada sítio de sódio (b).

Considerando os dois sítios de sódio não equivalentes identificados no espectro 2D da Figura 14, os espectros 1D de ^{23}Na do NaVO_3 após o tratamento térmico (TT) também foram simulados (Figura 15).

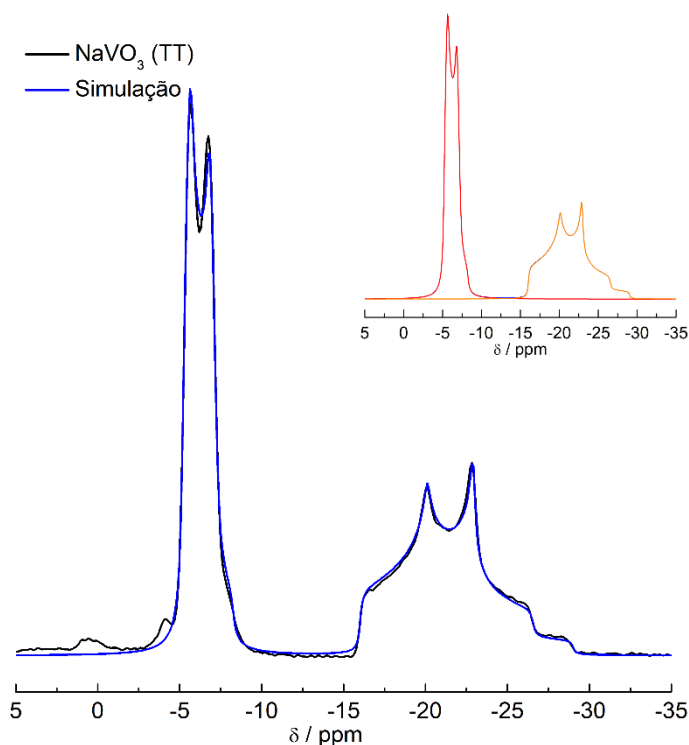


Figura 15 - Comparação entre o espectro de MAS-RMN de ^{23}Na do NaVO_3 após o tratamento térmico (TT) e a simulação do espectro experimental. A imagem em destaque mostra a decomposição de cada um dos sítios de sódio não equivalentes.

O espectro de MAS-RMN de ^{23}Na observado na Figura 15 também está de acordo com os dados reportados por Skibsted (1993), confirmando a obtenção da fase cristalina $\alpha\text{-NaVO}_3$ após o tratamento térmico. Os valores de δ_{iso} , C_q e η_q estão apresentados na Tabela 4 e foram calculados da mesma forma que os dados reportados na Tabela 3.

Tabela 4 - Desvio químico isotrópico (δ_{iso}) constante quadrupolar (C_q) e parâmetro de simetria (η_q) calculados a partir dos espectros de MAS-RMN e TQ-MAS de ^{23}Na do $\alpha\text{-NaVO}_3$ obtido.

Experimento	Sítio	δ_{iso}	C_q	η_q
MAS-RMN	Na1	-4,9	768,7	0,23
	Na2	-15,7	1506,8	0,56
TQ-MAS	Na1	-5,0	782,0	
	Na2	-16,4	1679,0	

Além de comprovar a obtenção do $\alpha\text{-NaVO}_3$ após a realização do tratamento térmico no precursor utilizado, os valores calculados na Tabela 4 mostram a diferença no arranjo dos átomos de sódio no $\alpha\text{-NaVO}_3$. Tanto o sítio Na1 quanto o Na2 se encontram ligados a seis átomos de oxigênio, mas a geometria de coordenação em torno do sítio Na2 é octaédrica enquanto os átomos de oxigênio se encontram dispostos de maneira mais irregular em torno do sítio Na1 (MARUMO et al., 1974), de modo que o sítio Na2 apresenta maiores valores de C_q e η_q , enquanto os mesmos valores são menores para o sítio Na1.

Dessa maneira, o $\alpha\text{-NaVO}_3$ obtido após o tratamento térmico foi utilizado para a reação em estado sólido com o carbonato de sódio para a obtenção do Na_3VO_4 . Assim, a síntese do Na_3VO_4 foi confirmada através da comparação dos espectros Raman mostrados na Figura 16. A banda que apresenta maior intensidade no espectro do ortovanadato de sódio é observada em 831 cm^{-1} e está relacionada com os modos vibracionais do íon $(\text{VO}_4)^{3-}$ livre (LI; YANG; CHANG, 1985), enquanto as bandas características das unidades terminais do íon $(\text{VO}_3)^-$ podem ser observadas em 944 e 954 cm^{-1} apenas no espectro do NaVO_3 (SEETHARAMAN; BHAT; NARAYANAN, 1983; FROST et al., 2005).

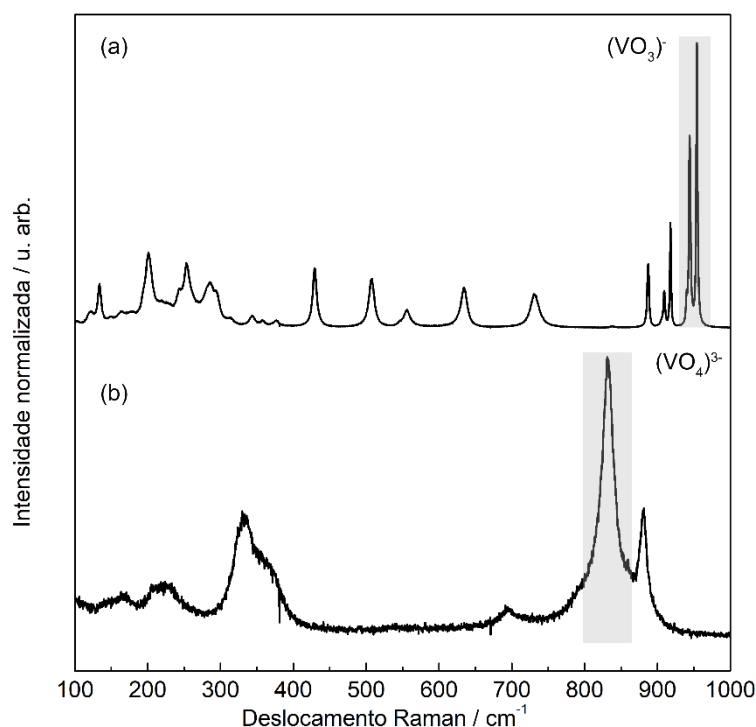


Figura 16 - Espectros Raman na região de 100 à 1000 cm^{-1} destacando os modos vibracionais característicos do precursor NaVO_3 utilizado (a) e do Na_3VO_4 sintetizado (b).

Não foram observadas bandas na região acima de 1000 cm^{-1} , de modo que todas as bandas presentes nos espectros Raman da Figura 16 estão indicadas na Tabela 5, bem como a atribuição dos seus respectivos modos vibracionais.

Tabela 5 - Atribuição das bandas Raman observadas para o NaVO_3 e Na_3VO_4 .

NaVO_3		Na_3VO_4	
Banda / cm^{-1}	Atribuição	Banda / cm^{-1}	Atribuição
122, 134, 149, 164 e 201	Vibrações da rede cristalina	167 e 224	Vibrações da rede cristalina
254, 286 e 313	δ V-O-V	330 e 357	δ V-O-V
343, 358 e 377	δ VO_2	694	ν_{as} V-O-V
429 e 508	ν_{sim} V-O-V	831 e 881	ν_{as} $(\text{VO}_4)^{3-}$
556	$\nu_{\text{sim+as}}$ V-O-V		
634 e 731	ν_{as} V-O-V		
887 e 909	ν_{as} $(\text{VO}_3)^-$		
944 e 954	ν_{sim} $(\text{VO}_3)^-$		

ν_{sim} e ν_{as} referem-se aos estiramentos simétrico e assimétrico, respectivamente. δ corresponde à deformação angular.

A obtenção do ortovanadato de sódio também pode ser confirmada pelo espectro de MAS-RMN do isótopo de ^{51}V obtido a partir do Na_3VO_4 preparado (Figura 17).

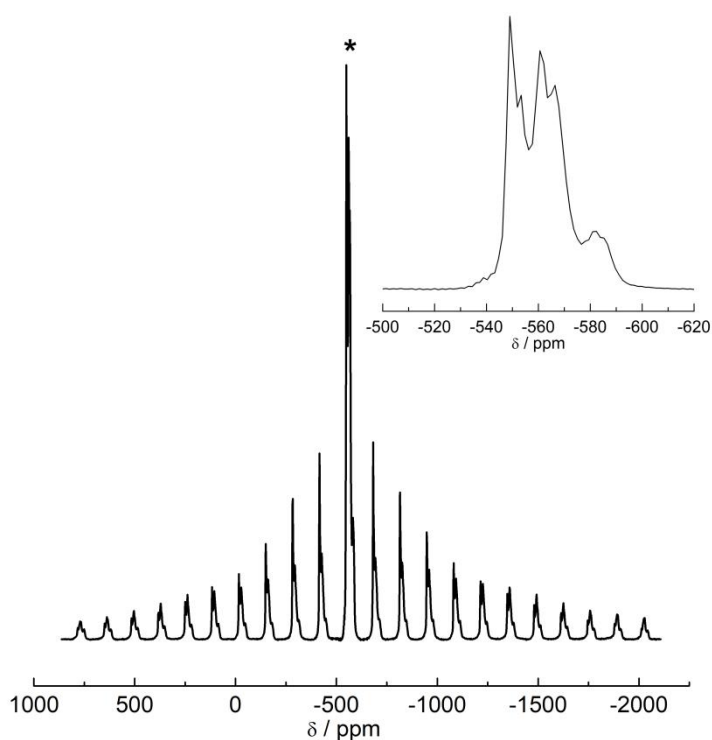
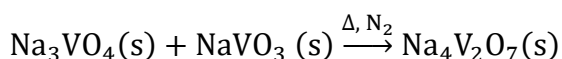


Figura 17 - Espectro de MAS-RMN de ^{51}V (14 kHz) do Na_3VO_4 . As transições centrais estão denotadas pelo asterisco e o quadro em destaque mostra a região ampliada dessas transições.

O sinal mais intenso observado em -548 ppm corresponde ao Na_3VO_4 , enquanto o sinal de menor intensidade em -583 ppm indica a existência de $\alpha\text{-NaVO}_3$ que não reagiu com o carbonato de sódio. A existência do $\alpha\text{-NaVO}_3$ em excesso explica os sinais observados em -560 e -567 ppm, os quais estão relacionados aos dois sítios distintos de vanádio presentes no pirovanadato de sódio ($\text{Na}_4\text{V}_2\text{O}_7$) (ECKERT; WACJS, 1987; LAPINA et al., 1992). O $\text{Na}_4\text{V}_2\text{O}_7$ pode ser obtido durante a síntese do Na_3VO_4 pela reação entre o $\alpha\text{-NaVO}_3$ em excesso com o Na_3VO_4 formado, conforme a reação representada abaixo (BARKER; HOOPER, 1973).



Os modos vibracionais do íon pirovanadato (V_2O_7) $^{4-}$ não puderam ser identificados no espectro Raman da Figura 16.b porque ocorrem na região em torno de 880 cm^{-1} (HAMILTON; NAGELBERG, 1984), ficando sobreposto aos modos vibracionais do íon (VO_4) $^{3-}$ livre. A sobreposição das linhas de ressonância no espectro de RMN do ^{51}V também dificulta a distinção das fases cristalinas observadas no produto final do preparo do Na_3VO_4 . Entretanto, foi possível realizar a síntese das nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ utilizando o Na_3VO_4 obtido sem purificação prévia, pois este dá origem ao complexo polimérico de ítrio/citrato/ortovanadato inicialmente

formado durante o preparo das nanopartículas (GIAUME et al., 2005). Assim, a formação das Eu-NPs de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ pode ser confirmada pelo DRX mostrado na Figura 18.

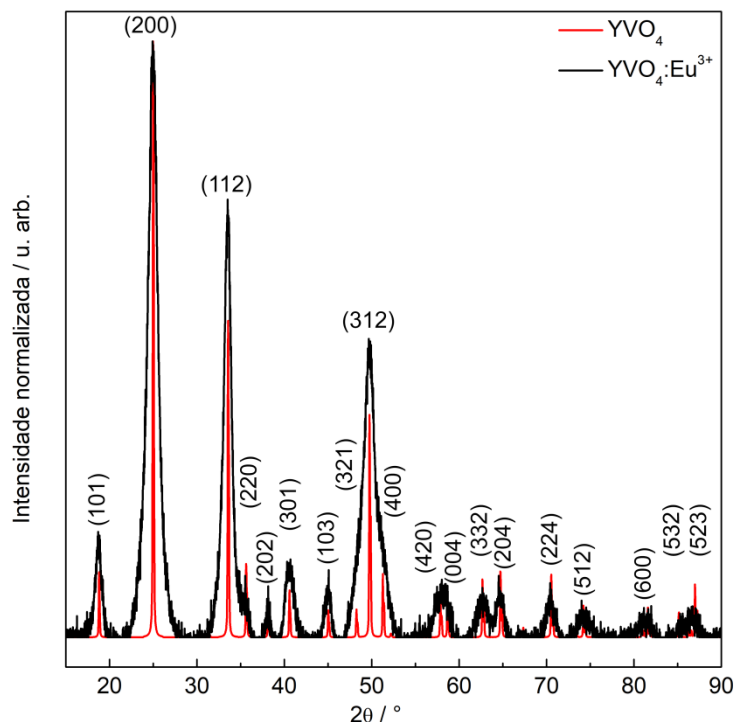


Figura 18 - Difratoograma de raios X das nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ e do YVO_4 (PDF 72-861).

Os planos cristalinos identificados correspondem ao ortovanadato de ítrio, que apresenta uma estrutura do tipo zircônia (BAGLIO; GASHUROV, 1968; BAGLIO; SOVERS, 1971). O alargamento das bandas observadas para o difratograma do $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ em comparação com as linhas observadas no difratograma do YVO_4 está relacionado com a distorção da rede cristalina ocasionada pela obtenção do material na escala nanométrica, pois o aumento da área superficial resulta em uma maior distorção dos poliedros de VO_4 em comparação com o $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ na forma de *bulk* (HUIGNARD et al., 2003). A distorção da rede também pode ser identificada no espectro de RMN de ^{51}V das nanopartículas (Figura 19).

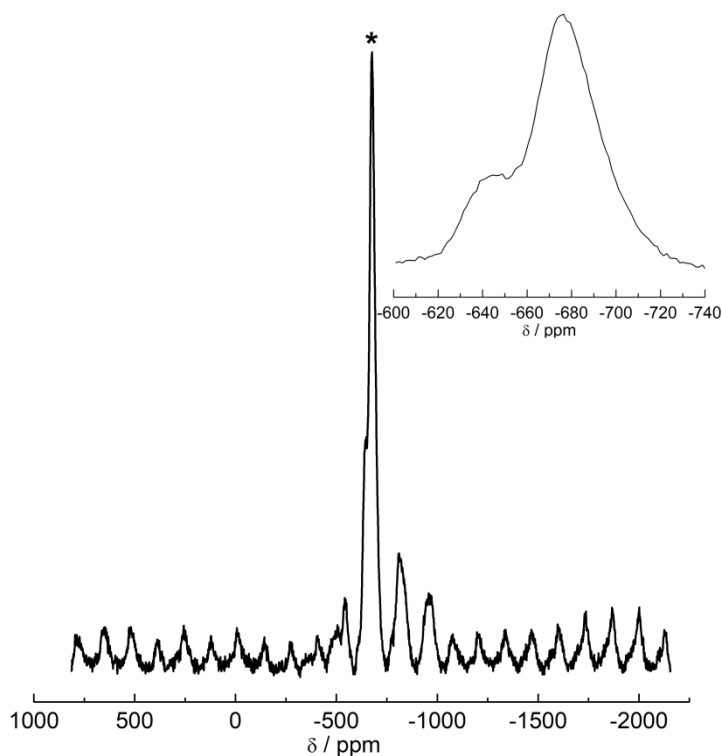


Figura 19 - Espectro de MAS-RMN de ^{51}V (14 kHz) das nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ em estado sólido. As transições centrais estão denotadas pelo asterisco e o quadro em destaque mostra a região ampliada dessas transições.

O sinal observado em -676 ppm corresponde ao sítio de vanádio no YVO_4 . O pico observado em -646 ppm é atribuído aos tetraedros de VO_4 distorcidos presentes na estrutura cristalina, que também sofrem influência da substituição do íon Y^{3+} pelo íon Eu^{3+} na dopagem realizada (LAPINA et al., 1992; AMANTEA et al., 2005). A metodologia empregada para a obtenção das nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ dificilmente leva à formação de nanopartículas monodispersas e com morfologia bem definida, as quais são comumente obtidas por métodos complexos realizados em condições reacionais mais rigorosas (SHAO et al., 2013). Desse modo, as condições reacionais brandas empregadas levam à formação de aglomerados de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$, os quais podem ser observados nas micrografias de HRTEM (Figura 20).

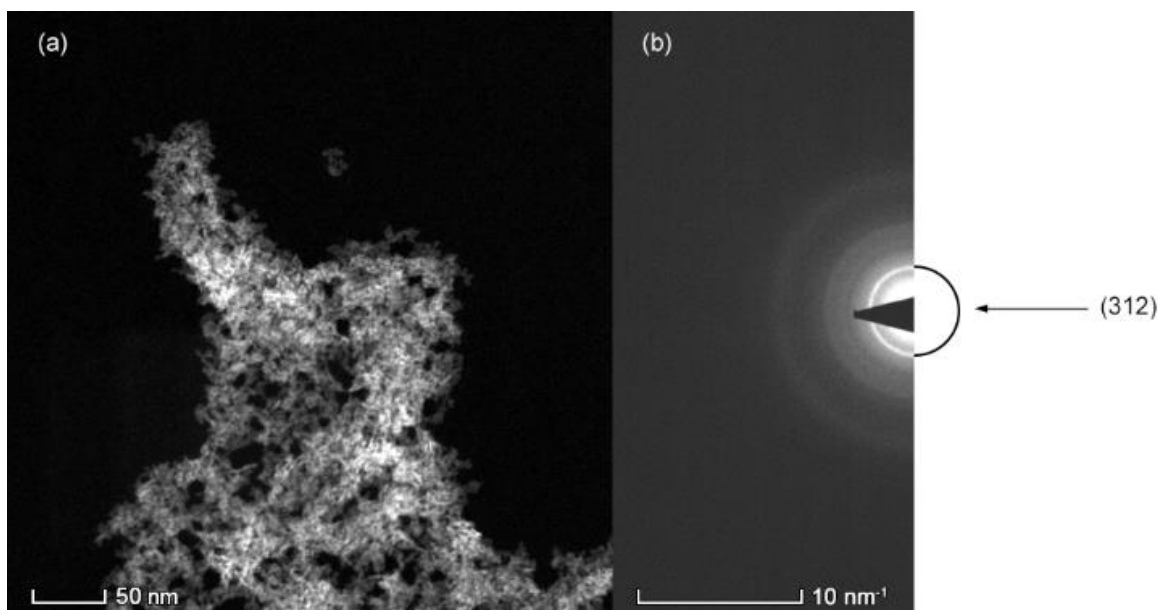


Figura 20 - Imagens de HRTEM (a) e SAED das nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ preparadas (b).

A imagem de SAED (Figura 20.b) apresenta os anéis difusos, característicos de materiais amorfos, que estão relacionados ao citrato utilizado para a obtenção das Eu-NPs. O plano cristalino (312) do YVO_4 pode ser identificado no padrão de difração de SAED, corroborando com os planos observados no difratograma de raios X das nanopartículas (Figura 18). A presença dos elementos ítrio, európio, vanádio e oxigênio foi confirmada pelo mapeamento de EDS realizado (Figura 21).

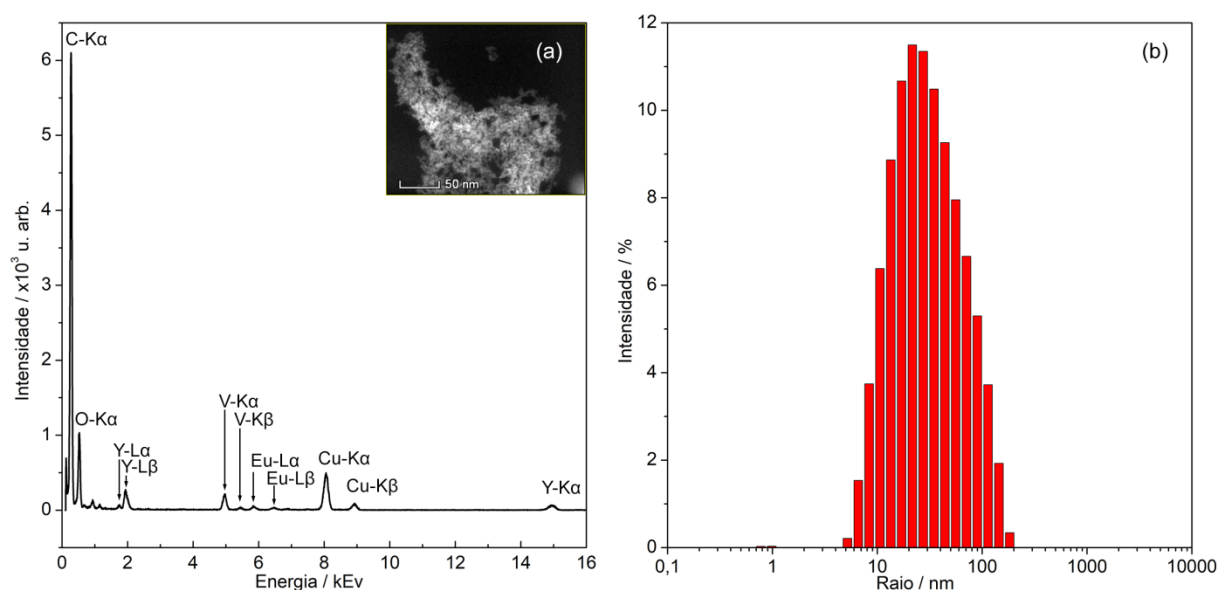


Figura 21 - Espectro de EDS das nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (a). A imagem em destaque mostra a região onde foi realizado o mapeamento. Raio hidrodinâmico das nanopartículas (b).

O mapeamento por EDS também mostra a presença dos elementos carbono e cobre, os quais são provenientes do estabilizante citrato nas nanopartículas e da grade utilizada para a deposição da amostra, respectivamente. As nanopartículas obtidas apresentam diâmetro médio de 44 nm e, como esperado para a metodologia empregada, mostram uma distribuição de tamanho heterogênea, indicada pelo índice de polidispersividade igual a 0,247.

Após reação com a 2-maleimidoetilamina, diferentes graus de funcionalização foram obtidos para as Eu-NPs, mas apenas aquelas contendo 260 nmol L⁻¹ de grupo maleimida foram utilizadas para bioconjugação com as FPs. Para as NPs com menor grau de funcionalização não houve sítios de maleimida suficientemente disponíveis para a bioconjugação, enquanto para as NPs com maior grau de funcionalização os grupos citrato disponíveis não foram suficientes para manter as NPs estáveis em suspensão, levando à sua precipitação e inviabilizando a realização de análises em solução. As propriedades ópticas das Eu-NPs obtidas após funcionalização não se diferenciam das nanopartículas sem o grupo maleimida, de modo que seus espectros de excitação e emissão (Figura 22) apresentam as bandas características das Eu-NPs de YVO₄:Eu³⁺.

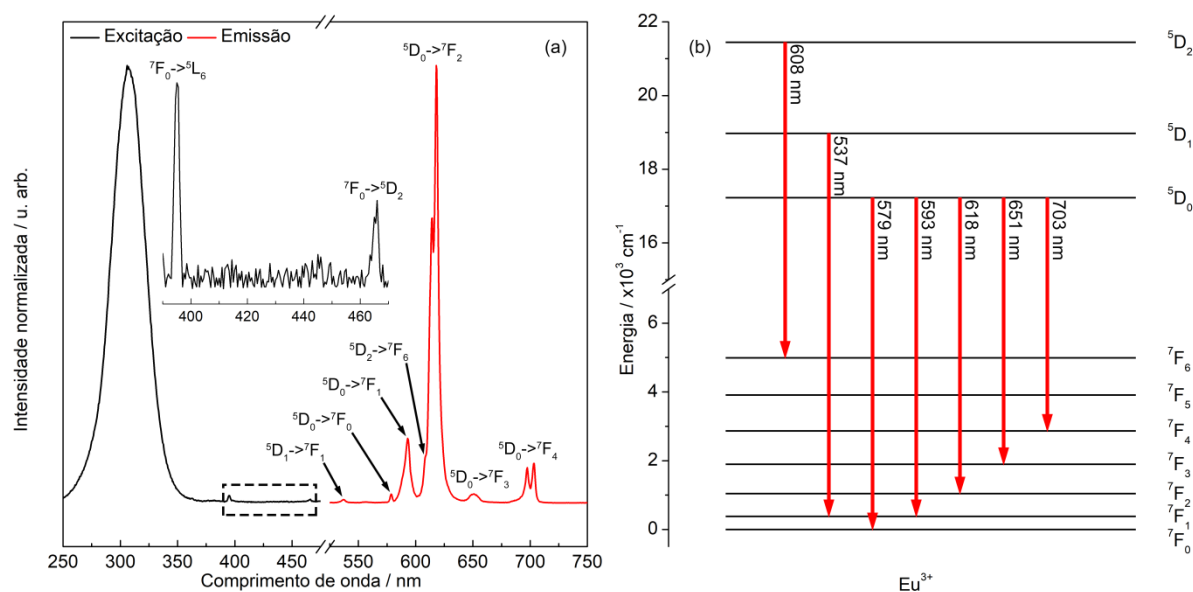


Figura 22 - Espectros de excitação monitorando a emissão em 618 nm e de emissão com excitação em 307 nm das Eu-NPs obtidas após a funcionalização (a). A linha tracejada denota a região de 390 à 470 nm do espectro de excitação ampliada. Diagrama esquemático dos níveis de energia do Eu³⁺ mostrando as transições responsáveis pela emissão das Eu-NPs (b).

O espectro de excitação se divide em duas áreas distintas. A primeira delas apresenta uma banda larga e intensa entre as regiões de 250 e 350 nm, com máximo em 307 nm, que é correspondente à transferência de carga do ortovanadato para o európio (HUIGNARD et al.,

2003). Nesse processo, os grupos $(VO_4)^{3-}$ da matriz de YVO_4 absorvem a energia proveniente da fonte de excitação (UV) e, ao atingir o estado excitado, a transfere pela rede de ortovanadato populando os estados emissores do Eu^{3+} (BLASSE; BRIL, 1970; POWELL; BLASSE, 1980). A segunda área mostra duas bandas finas de menor intensidade na região ampliada, que são características das transições $^7F_0 \rightarrow ^5L_6$ (395 nm) e $^7F_0 \rightarrow ^5D_2$ (466 nm) do Eu^{3+} . Essas bandas podem ser utilizadas para a excitação direta do íon Eu^{3+} , mas como apresentam baixo coeficiente de absortividade molar ($\epsilon < 5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (BINNEMANS, 2015), a emissão resultante é de baixa intensidade e, por isso, a excitação foi realizada utilizando a banda de transferência de carga do ortovanadato em 307 nm.

O espectro de emissão é dominado pelas bandas finas características das transições 4f-4f do Eu^{3+} , do estado excitado 5D_0 para os diferentes níveis 7F_J ($J=0-4$), as quais ocorrem na região de 570 a 710 nm. As transições $^5D_0 \rightarrow ^7F_{0,2,3,4}$ são induzidas por dipolo elétrico e sofrem influência do ambiente em que o Eu^{3+} se encontra, enquanto a transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ (593 nm) ocorre por dipolo magnético e é fracamente influenciada pelo ambiente (BINNEMANS, 2015). Entre elas, a banda mais intensa observada corresponde à transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ (614 e 618 nm), chamada de hipersensitiva por sofrer grande influência da simetria na qual se encontra o Eu^{3+} , além de ser responsável pela emissão na região vermelha do espectro eletromagnético observada para as Eu-NPs (BINNEMANS, 2015). Juntamente com a transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$ (698 e 703 nm) que aparece com menor intensidade, a ocorrência da transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ indica que o Eu^{3+} não se encontra em um sítio com centro de inversão de simetria (HUIGNARD et al., 2003). A transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ só pode ser observada quando o Eu^{3+} ocupa um sítio de simetria C_{nv} , C_n ou C_s , então a sua ocorrência em 579 nm indica que o Eu^{3+} ocupa um desses sítios de simetria nas Eu-NPs obtidas (BINNEMANS, 2015). A transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_3$ é observada como uma banda de baixa intensidade em 651 nm por ser proibida pela teoria de Judd-Ofelt (BINNEMANS, 2015).

Além das transições características do estado excitado 5D_0 de menor energia, transições dos níveis emissores 5D_1 e 5D_2 de maior energia do Eu^{3+} podem ser observadas no espectro de emissão das Eu-NPs. Essas transições são comumente observadas para matrizes inorgânicas com baixa energia de fônon dopadas com Eu^{3+} , onde ocorrem sobrepostas às bandas provenientes das transições $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$ e $^5D_{1,2} \rightarrow ^7F_J$ (BINNEMANS, 2015). Para as nanopartículas de $YVO_4:Eu^{3+}$ sintetizadas foram observadas uma banda de baixa intensidade relativa à transição $^5D_1 \rightarrow ^7F_1$ em 537 nm e outra banda característica da transição $^5D_2 \rightarrow ^7F_6$ (608 nm), a qual se encontra sobreposta à banda da transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$.

6.2 Expressão e purificação das proteínas fluorescentes

Após a digestão com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Hind*III, as sequências de DNA das proteínas Azurite e mTangerine amplificadas por PCR e do vetor pQE-9 foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (Figura 23). Como a sequência de DNA das proteínas e do vetor pQE-9 é de aproximadamente 0,7 e 3,4 kbp, respectivamente, os valores observados no gel de agarose são condizentes com os resultados esperados.

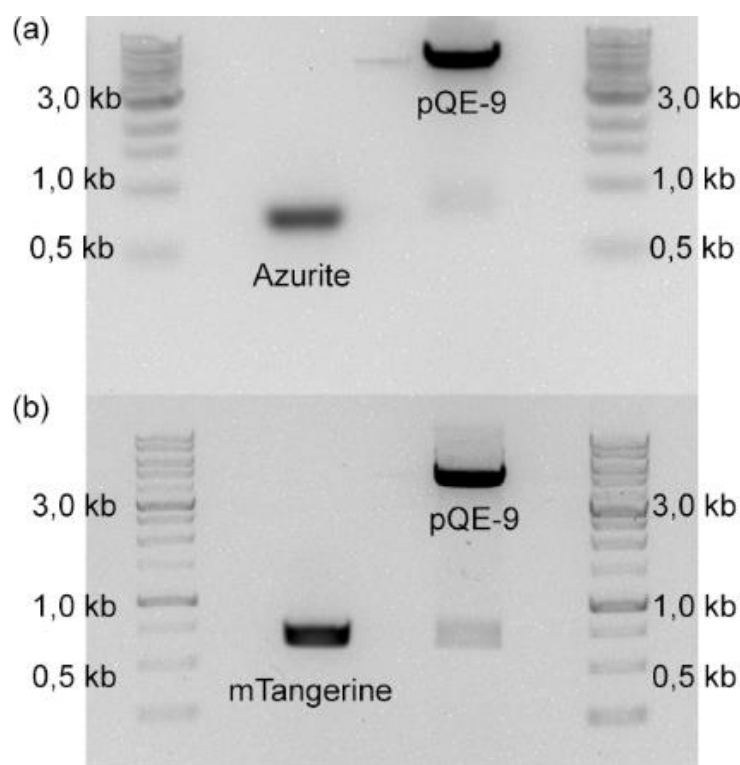
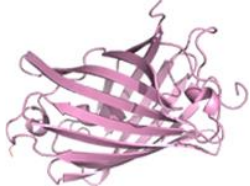
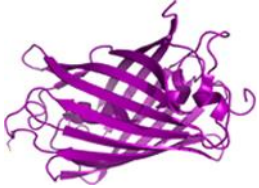


Figura 23 - Gel de agarose 1% revelado com SYBR® Safe contendo o DNA do vetor pQE-9 e das proteínas Azurite (a) e mTangerine (b) após a digestão. Os números nas colunas à esquerda e direita indicam os padrões de referência utilizados, com valores em kb.

O sequenciamento de DNA foi utilizado para verificar a construção correta dos plasmídeos contendo essas sequências de DNA. A Tabela 6 mostra a sequência de aminoácidos das proteínas Azurite e mTangerine, proveniente dos plasmídeos pQE-9/Azurite e pQE-9/mTangerine previamente construídos e também das proteínas EGFP e mCherry, obtidas a partir dos plasmídeos pQE-9/EGFP e pQE-9/mCherry fornecidos pelo Olsen Lab.

Tabela 6 - Sequência de aminoácido e estrutura das proteínas Azurite, EGFP, mTangerine e mCherry, incluindo o 6xHis-Tag. Os aminoácidos presentes nos grupos cromóforos encontram-se em destaque.

Sequência de aminoácidos	Estrutura
Azurite HHHHHHGSMSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGD ATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLS <u>H</u> GVQCFSRYPDHMKQH DFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELK GIDFKEDGNILGHKLEYNFNHNIYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIE DGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRD HMLLEFRTAAGITHGMDELYK	
EGFP HHHHHHGSACELMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSG EGEDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLT <u>T</u> YGVQCFSRYPD HMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLV NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNHNHNVYIMADKQKNGIKVNF KIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDP NEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK	
mTangerine HHHHHHGSMASSDVIKEFMRFKVRMEGSVNGHEFEIEGEGEGR PYEGTQTAKLKVTGGPLPFAWDILSPQF <u>C</u> YGSKAYVKHPADIPD YLKLSPPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLR GTNFPDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKMRLKLK DGGHYDAEVKTTYMAKKPVQLPGAYKTDIKLDITSHNEDYTIVEL YERAEGRHSTGA	
mCherry HHHHHHGSMSVSKGEEDNMAIIEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEG EGEGRPYEGTQTAKLKVTGGPLPFAWDILSPQF <u>M</u> YGSKAYVKH PADIPDYLKLSPPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIY KVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQ RLKLKDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNED YTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK	

A sequência de aminoácidos das FPs obtidas corresponde à sequência esperada para cada uma das proteínas e o 6xHis-Tag utilizado para a purificação por IMAC se encontra na região N-terminal. Após a purificação, as proteínas apresentaram elevado grau de pureza, conforme observado na imagem do gel de SDS-PAGE (Figura 24). Cada uma das proteínas apresenta uma banda na região entre 25 e 32 kDa, que corresponde à massa molecular esperada com base em suas sequências de aminoácido. Bandas em valores inferiores à 25 kDa foram observadas para as proteínas mTangerine e mCherry, as quais aparecem devido à clivagem do seu grupo cromóforo durante o aquecimento realizado na preparação das amostras para a obtenção do gel de SDS-PAGE (THOMAS; XU; OLSEN, 2012).

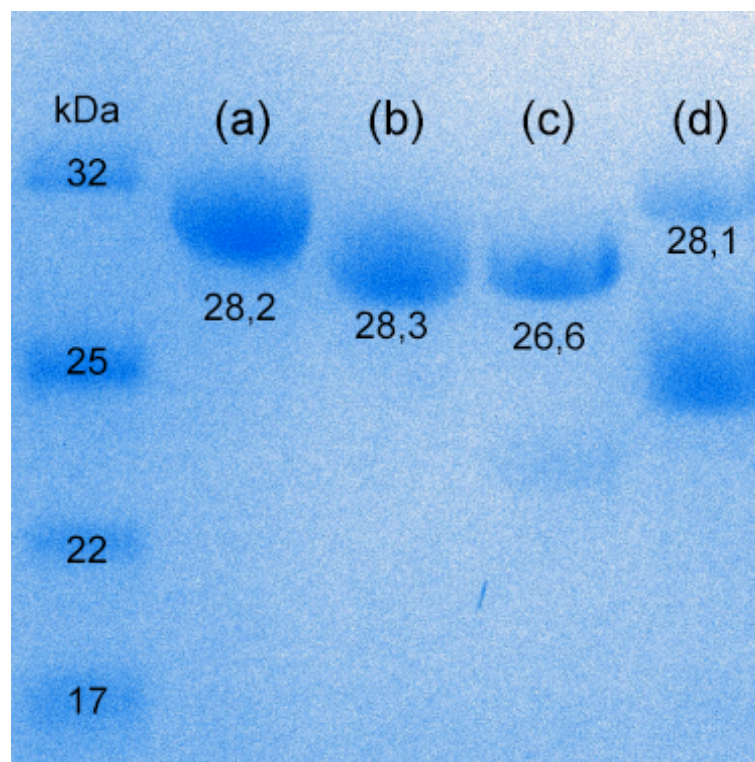


Figura 24 - Gel de SDS-PAGE 12% revelado com Coomassie Brilliant Blue das proteínas Azurite (a), EGFP (b), mTangerine (c) e mCherry (d) após purificação. Os valores marcados próximos às bandas correspondem ao valor de massa molecular calculado pela sequência de aminoácidos. A coluna à esquerda mostra o padrão de massa molecular utilizado, em kDa.

A quantificação das proteínas foi realizada por espectrofotometria utilizando seus coeficientes de extinção previamente reportados na literatura (PATTERSON; DAY; PISTON, 2001; SHANER et al., 2004; MENA et al., 2006). A Tabela 7 mostra o rendimento de expressão das proteínas em função da massa de proteína obtida por volume de meio de cultura inoculado.

Tabela 7 - Determinação espectrofotométrica do rendimento de expressão das FPs.

Proteína	Coefficiente de extinção ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Comprimento de onda (nm)	Rendimento (mg L^{-1})
Azurite	26.200	388	87
EGFP	56.000	488	98
mTangerine	38.000	567	67
mCherry	72.000	586	107

A expressão das proteínas apresentou um rendimento médio de aproximadamente 90 mg L^{-1} , que é consistente com os valores obtidos utilizando o vetor pQE-9. As propriedades ópticas das proteínas Azurite, EGFP, mTangerine e mCherry podem ser observadas em seus espectros de absorção e emissão (Figura 25), que apresentam as bandas características de cada uma das proteínas utilizadas.

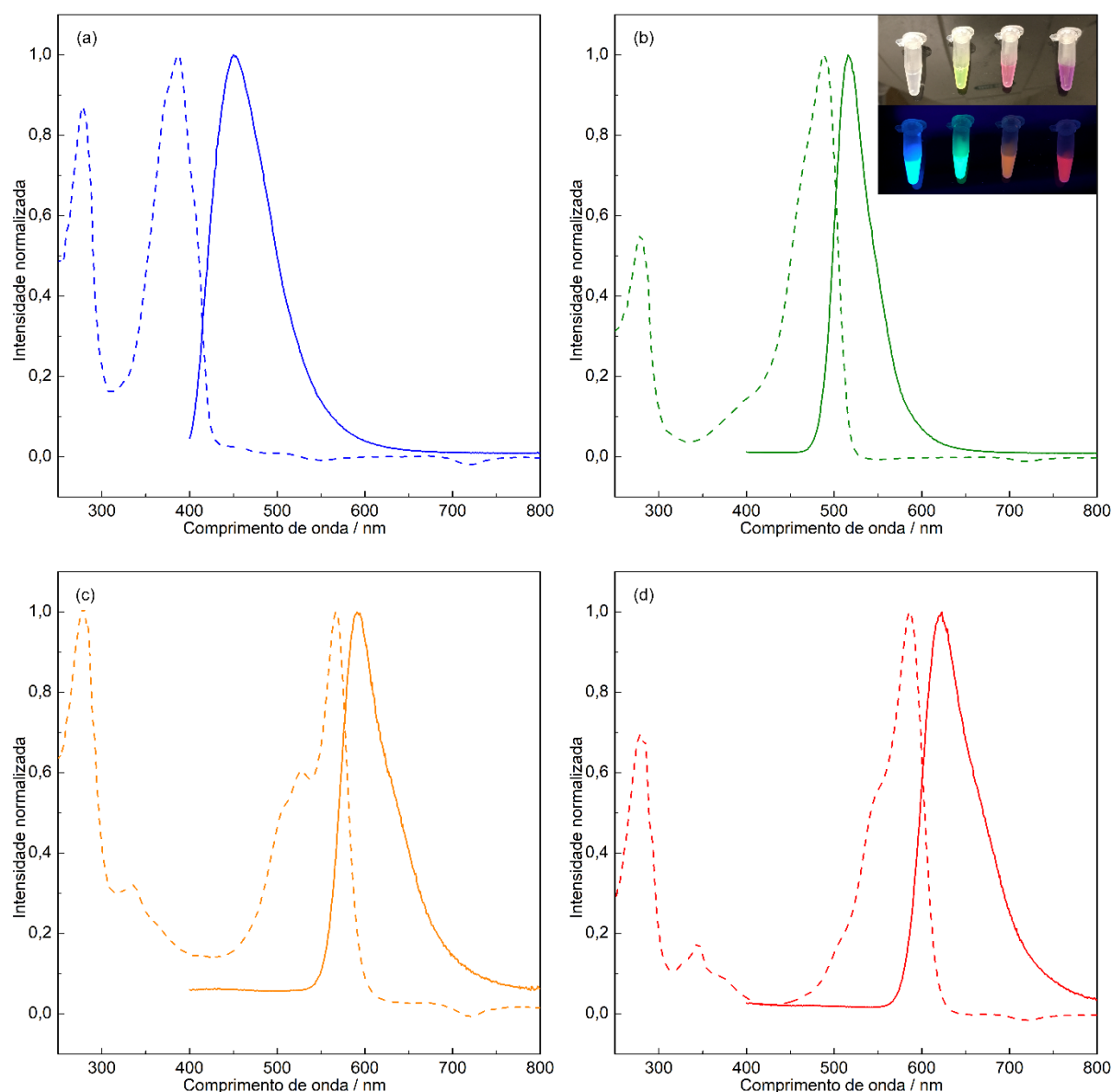


Figura 25 - Espectros de absorção (linha tracejada) e de emissão sob excitação em 280 nm (linha contínua) das proteínas Azurite (a), EGFP (b), mTangerine (c) e mCherry (d). A imagem em destaque mostra, da esquerda para a direita, as soluções das proteínas Azurite, EGFP, mTangerine e mCherry irradiadas com luz branca (superior) e com luz ultravioleta (inferior).

As bandas de absorção relativas aos grupos cromóforos das proteínas Azurite, EGFP, mTangerine e mCherry podem ser observadas em 388, 488, 567 e 586 nm, respectivamente. A banda de emissão característica de cada proteína é uma imagem especular da banda de absorção do seu grupo cromóforo porque a mesma transição envolvida no processo de absorção ($S_0 \rightarrow S_1$) está envolvida no processo de emissão ($S_1 \rightarrow S_0$), ocorrendo a perda de energia por processos vibracionais durante a emissão, o que resulta no Deslocamento Stokes observado entre as duas bandas (LAKOWICZ, 1999). Todas as proteínas também apresentam uma banda em 280 nm, que é característica da absorção dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano

presentes na estrutura das proteínas (TEALE; WEBER, 1957). Todas bandas observadas em cada um dos espectros das proteínas são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Comprimentos de onda de absorção e emissão das FPs obtidas.

Proteína	Absorção (nm)	Emissão (nm)
Azurite	280 e 388	450
EGFP	280 e 488	510
mTangerine	280, 335 e 567	585
mCherry	280, 345 e 586	610

Apesar da absorção mais intensa de cada uma das proteínas estar relacionada à banda do seu grupo cromóforo, a excitação em qualquer uma das bandas de absorção leva à emissão em seu comprimento de onda característico, o que também viabiliza o uso da região em torno de 280 nm como região de excitação para as proteínas.

6.3 Bioconjugados de proteínas fluorescentes com nanopartículas de Eu³⁺

A concentração de proteínas presente nos bioconjugados obtidos pela reação *click* tiol-eno entre o resíduo de cisteína das FPs Azurite, EGFP, mTangerine e mCherry e o grupo maleimida inserido nas Eu-NPs é apresentada na Tabela 9.

Tabela 9 - Concentração final das proteínas após bioconjugação com as Eu-NPs e nomenclatura adotada para cada uma das amostras obtidas.

Concentração (mg mL⁻¹)	Amostra			
	Azurite	EGFP	mTangerine	mCherry
0,000	Eu	Eu	Eu	Eu
0,125	Eu-Az1	Eu-EGFP1	Eu-mT1	Eu-mC1
0,250	Eu-Az2	Eu-EGFP2	Eu-mT2	Eu-mC2
0,375	Eu-Az3	Eu-EGFP3	Eu-mT3	Eu-mC3
0,500	Eu-Az4	Eu-EGFP4	Eu-mT4	Eu-mC4
0,500	Az*	EGFP*	mT*	mC*

*Solução da proteína sem Eu-NPs utilizada como referência.

Para o estudo de transferência de energia entre as Eu-NPs e FPs, foram analisados os espectros de excitação e emissão dos bioconjugados obtidos com diferentes concentrações de cada proteína, mantendo sempre fixa a concentração de nanopartículas utilizadas. Como todas as proteínas apresentam uma banda larga de absorção com máximo em 280 nm, que se sobrepõe à banda larga de transferência de carga do ortovanadato (307 nm) no espectro de excitação das Eu-NPs, a excitação dos bioconjugados foi realizada em 307 nm, onde ocorre a excitação

simultânea das FPs e Eu-NPs. Nessa abordagem, as mudanças observadas nos espectros de emissão dos bioconjugados se dão pelos processos de transferência de energia entre as proteínas e nanopartículas. Assim, a análise foi realizada pela comparação dos resultados obtidos para as Eu-NPs com aqueles obtidos para os bioconjugados FPs/Eu-NPs. Os resultados obtidos para os bioconjugados Azurite/Eu-NPs são apresentados na Figura 26.

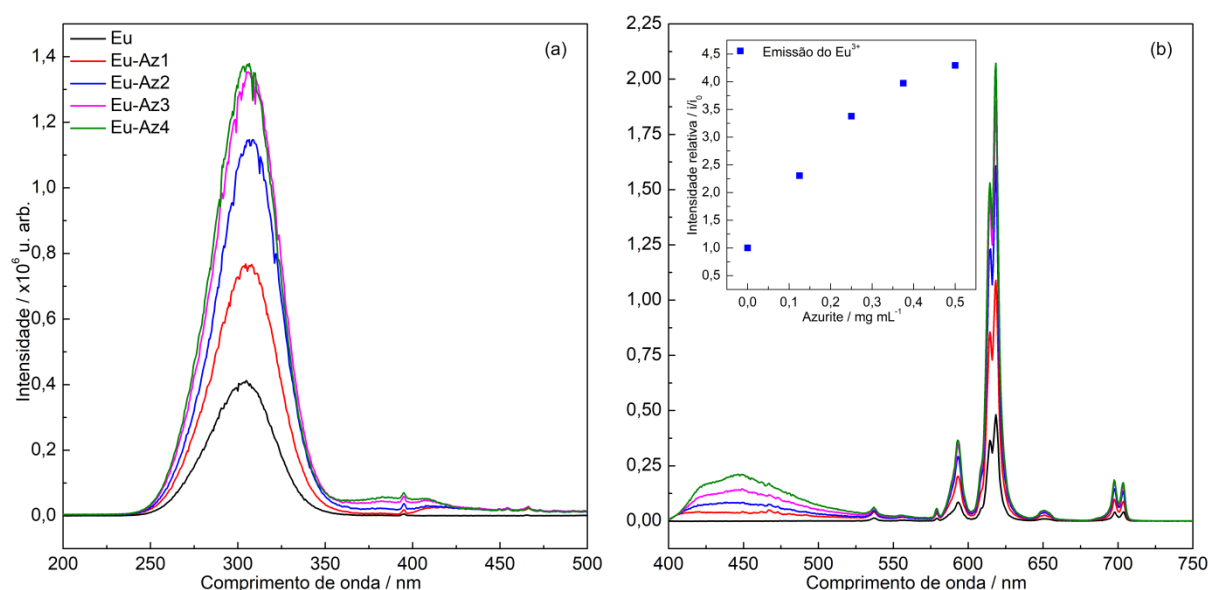


Figura 26 - Espectros de excitação monitorando a emissão em 618 nm (a) e de emissão sob excitação em 307 nm (b) das nanopartículas de Eu^{3+} e de seus conjugados com a proteína Azurite. O quadro em b mostra a intensidade relativa da emissão do Eu^{3+} (i/i_0 , onde i_0 é a intensidade integrada da transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ das Eu-NPs na ausência de proteína e i é a intensidade integrada da mesma transição no bioconjugado Azurite/Eu-NPs) em função da concentração de Azurite.

As Eu-NPs contendo a proteína Azurite apresentam as bandas finas características do íon Eu^{3+} tanto no espectro de excitação (395 e 466 nm) quanto no espectro de emissão (530 à 710 nm). O aparecimento de bandas largas com menores intensidades entre 390 e 450 nm nos espectros de excitação e emissão é atribuído à absorção e emissão da Azurite, respectivamente. Uma vez que a concentração de Eu-NPs foi mantida fixa variando apenas a concentração de Azurite, observa-se que o aumento da concentração de proteína leva ao aumento da emissão característica do Eu^{3+} em 618 nm (aumento de 4,3 vezes para a maior concentração de Azurite). Além dos espectros de excitação e emissão, foram realizadas medidas para obter os tempos de vida de emissão (τ) da transição 5D_0 do íon Eu^{3+} e da Azurite ajustando as curvas de decaimento de luminescência com uma função de decaimento exponencial de primeira ordem (Seção 5.3). A Tabela 10 mostra os valores obtidos.

Tabela 10 - Tempo de vida de emissão dos bioconjugados obtidos com a proteína Azurite. O tempo de vida do Eu^{3+} (τ_{Eu}) foi determinado com excitação em 307 nm e monitorando sua emissão em 618 nm enquanto o tempo de vida da Azurite (τ_{Azurite}) foi determinado com excitação em 290 nm e monitorando sua emissão em 450 nm.

Amostra	$\tau_{\text{Eu}} (\pm 0,01 \text{ ms})$	$\tau_{\text{Azurite}} (\pm 0,1 \text{ ns})$
Eu	0,71	-
Eu-Az1	0,76	3,6
Eu-Az2	0,76	3,8
Eu-Az3	0,76	3,8
Eu-Az4	0,77	3,8
Az	-	3,9

Como a banda larga de emissão da Azurite ($\lambda_{\text{máx}}=450 \text{ nm}$) sobrepõe as bandas finas relativas às transições $^7\text{F}_0 \rightarrow ^5\text{L}_6$ (395 nm) e $^7\text{F}_0 \rightarrow ^5\text{D}_2$ (466 nm) do Eu^{3+} , o aumento do τ_{Eu} indica a transferência de energia da proteína para as Eu-NPs, onde a Azurite atua como doador e o Eu^{3+} como receptor. Além disso, o aumento na intensidade da banda de excitação pode ser relacionado com o aumento da eficiência da transferência de energia devido à maior quantidade de proteínas na vizinhança do Eu^{3+} (LIMA et al., 2016). Para os bioconjugados obtidos com a proteína EGFP, foram observados resultados semelhantes (Figura 27).

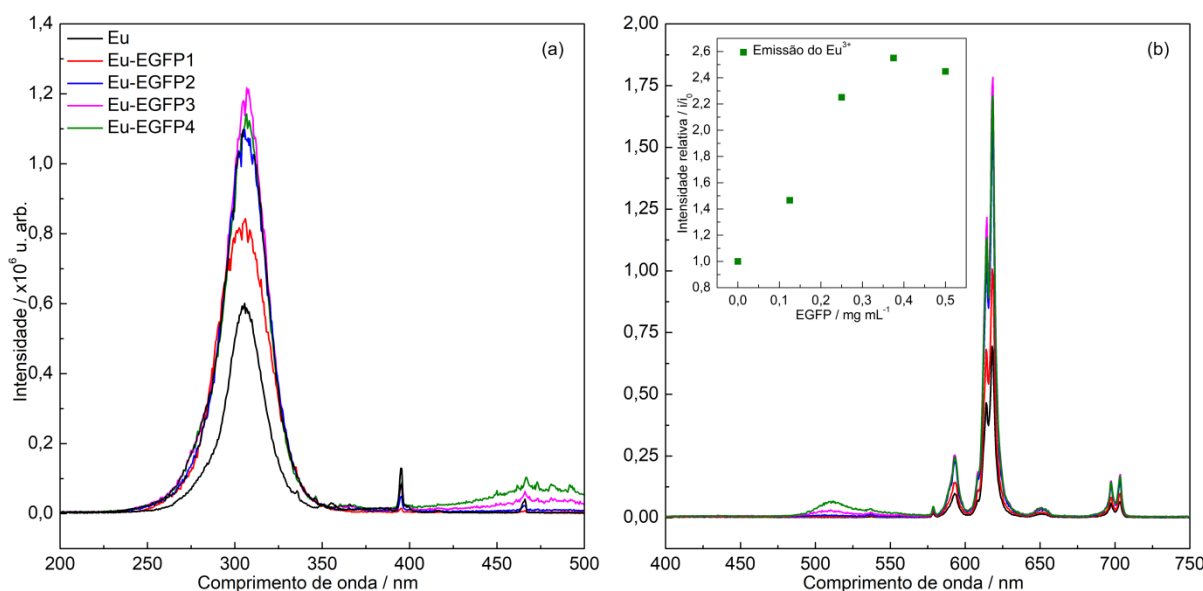


Figura 27 - Espectros de excitação monitorando a emissão em 618 nm (a) e de emissão sob excitação em 307 nm (b) das nanopartículas de Eu^{3+} e de seus conjugados com a proteína EGFP. O quadro em b mostra a intensidade relativa da emissão do Eu^{3+} (intensidade integrada da transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$) em função da concentração de EGFP.

As Eu-NPs contendo a proteína EGFP também apresentam as bandas características do Eu^{3+} , além do aparecimento de uma banda larga na região de 510 nm, relativa à emissão da EGFP. O aumento da intensidade de emissão em 618 nm ($^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$) também pode ser

observado, com um aumento máximo da intensidade relativa de 2,5 vezes. As medidas de tempo de vida também sugerem a transferência de energia da proteína para as Eu-NPs (Tabela 11).

Tabela 11 - Tempo de vida de emissão dos bioconjugados obtidos com a proteína EGFP. O tempo de vida do Eu^{3+} (τ_{Eu}) foi determinado com excitação em 307 nm e monitorando sua emissão em 618 nm enquanto o tempo de vida da Azurite (τ_{EGFP}) foi determinado com excitação em 290 nm e monitorando sua emissão em 510 nm.

Amostra	$\tau_{\text{Eu}} (\pm 0,01 \text{ ms})$	$\tau_{\text{EGFP}} (\pm 0,1 \text{ ns})$
Eu	0,71	-
Eu-EGFP1	0,74	3,2
Eu-EGFP2	0,74	3,4
Eu-EGFP3	0,74	3,4
Eu-EGFP4	0,75	3,7
EGFP	-	3,3

No caso da EGFP, a sobreposição entre a emissão da proteína com a absorção do Eu^{3+} é mínima, o que não atende um dos requisitos básicos para a ocorrência de FRET (CLEGG, 1995). Além disso, a emissão em FPs e Ln^{3+} se dão por processos distintos, pois a emissão dos Ln^{3+} provém de transições de alto spin (4f-4f) e não pode ser descrita como a fluorescência observada nas FPs, que é proveniente de transições singlete-singlete (SELVIN, 1996). Isso sugere que os bioconjugados FPs/Eu-NPs seguem um mecanismo de transferência de energia distinto, pois não atendem estritamente a teoria de Förster que explica os mecanismos de transferência de energia em FRET (SOUZA; SIGOLI, 2012). Assim, a transferência de energia observada pode ser atribuída aos processos de FRET não sobreposicional (nFRET), onde a presença dos aminoácidos aromáticos nas proteínas utilizadas ajudam na sensibilização da emissão do Eu^{3+} mesmo sem sobreposição eficiente entre os espectros do doador e receptor (VUOJOLA; LAMMINMÄKI; SOUKKA, 2009; LIMA et al., 2016).

As amostras obtidas com as proteínas mTangerine e mCherry foram utilizadas porque suas bandas de emissão não apresentam nenhuma sobreposição espectral com as absorções do Eu^{3+} , mas ainda assim apresentam resíduos de tirosina, triptofano e fenilalanina que podem contribuir para a sensibilização do Eu^{3+} . Os espectros de emissão e excitação dos bioconjugados mTangerine/Eu-NPs são apresentados na Figura 28.

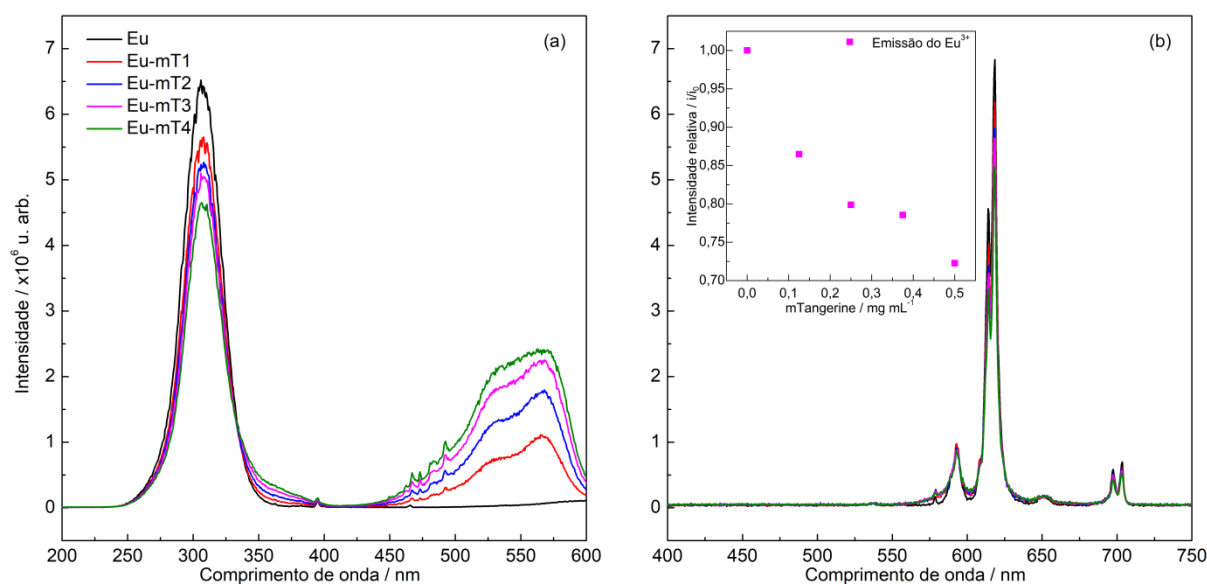


Figura 28 - Espectros de excitação monitorando a emissão em 618 nm (a) e de emissão sob excitação em 307 nm (b) das nanopartículas de Eu^{3+} e de seus conjugados com a proteína mTangerine. O quadro em b mostra a intensidade relativa da emissão do Eu^{3+} (intensidade integrada da transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$) em função da concentração de mTangerine.

Para os bioconjugados mTangerine/Eu-NPs são observadas todas as bandas características das transições $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_{J=0-4}$ do Eu^{3+} na região entre 530 e 710 nm. A emissão da proteína na região de 585 nm se apresenta sobreposta à emissão das Eu-NPs, causando a alteração da linha base do espectro na região de 560 à 600 nm. Diferente do esperado, observa-se a diminuição da intensidade relativa da emissão do Eu^{3+} em 618 nm após a bioconjugação. Esse efeito pode ser atribuído à proximidade entre o estado excitado da proteína (17.094 cm^{-1}) e o nível $^5\text{D}_0$ emissor do Eu^{3+} (17.227 cm^{-1}), onde ocorre a retro transferência de energia, o que implica na diminuição do tempo de vida de emissão tanto do Eu^{3+} quanto da mTangerine (Tabela 12).

Tabela 12 - Tempo de vida de emissão dos bioconjugados obtidos com a proteína mTangerine. O tempo de vida do Eu^{3+} (τ_{Eu}) foi determinado com excitação em 307 nm e monitorando sua emissão em 618 nm enquanto o tempo de vida da mTangerine ($\tau_{\text{mTangerine}}$) foi determinado com excitação em 290 nm e monitorando sua emissão em 585 nm.

Amostra	$\tau_{\text{Eu}} (\pm 0,01 \text{ ms})$	$\tau_{\text{mTangerine}} (\pm 0,1 \text{ ns})$
Eu	0,71	-
Eu-mT1	0,65	0,7
Eu-mT2	0,54	0,8
Eu-mT3	0,40	0,9
Eu-mT4	0,32	0,9
mT	-	1,9

O mesmo efeito foi observado para os bioconjugados mCherry/Eu-NPs, onde a diminuição da emissão do Eu^{3+} é ainda mais pronunciada. Como o estado excitado da mCherry (16.393 cm^{-1}) se encontra abaixo do nível emissor do Eu^{3+} (17.227 cm^{-1}), o processo de retro transferência de energia é ainda mais favorecido, impactando também nos tempos de vida de emissão observados tanto para o Eu^{3+} quanto para a mCherry (Tabela 13). Nesse caso, a sobreposição da emissão da proteína com a emissão das Eu-NPs aparece como a alteração da linha base na região entre 580 e 690 nm nos espectros de emissão da Figura 29.

Tabela 13 - Tempo de vida de emissão dos bioconjugados obtidos com a proteína mCherry. O tempo de vida do Eu^{3+} (τ_{Eu}) foi determinado com excitação em 307 nm e monitorando sua emissão em 618 nm enquanto o tempo de vida da mTangerine (τ_{mCherry}) foi determinado com excitação em 290 nm e monitorando sua emissão em 610 nm.

Amostra	$\tau_{\text{Eu}} (\pm 0,01 \text{ ns})$	$\tau_{\text{mCherry}} (\pm 0,1 \text{ ns})$
Eu	0,71	-
Eu-mC1	0,24	1,2
Eu-mC2	0,26	1,6
Eu-mC3	0,30	1,6
Eu-mC4	0,32	1,7
mC	-	1,8

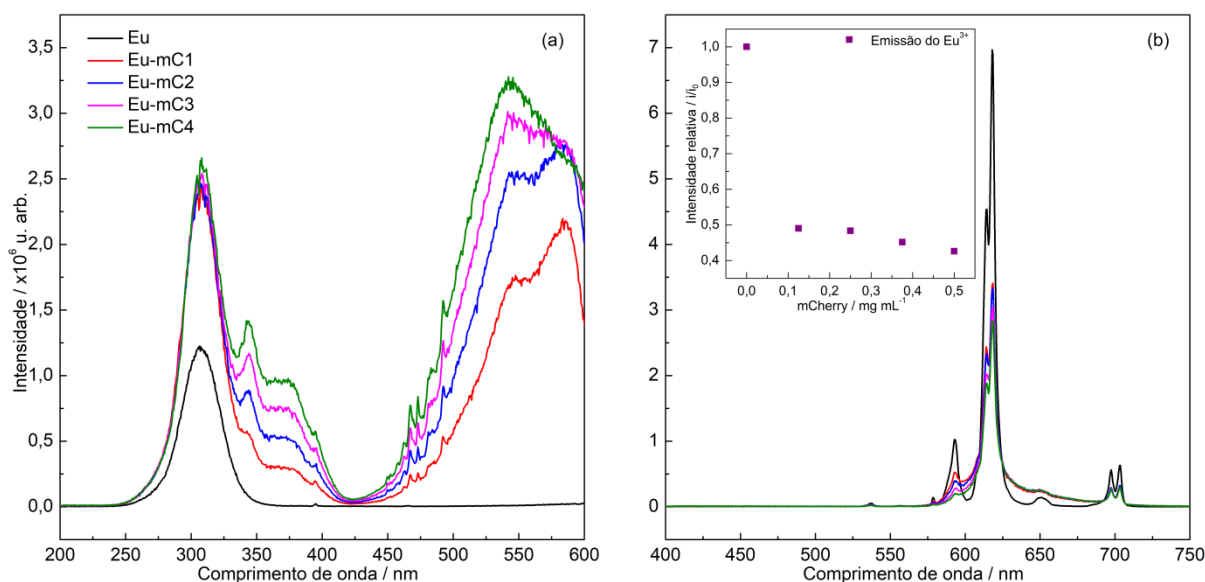


Figura 29 - Espectros de excitação monitorando a emissão em 618 nm (a) e de emissão sob excitação em 307 nm (b) das nanopartículas de Eu^{3+} e de seus conjugados com a proteína mCherry. O quadro em b mostra a intensidade relativa da emissão do Eu^{3+} (intensidade integrada da transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$) em função da concentração de mCherry.

Para os bioconjugados obtidos com as FPs Azurite e EGFP, o aumento da emissão das Eu-NPs em 618 nm pode ser atribuído apenas à transferência de energia das proteínas para o Eu^{3+} , pois não há emissão das proteínas nessa região. Essa hipótese é ainda corroborada pelo

aumento do tempo de vida de emissão do Eu^{3+} após a bioconjugação, pois o tempo de vida de emissão das proteínas é de aproximadamente 3-4 ns, que é 5 ordens de grandeza menor que o aumento do tempo de vida observado para o Eu^{3+} , de modo que o aumento observado não pode ser atribuído à emissão das proteínas (VUOJOLA; LAMMINMÄKI; SOUKKA, 2009).

A mesma abordagem pode ser adotada para explicar os resultados obtidos para os bioconjugados com as proteínas mTangerine e mCherry, pois ainda que haja a sobreposição espectral entre a emissão das proteínas e a emissão das Eu-NPs em 618 nm, não houve nenhum indício de transferência de energia das proteínas para as nanopartículas. Nesse caso, a proximidade dos níveis emissores das proteínas mTangerine e mCherry com o nível $^5\text{D}_0$ do Eu^{3+} favorece o processo de retro transferência de energia, como indicado pela diminuição da intensidade e do tempo de vida de emissão do Eu^{3+} após a bioconjugação com essas proteínas. Assim, um diagrama simplificado dos níveis de energia do íon Eu^{3+} pode ser utilizado para descrever os mecanismos de transferência e de retro transferência de energia envolvidos nos bioconjugados obtidos (Figura 30).

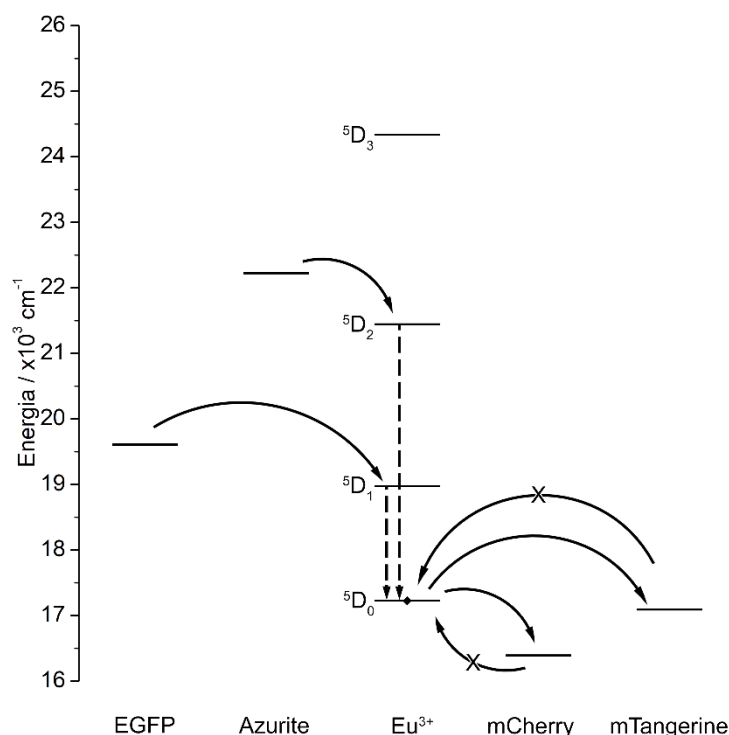


Figura 30 - Esquema representativo do diagrama de níveis de energia do íon Eu^{3+} e das FPs utilizadas. Como os níveis de energia das proteínas não são tão bem definidos quanto os dos íons lantanídeos, eles são apresentados como o máximo de sua emissão apenas para propósito de comparação. O nível emissor $^5\text{D}_0$ do Eu^{3+} está destacado com um losango.

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho, novos bioconjugados contendo nanopartículas de Eu^{3+} e diferentes proteínas fluorescentes foram desenvolvidos, demonstrando a viabilidade da sensibilização de emissão do Eu^{3+} por FPs em solução.

As Eu-NPs utilizadas foram obtidas pela dopagem do ortovanadato de ítrio com európio ($\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$) pelo método de coprecipitação. Apesar de apresentar fases cristalinas distintas, o precursor metavanadato de sódio foi empregado no preparo do ortovanadato de sódio, posteriormente utilizado na síntese das Eu-NPs em condições reacionais brandas. As nanopartículas foram obtidas com diâmetro médio de 44,15 nm e o estabilizante citrato foi utilizado como sítio de reação para a inserção da 2-maleimidoetilamina pelo acoplamento carbodiimida EDC/Sulfo-NHS para posterior bioconjugação com diferentes proteínas fluorescentes. Sob excitação na região do UV, as Eu-NPs apresentaram intensa emissão na região vermelha, característica da transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ do Eu^{3+} em 618 nm.

Os plasmídeos pQE-9/Azurite e pQE-9/mTangerine foram construídos pela inserção dos genes de codificação das proteínas Azurite e mTangerine no vetor de expressão pQE-9 e, após modificação genética para inserção de resíduos de cisteína, foram expressas em linhagens de *E. coli* apropriadas. As proteínas EGFP e mCherry também foram expressas, seguidas de purificação por IMAC juntamente com as proteínas Azurite e mTangerine. Após a purificação, o rendimento médio de expressão obtido foi de 90 mg L^{-1} e as 4 proteínas expressas foram utilizadas para a bioconjugação com as Eu-NPs funcionalizadas com o grupo maleimida pela reação *click* tiol-maleimida.

Os estudos de transferência de energia mostraram que as proteínas Azurite e EGFP, que apresentam maior fotoestabilidade entre o conjunto de FPs utilizadas, podem ser empregadas na sensibilização de emissão do Eu^{3+} . Aumentos de emissão de 4,3 e 2,5 foram observados após a bioconjugação das Eu-NPs com as FPs Azurite e EGFP, respectivamente. Assim, a associação de nanopartículas de íons lantanídeos com proteínas fluorescentes, nunca antes reportada, se mostra como uma nova abordagem para o aumento da eficiência do uso de Ln^{3+} em solução aquosa para aplicações de bioimagem e em biosensores.

A abordagem desenvolvida neste trabalho se mostra útil para a marcação de células e o estudo de dinâmicas moleculares através de microscopia por imageamento de tempo de vida de fluorescência (FLIM, do inglês *fluorescence-lifetime imaging microscopy*) devido à grande diferença no tempo de vida de emissão das FPs e Eu-NPs utilizadas. Além disso, as bandas

finas de emissão do Eu^{3+} podem ser identificadas em meio biológico que apresenta fluorescência de fundo.

O emprego dos bioconjugados obtidos ainda se mostra limitado devido aos riscos de fotodegradação das FPs ocasionados pela excitação na região do UV, tornando a excitação via dois fótons uma das perspectivas mais promissoras desse trabalho. A visualização de FPs em células tumorais por excitação via dois fótons na região do NIR já foi demonstrada (SPIESS et al., 2005), abrindo a possibilidade de se utilizar essa mesma abordagem para os bioconjugados preparados. Além de reduzir os efeitos de fotodegradação, o uso de luz NIR ainda possibilita uma maior profundidade de penetração em tecidos vivos.

REFERÊNCIAS

- AGBO, P.; ABERGEL, R. J. Ligand-Sensitized Lanthanide Nanocrystals: Merging Solid-State Photophysics and Molecular Solution Chemistry. **Inorganic Chemistry**, v. 55, n. 20, p. 9973-9980, Oct. 2016.
- AMANTEA, R.; GHIGNA, P.; MUSTARELLI, P.; TARTARA, V. Synthesis, 89Y and 51V-NMR of Er-Doped Zircon-Type YVO₄ and LuVO₄. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 178, n. 5, p. 1692-1696, May 2005.
- AMOUREUX, J.-P.; FERNANDEZ, C.; STEUERNAGEL, S. Z Filtering in MQMAS NMR. **Journal of Magnetic Resonance**, v. A123, n. 1, p. 116-118, Nov. 1996.
- ANTON, B. P.; RALEIGH, E. A. Complete Genome Sequence of NEB 5-Alpha, a Derivative of Escherichia Coli K-12 DH5 α . **Genome Announcements**, v. 4, n. 6, p. e01245-16, Nov. 2016.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: Wiley Interscience, 1987.
- BAGLIO, J. A.; GASHUROV, G. A Refinement of the Crystal Structure of Yttrium Vanadate. **Acta Crystallographica**, v. B24, n. 2, p. 292-293, 1968.
- BAGLIO, J. A.; SOVERS, O. J. Crystal Structures of the Rare-Earth Orthovanadates. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 458-465, Aug. 1971.
- BALDO, M. A.; THOMPSON, M. E.; FORREST, S. R. High-Efficiency Fluorescent Organic Light-Emitting Devices Using a Phosphorescent Sensitizer. **Nature**, v. 403, n. 6771, p. 750-753, Feb. 2000.
- BARKER, M. G.; HOOPER, A. J. Preparation and X-Ray Powder Diffraction Patterns of the Sodium Vanadates NaVO₃, Na₄V₂O₇, and Na₃VO₄. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, v. 0, n. 15, p. 1513, 1973.
- BERTANI, G. STUDIES ON LYSOGENESIS I.: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic Escherichia Coli. **Journal of Bacteriology**, v. 62, n. 3, p. 293-300, Sept. 1951.
- BINNEMANS, K. Interpretation of Europium(III) Spectra. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 295, p. 1-45, July 2015.
- BLASSE, G.; BRIL, A. Characteristic Luminescence. **Philips Technical Review**, v. 31, n. 10, p. 304, 1970.
- BLASSE, G.; GRABMAIER, B. C. **Luminescent Materials**. Berlin: Springer-Verlag, 1994.
- BORNHORST, J. A.; FALKE, J. J. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. **Methods in Enzymology**, v. 326, p. 245-254, Sept. 2000.

BROUSSARD, J. A.; RAPPAZ, B.; WEBB, D. J.; BROWN, C. M. Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy as Demonstrated by Measuring the Activation of the Serine/Threonine Kinase Akt. **Nature Protocols**, v. 8, n. 2, p. 265-281, Dec. 2013.

BUJARD, H.; GENTZ, R.; LANZER, M.; STUEBER, D.; MUELLER, M.; IBRAHIMI, I.; HAEUPTLE, M.-T.; DOBBERSTEIN, B. A T5 Promoter-Based Transcription-Translation System for the Analysis of Proteins in Vitro and in Vivo. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 416-433, 1987.

BÜNZLI, J.-C. G. Benefiting from the Unique Properties of Lanthanide Ions. **Accounts of Chemical Research**, v. 39, n. 1, p. 53-61, Jan. 2006.

BÜNZLI, J.-C. G. Lanthanide Light for Biology and Medical Diagnosis. **Journal of Luminescence**, v. 170, p. 866-878, Feb. 2016.

CARLOS, L. D.; FERREIRA, R. A. S. S.; DE ZEA BERMUDEZ, V.; RIBEIRO, S. J. L. L.; BERMUDEZ, V. de Z.; RIBEIRO, S. J. L. L. Lanthanide-Containing Light-Emitting Organic-Inorganic Hybrids: A Bet on the Future. **Advanced Materials**, v. 21, n. 5, p. 509-534, Feb. 2009.

CLEGG, R. M. Fluorescence Resonance Energy Transfer. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 103-110, 1995.

CORMACK, B. P.; VALDIVIA, R. H.; FALKOW, S. FACS-Optimized Mutants of the Green Fluorescent Protein (GFP). **Gene**, v. 173, n. 1, p. 33-38, Jan. 1996.

CROWE, J.; DÖBELI, H.; GENTZ, R.; HOCHULI, E.; STÜBER, D.; HENCO, K. 6xHis-Ni-NTA Chromatography as a Superior Technique in Recombinant Protein Expressiod/Purification. In: HARWOOD, A. J. (Ed.). **Protocols for Gene Analysis**. Totowa: Humana Press, 1994. chap. 31, p. 371-388.

CUATRECASAS, P. Protein Purification by Affinity Chromatography. Derivatizations of Agarose and Polyacrylamide Beads. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 245, n. 12, p. 3059-3065, June 1970.

DAY, R. N.; DAVIDSON, M. W. The Fluorescent Protein Palette: Tools for Cellular Imaging. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 10, p. 2887, Oct. 2009.

DONG, H.; DU, S. R.; ZHENG, X. Y.; LYU, G. M.; SUN, L. D.; LI, L. D.; ZHANG, P. Z.; ZHANG, C.; YAN, C. H. Lanthanide Nanoparticles: From Design toward Bioimaging and Therapy. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 19, p. 10725-10815, Oct. 2015.

ECKERT, H.; WACJS, I. E. 51V NMR: A New Probe of Structure and Bonding in Catalysts. **MRS Proceedings**, v. 111, p. 459-464, Jan. 1987.

FROST, R. L.; ERICKSON, K. L.; WEIER, M. L.; CARMODY, O. Raman and Infrared Spectroscopy of Selected Vanadates. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 61, n. 5, p. 829-834, Mar. 2005.

GABERC-POREKAR, V.; MENART, V. Perspectives of Immobilized-Metal Affinity Chromatography. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, n. 1-3, p. 335-360, Oct. 2001.

GABERC-POREKAR, V.; MENART, V. Potential for Using Histidine Tags in Purification of Proteins at Large Scale. **Chemical Engineering & Technology**, v. 28, n. 11, p. 1306-1314, Nov. 2005.

GALLEANI, G.; SANTAGNELI, S. H.; LEDEMI, Y.; MESSADDEQ, Y.; JANKA, O.; PÖTTGEN, R.; ECKERT, H. Ultraviolet Upconversion Luminescence in a Highly Transparent Triply-Doped Gd^{3+} - Tm^{3+} - Yb^{3+} Fluoride-Phosphate Glasses. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 122, n. 4, p. 2275-2284, Feb. 2018.

GEISLER, D.; LINDEN, S.; LIERMANN, K.; WEGNER, K. D.; CHARBONNIERE, L. J.; HILDEBRANDT, N. Lanthanides and Quantum Dots as Forster Resonance Energy Transfer Agents for Diagnostics and Cellular Imaging. **Inorganic Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1824-1838, Feb. 2014.

GIAUME, D.; BUISSETTE, V.; LAHLIL, K.; GACON, T.; BOILOT, J. P.; CASANOVA, D.; BEAUREPAIRE, E.; SAUVIAT, M. P.; ALEXANDROU, A. Emission Properties and Applications of Nanostructured Luminescent Oxide Nanoparticles. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 33, n. 2-4, p. 99-106, 2005.

GONZÁLEZ-VERA, J. A.; BOUZADA, D.; BOUCLIER, C.; EUGENIO VÁZQUEZ, M.; MORRIS, M. C. Lanthanide-Based Peptide Biosensor to Monitor CDK4/Cyclin D Kinase Activity. **Chemical Communications**, v. 53, n. 45, p. 6109-6112, June 2017.

GOTTESMAN, S.; HALPERN, E.; TRISLER, P. Role of SulA and SulB in Filamentation by Lon Mutants of Escherichia Coli K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 148, n. 1, p. 265-273, Oct. 1981.

HAMILTON, J. C.; NAGELBERG, A. S. In Situ Raman Spectroscopic Study of Yttria-Stabilized Zirconia Attack by Molten Sodium Vanadate. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 67, n. 10, p. 686-690, 1984.

HEFFERN, M. C.; MATOSZIUK, L. M.; MEADE, T. J. Lanthanide Probes for Bioresponsive Imaging. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p. 4496-4539, Apr. 2014.

HOYLE, C. E.; BOWMAN, C. N. Thiol-Ene Click Chemistry. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 9, p. 1540-1573, Feb. 2010.

HUIGNARD, A.; BUISSETTE, V.; FRANVILLE, A.; GACON, T.; BOILOT, J.-P. Emission Processes in $YVO_4:Eu$ Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 28, p. 6754-6759, July 2003.

KATO, V. K.; TAKAYAMA, E. Das Entwässerungsverhalten Des Natriummetavanadatdihydrats Und Die Kristallstruktur Des β -Natriummetavanadats. **Acta Crystallographica**, v. B40, n. 2, p. 102-105, 1984.

KHAN, S.; ULLAH, M. W.; SIDDIQUE, R.; NABI, G.; MANAN, S.; YOUSAF, M.; HOU, H. Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. **International Journal of Genomics**, v. 2016, p. 2405954, 2016.

KHRENOVA, M.; TOPOL, I.; COLLINS, J.; NEMUKHIN, A. Estimating Orientation Factors in the FRET Theory of Fluorescent Proteins: The TagRFP-KFP Pair and Beyond. **Biophysical Journal**, v. 108, n. 1, p. 126-132, Jan. 2015.

KREMERS, G.-J.; GILBERT, S. G.; CRANFILL, P. J.; DAVIDSON, M. W.; PISTON, D. W. Fluorescent Proteins at a Glance. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 2, p. 157-160, 15 Jan. 2011.

LAITALA, V.; HEMMILÄ, I. Homogeneous Assay Based on Anti-Stokes' Shift Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy-Transfer Measurement. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 5, p. 1483-1487, Mar. 2005.

LAKOWICZ, J. R. Introduction to Fluorescence. **Principles of fluorescence spectroscopy**, p. 1-23, 1999.

LAPINA, O. B.; MASTIKHIN, V. M.; SHUBIN, A. A.; KRASILNIKOV, V. N.; ZAMARAEV, K. I. 51V Solid State NMR Studies of Vanadia Based Catalysts. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 24, n. 6, p. 457-525, Jan. 1992.

LEVINE, A. K.; PALILLA, F. C. A New, Highly Efficient Red-emitting Cathodoluminescent Phosphor (YVO₄:Eu) for Color Television. **Applied Physics Letters**, v. 5, n. 6, p. 118-120, 1964.

LI, C.-Z.; YANG, W.-H.; CHANG, Y.-C. Raman Scattering Study of Calcium Orthovanadate Crystal. **Japanese Journal of Applied Physics**, v. 24, n. 24-2, p. 508-509, 1985.

LIMA, L. R.; MORAES, M. L.; NIGOGHOSSIAN, K.; PERES, M. F. S. S.; RIBEIRO, S. J. L. L. Silk Fibroin-Antigenic Peptides-YVO₄:Eu³⁺+nanostructured Thin Films as Sensors for Hepatitis C. **Journal of Luminescence**, v. 170, n. SI: Lanthanide spectroscopy, p. 375-379, Feb. 2016.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M. P.; ZIPURSKY, S. L.; DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**. 5th. ed. New York: W.H. Freeman and Co., 2003.

LUKÁCS, I.; STRUSIEVICI, C. Über Die Polymorphie von Natriummetavanadat. **Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie**, v. 315, n. 5-6, p. 323-326, 1962.

MARUMO, F.; ISOBE, M.; IWAI, S. I.; KONDŌ, Y. α -Form of Sodium Metavanadate. **Acta Crystallographica**, v. B30, n. 6, p. 1628-1630, 1974.

MASSIOT, D.; FAYON, F.; CAPRON, M.; KING, I.; LE CALVÉ, S.; ALONSO, B.; DURAND, J.-O.; BUJOLI, B.; GAN, Z.; HOATSON, G. Modelling One- and Two-dimensional Solid-state NMR Spectra. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 70-76, Jan. 2002.

MCKEEVER, S. W. S. **Thermoluminescence of Solids**. Cambridge: Cambridge University Press, 1985.

MEDEK, A.; HARWOOD, J. S.; FRYDMAN, L. Multiple-Quantum Magic-Angle Spinning NMR: A New Method for the Study of Quadrupolar Nuclei in Solids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 51, p. 12779-12787, Dec. 1995.

MENA, M. A.; TREYNOR, T. P.; MAYO, S. L.; DAUGHERTY, P. S. Blue Fluorescent Proteins with Enhanced Brightness and Photostability from a Structurally Targeted Library. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1569-1571, Dec. 2006.

MOORE, E. G.; SAMUEL, A. P. S.; RAYMOND, K. N.; MOORE, E. G.; SAMUEL, A. P. S.; RAYMOND, K. N. From Antenna to Assay: Lessons Learned in Lanthanide Luminescence. **Accounts of Chemical Research**, v. 42, n. 4, p. 542-552, Apr. 2009.

MORISE, H.; SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F. H. Intermolecular Energy Transfer in the Bioluminescent System of Aequorea. **Biochemistry**, v. 13, n. 12, p. 2656-2662, 1974.

MORRIS, M. C.; MCMURDIE, H. F.; EVANS, E. H.; PARETZKIN, B.; PARKER, H. S.; PANAGIOTOPOULOS, N. C.; HUBBARD, C. R. Standar X-ray Diffraction Powder Patterns. In: **National Bureau of Standards Monograph**. Washington: NBS Publications, 1981. p. 105.

MURTHY, K. V. R.; VIRK, H. S. Luminescence Phenomena: An Introduction. **Defect and Diffusion Forum**, v. 347, p. 1-34, 2014.

NIYAMA, E.; ALENCAR, A. C.; VILA, L. D.; STUCCHI, E. B.; DAVOLOS, M. R. Filmes Delgados Luminescentes Obtidos a Partir de Hidroxicarbonatos de Ítrio Ativados Por Európio Ou Térbio. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 183-187, abr. 2004.

NORTHROP, B. H.; FRAYNE, S. H.; CHOUDHARY, U. Thiol–maleimide “Click” Chemistry: Evaluating the Influence of Solvent, Initiator, and Thiol on the Reaction Mechanism, Kinetics, and Selectivity. **Polym. Chem.**, v. 6, n. 18, p. 3415-3430, May 2015.

ORMÖ, M.; CUBITT, A. B.; KALLIO, K.; GROSS, L. A.; TSIEN, R. Y.; REMINGTON, S. J. Crystal Structure of the Aequorea Victoria Green Fluorescent Protein. **Science**, v. 273, n. 5280, p. 1392-1395, Sept. 1996.

PATTERSON, G.; DAY, R. N.; PISTON, D. Fluorescent Protein Spectra. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 5, p. 837-838, Mar. 2001.

PISTON, D. W.; KREMERS, G.-J. Fluorescent Protein FRET: The Good, the Bad and the Ugly. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 9, p. 407-414, Sep. 2007.

POWELL, R. C.; BLASSE, G. Energy transfer in concentrated systems. In: **Luminescence and Energy Transfer**. New York: Springer-Verlag, 1980.

PRAY, L. A. Restriction Enzymes. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 38, 2008.

QIAGEN. **The QIAexpressionist™**. 5th. ed. Hilden: Qiagen, 2003.

RAJENDRAN, M.; YAPICI, E.; MILLER, L. W. Lanthanide-Based Imaging of Protein-Protein Interactions in Live Cells. **Inorganic Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1839-1853, Feb. 2014.

RIWOTZKI, K.; HAASE, M. Wet-Chemical Synthesis of Doped Colloidal Nanoparticles: YVO₄:Ln (Ln = Eu, Sm, Dy). **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 50, p. 10129-10135, Dec. 1998.

ROWLAND, C. E.; BROWN, C. W.; MEDINTZ, I. L.; DELEHANTY, J. B. Intracellular FRET-Based Probes: A Review. **Methods and Applications in Fluorescence**, v. 3, n. 4, p. 042006, Dec. 2015.

ROYANT, A.; NOIRCLERC-SAVOYE, M. Stabilizing Role of Glutamic Acid 222 in the Structure of Enhanced Green Fluorescent Protein. **Journal of Structural Biology**, v. 174, n. 2, p. 385-390, May 2011.

SEETHARAMAN, S.; BHAT, H. L.; NARAYANAN, P. S. Raman Spectroscopic Studies on Sodium Metavanadate. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 14, n. 6, p. 401--405, 1983.

SEKAR, R. B.; PERIASAMY, A. Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy Imaging of Live Cell Protein Localizations. **Journal of Cell Biology**, v. 160, n. 5, p. 629-633, Mar. 2003.

SELVIN, P. R. Lanthanide-Based Resonance Energy Transfer. **Selected Topics in Quantum Electronics, IEEE**, v. 2, n. 4, p. 1077-1087, 1996.

SHANER, N. C. The mFruit Collection of Monomeric Fluorescent Proteins. **Clinical Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 440-441, Feb. 2013.

SHANER, N. C.; CAMPBELL, R. E.; STEINBACH, P. A.; GIEPMANS, B. N. G.; PALMER, A. E.; TSIEN, R. Y. Improved Monomeric Red, Orange and Yellow Fluorescent Proteins Derived from *Discosoma* Sp. Red Fluorescent Protein. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1567-1572, Dec. 2004.

SHANER, N. C.; LIN, M. Z.; MCKEOWN, M. R.; STEINBACH, P. A.; HAZELWOOD, K. L.; DAVIDSON, M. W.; TSIEN, R. Y. Improving the Photostability of Bright Monomeric Orange and Red Fluorescent Proteins. **Nature Methods**, v. 5, n. 6, p. 545-551, June 2008.

SHANER, N. C.; STEINBACH, P. A.; TSIEN, R. Y. A Guide to Choosing Fluorescent Proteins. **Nature Methods**, v. 2, n. 12, p. 905-909, Dec. 2005.

SHAO, B.; ZHAO, Q.; GUO, N.; JIA, Y.; LV, W.; JIAO, M.; LÜ, W.; YOU, H. Monodisperse YVO₄:Eu³⁺ Submicrocrystals: Controlled Synthesis and Luminescence Properties. **CrystEngComm**, v. 15, n. 29, p. 5776-5783, Aug. 2013.

SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F. H.; SAIGA, Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 59, n. 3, p. 223-239, Jun. 1962.

SKIBSTED, J.; NIELSEN, N. C.; BILDSØE, H.; JAKOBSEN, H. J. Magnitudes and Relative Orientation of ^{51}V Quadrupole Coupling and Anisotropic Shielding Tensors in Metavanadates and KV_3O_8 from ^{51}V MAS NMR Spectra. ^{23}Na Quadrupole Coupling Parameters for α - and β - NaVO_3 . **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 16, p. 7351-7362, Aug. 1993.

SOUZA, E. R.; SIGOLI, F. A. Princípios Fundamentais e Modelos de Transferência de Energia Inter e Intramolecular. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1841-1847, 2012.

SPIESS, E.; BESTVATER, F.; HECKEL-POMPEY, A.; TOTH, K.; HACKER, M.; STOBRAWA, G.; FEURER, T.; WOTZLAW, C.; BERCHNER-PFANNSCHMIDT, U.; PORWOL, T.; ACKER, H. Two-photon Excitation and Emission Spectra of the Green Fluorescent Protein Variants ECFP, EGFP and EYFP. **Journal of Microscopy**, v. 217, n. 3, p. 200-204, Mar. 2005.

SYAMCHAND, S. S.; SONY, G. Europium Enabled Luminescent Nanoparticles for Biomedical Applications. **Journal of Luminescence**, v. 165, p. 190-215, Sep. 2015.

TEALE, F. W. J.; WEBER, G. Ultraviolet Fluorescence of the Aromatic Amino Acids. **Biochemical Journal**, v. 65, n. 3, p. 476-482, 1957.

TEO, R. D.; TERMINI, J.; GRAY, H. B. Lanthanides: Applications in Cancer Diagnosis and Therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 13, p. 6012-6024, July 2016.

THOMAS, C. S.; XU, L.; OLSEN, B. D. Kinetically Controlled Nanostructure Formation in Self-Assembled Globular Protein–Polymer Diblock Copolymers. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 9, p. 2781-2792, Sept. 2012.

TSIEN, R. Y. The Green Fluorescent Protein. **Annual Review of Biochemical Chemistry**, v. 67, p. 509-544, 1998.

UITERT, L. G. Van; LINARES, R. C.; SODEN, R. R.; BALLMAN, A. A. Role of F-Orbital Electron Wave Function Mixing in the Concentration Quenching of Eu^{3+} . **Journal of Chemical Physics**, v. 36, n. 3, p. 702-705, 1962.

VUOJOLA, J.; LAMMINMÄKI, U.; SOUKKA, T. Resonance Energy Transfer from Lanthanide Chelates to Overlapping and Nonoverlapping Fluorescent Protein Acceptors. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 12, p. 5033-5038, June 2009.

WEBER, M. J. Lanthanide and Actinide Lasers. In: EDELSTEIN, N. M. (Ed.). **Lanthanide and Actinide Chemistry and Spectroscopy**. Washington: ACS Symposium Series, 1980. p. 275-311.

YANG, J.; SANDOVAL, S.; ALFARO, J. G.; ASCHEMEYER, S.; LIBERMAN, A.; MARTIN, D. T.; MAKALE, M.; KUMMEL, A. C.; TROGLER, W. C. Red-Luminescent Europium (III) Doped Silica Nanoshells: Synthesis, Characterization, and Their Interaction with HeLa Cells. **Journal of Biomedical Optics**, v. 16, n. 6, p. 066012, June 2011.

YANG, X.; LIN, X.; ZHAO, Y.; ZHAO, Y. S.; YAN, D. Lanthanide Metal–Organic Framework Microrods: Colored Optical Waveguides and Chiral Polarized Emission. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 56, n. 27, p. 7853-7857, June 2017.

YOUNG, C. L.; BRITTON, Z. T.; ROBINSON, A. S. Recombinant Protein Expression and Purification : A Comprehensive Review of Affinity Tags and Microbial Applications. **Biotechnology Journal**, v. 7, n. 5, p. 620-634, May 2012.

ZHANG, J.; CAMPBELL, R. E.; TING, A. Y.; TSIEN, R. Y. Creating New Fluorescent Probes for Cell Biology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 12, p. 906-918, Dec. 2002.