

João Paulo Gelamos

Desenvolvimento e aperfeiçoamento de protocolos de
conjugação de nanomarcadores luminescentes com sistemas
biológicos para aplicação em imunoensaios

São José do Rio Preto
2011

João Paulo Gelamos

Desenvolvimento e aperfeiçoamento de protocolos de
conjugação de nanomarcadores luminescentes com sistemas
biológicos para aplicação em imunoenaios

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração – Química Ambiental, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Pires

São José do Rio Preto
2011

Gelamos, João Paulo.

Desenvolvimento e aperfeiçoamento de protocolos de conjugação de nanomarcadores luminescentes com sistemas biológicos para aplicação em imunoensaios / João Paulo Gelamos.
- São José do Rio Preto: [s.n.], 2011.

91 f. : il.; 30 cm.

Orientador: Ana Maria Pires

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Química inorgânica. 2. Nanotecnologia. 3. Marcadores biológicos. 4. Espectroscopia de luminescência. 5. Imunoensaio. I. Pires, Ana Maria. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 543.42

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

João Paulo Gelamos

Desenvolvimento e aperfeiçoamento de protocolos de
conjugação de nanomarcadores luminescentes com sistemas
biológicos para aplicação em imunoenaios

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Química, junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Química, Área de Concentração –
Química Ambiental, do Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas
da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Pires
FCT-UNESP – Presidente Prudente
Orientador

Prof. Dr. Marco Aurélio Cebim
IQ-UNESP – Araraquara

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida
IBILCE-UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
25/novembro/2011

Aos meus pais, Jair (*in memoriam*) e Marcelina Aparecida Gelamos, por
eles serem meu esteio, minha força e por me amarem sem reservas,
incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e pelas bênçãos a mim concedidas diariamente.

Ao meu pai Jair (*in memoriam*), meu espelho. Seu caráter, sua honestidade e sua humildade me ensinaram muito sobre a vida, me fizeram uma pessoa com valores. Obrigado por ter sido o melhor pai desse mundo e ter conseguido deixar a herança que você me prometeu quando eu ainda balbuciava as primeiras palavras: meus estudos.

À minha mãe Marcelina, minha luz. Por sempre estar ao meu lado dia-a-dia provendo forças para seguir em frente e me apoiando a cada passo, a cada decisão. Sem ela nenhuma conquista valeria à pena, pois com ela eu sei tenho tudo de mais importante que possa se ter.

Ao meu irmão Antonio Carlos Gelamos e minha tia Nely Gelamos, pessoas sempre dispostas a estender as mãos a qualquer momento. Um obrigado especial àquela que sempre acreditou em minha capacidade desde muito jovem, minha prima que tenho um carinho de sobrinho Anita Alcoba Montialli.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Maria Pires pelas suas sábias e valiosas orientações, pelo incentivo nas dificuldades, pela dedicação constante, preocupação sempre, pela amizade. Ensinou-me que todo trabalho a ser cumprido exige retidão e seriedade, mas necessita também de amor. Por isso além de orientadora é para mim e todos os seus orientandos uma pessoa indispensável, com lugar cativo em nossas vidas. Sendo orientadora de meu engatinhar profissional, tornou-se uma grande amiga, senão minha segunda mãe.

Ao meu grupo de pesquisa, onde fiz bons amigos que levarei para a vida toda, principalmente a aqueles que me ajudaram muito para que meu trabalho pudesse ter sucesso: Marlon, Sabrina, Thais.

Aos campeões: Iara, Paulo, Diego, Ranulfo e Kátia, lado a lado até o findar desse mestrado.

A todos do Departamento de Física, Química e Biologia que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, bem como aos colaboradores do IBILCE.

E em especial a Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes Corradi Custódio da Silva e a Prof^a. Dr^a. Ana Flora Dalberto Vasconcelos pela disposição, ajuda e empréstimos de laboratórios e aparelhos. Vale lembrar também todos os seus orientandos que me auxiliaram sempre que necessário.

A Capes pela bolsa concedida no período em que o mestrado foi desenvolvido.

Por fim, aos membros da banca examinadora do Exame de Qualificação, Prof. Dr. Marco Aurélio Cebim e Prof^a. Dr^a. Beatriz Eleutério Goi, pelas valiosas contribuições que muito engrandeceram este trabalho.

“Eu pude ver mais alto, porque
subi nos ombros de gigantes”.

Isaac Newton

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos e aprimorados protocolos de conjugação entre nanopartículas do luminóforo $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er,Yb}$, aminofuncionalizadas e a proteína Streptavidina, para atuarem como marcador em imunoenaios. A streptavidina faz parte do sistema de auto-reconhecimento biotina-avidina mais aplicado em ensaios biológicos, sendo que, devido ao seu alto custo, a Albumina Sérica Bovina foi escolhida como proteína de trabalho em substituição à Avidina. Na etapa final, no entanto, utilizou-se a Streptavidina para comparativamente finalizar as discussões. Desta forma, o desenvolvimento do protocolo considerado padrão foi feito aplicando-se o *crosslinker* homobifuncional glutaraldeído, e a partir deste, estudou-se o comportamento da ligação luminóforo-proteína utilizando-se outros *crosslinkers* heterobifuncionais, no caso sulfo-N-succinimidil 4-maleimido- butirato sal de sódio (Sulfo-GMBS) e cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC). Tal alteração teve como princípio o aperfeiçoamento do protocolo de conjugação, estabelecendo comparativos entre os dados experimentais já obtidos e as possíveis vantagens resultantes dos *crosslinkers* heterobifuncionais, já que neste caso a possibilidade de ocorrer autoconjugação, ligação cruzada intramolecular e/ou polimerização entre as nanopartículas aminofuncionalizadas pode ser nula. Com relação às nanopartículas, estas, antes da conjugação, foram caracterizadas por espectroscopia de luminescência, microscopia eletrônica de varredura e/ou transmissão, assim como titulação potenciométrica para quantificação dos grupos NH_2 após funcionalização. No desenvolvimento e aperfeiçoamento dos protocolos de conjugação todas as etapas foram monitoradas por Espectroscopia de Absorção na Região do UV-VIS para a verificação do comportamento molecular das espécies presentes antes e após as reações promovidas. Após a análise comparativa de todos os

resultados, com relação aos *crosslinkers*, independente de qual foi utilizado, todos atuaram de maneira satisfatória no papel de ligar o luminóforo à proteína, indicando que realmente a conjugação ocorre em todos os casos. Entretanto, o EDC, de natureza heterobifuncional, foi considerado o mais adequado, devido à sua principal vantagem que é o tempo de reação de cerca de 4 horas à temperatura ambiente e menos etapas de lavagem, pois a conjugação com glutaraldeído ou Sulfo-GMBS tem mais de 24 horas de duração e uma etapa de lavagem a mais. O protocolo final onde se obteve o conjugado nanopartícula-streptavidina-biotina foi efetuado então se utilizando o EDC como *crosslinker*, e os resultados confirmaram o sucesso na conjugação. Portanto, o protocolo desenvolvido nesse trabalho mostrou-se promissor para ser aplicado em imunoenaios utilizando como agente de ligação cruzada, *crosslinker*, o EDC.

Palavras chave: marcador luminescente, *crosslinker*, avidina-biotina, BSA, espectroscopia de absorção no UV-VIS, íons terras raras, espectroscopia de luminescência.

ABSTRACT

In this work conjugation protocols between the aminofunctionalized nanophosphor Y_2O_3 : Er, Yb, and the protein Streptavidin was developed and improved to be possible applied as markers in immunoassays. The Streptavidin is part of the biotin-avidin self-recognition system applied to most biological assays, and, due to its high cost, Bovine Serum Albumin protein was chosen to be used in most part of the developing protocol as a substitute for avidin. In the final step, however, the Streptavidin was used in comparison to the other results in order to finalize the study. Thus, the development of the standard protocol was done by applying the homobifunctional crosslinker glutaraldehyde, and from this, it was studied the behavior of protein-nanophosphors binding using the heterobifunctional crosslinkers N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and Sulfo-N-succinimidyl 4-maleimidobutyrate sodium salt (Sulfo-GMBS). Such a change had the challenge to improve conjugation protocol, establishing the comparison between experimental data already obtained and the possible advantages due to the use of heterobifunctional crosslinkers, considering that in this case the possibility of occurring self-conjugation, intermolecular crosslinking and/or polymerization between the aminofunctionalized nanoparticles can be null. With respect to the nanoparticles before the conjugation step, they were characterized by luminescence spectroscopy, scanning and/or transmission electron microscopy as well as potentiometric titration for NH_2 groups quantification after functionalization. During the development and the improvement of the conjugation protocols all steps were monitored by UV-VIS absorption spectroscopy to verify the behavior of molecular species present before and after the reactions promoted. After the comparative analysis of all results, in relation to crosslinkers, regardless of what was used, all of them worked satisfactorily

in the role of binding the nanophosphors to the protein, indicating that the conjugation actually occurs in all cases. However, the EDC, heterobifunctional in nature, was considered the most suitable crosslinker due to its main advantage that is the reaction time of about 4 hours at room temperature and less washing steps, since the conjugation with glutaraldehyde or Sulfo-GMBS has more than 24 hours and a washing step further. The final protocol where it was obtained the conjugate between nanoparticle-streptavidin-biotin was then performed using the EDC as crosslinker, and the results confirmed the successful conjugation. Therefore, the protocol developed in this work showed to be promise for application in immunoassays using EDC as the crosslinker agent.

Keywords: luminescent marker, crosslinker, biotin-avidin, BSA, UV-VIS absorption spectroscopy, rare earth ions, luminescence spectroscopy

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Configurações básicas do sistema avidina-biotina. Em todos os casos a molécula de interesse T é mostrada imobilizada em um suporte sólido. (A) O ligante específico B da molécula de interesse é biotinilado (→) e a streptavidina S carrega um marcador ●. (B) Mesmo caso de (A), mas a streptavidina é usada sem marcação para ligar o ligante biotinilado ao marcador biotinilado. (C) Streptavidina sem marcação é misturada ao marcador biotinilado para formar um complexo polimérico com alguns dos resíduos ativos de ligação à biotina. Esse polímero liga o ligante biotinilado como em (A). (reproduzido de ⁽²⁵⁾).....	10
Figura 2 - Complexo avidina-biotina-enzima. Modificado de Falini B, Taylor CR: New developments in immunoperoxidase techniques and their application.....	11
Figura 3 - Percepção clássica da estrutura da albumina sérica (reproduzido de ⁽³⁰⁾).	12
Figura 4 - Sequência de aminoácidos da albumina bovina, destacando os nove domínios homólogos, ligados por pontes dissulfeto (reproduzido de ⁽³⁰⁾).	13
Figura 5 - a) Estrutura da albumina com o polipeptídeo remanescente ocorrendo nas voltas e regiões estendidas ou flexíveis entre subdomínios sem beta-pregueada. B) Divisão dos domínios em segmentos helicoidais. c) Subdomínio A. d) Subdomínio B (reproduzido de ⁽³⁰⁾).	14
Figura 6 - Fluxograma esquematizando a etapa de conjugação das nanopartículas aminofuncionalizadas com a proteína albumina e os diferentes <i>crosslinkers</i> (glutaraldeído ou Sulfo-GMBS).	20
Figura 7 - Fluxograma esquematizando a etapa de conjugação das nanopartículas aminofuncionalizadas com a proteína albumina ou streptavidina e o <i>crosslinker</i> EDC.	21
Figura 8 - Fluxograma esquematizando a etapa de conjugação das nanopartículas aminofuncionalizadas com a vitamina biotina (sistema de auto-reconhecimento avidina-biotina)	22
Figura 9 - Imagens de MEV obtidas para amostras de óxido de ítrio dopado a partir da resina polimérica preparada pelo método Pechini utilizando etilenoglicol como agente polimerizante, a) imagem aumentada em 20.000 vezes, b) imagem aumentada em 50.000 vezes, c) imagem aumentada em 100.000 vezes.....	27
Figura 10 - Imagens de MET da amostra RCS2, a) sílica formando aglomerados, com presença de sílica esférica, b) em destaque esferas de sílica, c) esferas de sílica com diâmetro aproximado de 700 nm, d) em destaque aglomerados de sílica, e) aglomerado de sílica visto por outro ângulo, f) visão mais geral dos aglomerados sílica, g) em destaque esferas de sílica com diâmetro em torno de 500 nm, h) sílica esférica em destaque.	29

Figura 11 - Imagens de MET da amostra RSS1, a) predominância de aglomerados de sílica, b) destaque para esferas de sílica, c) imagem ampliada das esferas de sílica, d) aglomerado de sílica esférica em destaque, e) aglomerados sem a presença de sílica esférica, f) novamente aglomerados de sílica sem a presença de sílica esférica.	30
Figura 12 - Imagens de MET da amostra RSS2, a) presença de sílica formando aglomerados, b) uma visão mais geral dos aglomerados de sílica, c) aglomerados de sílica com presença de esferas de sílica, d) região com algumas esferas de sílica em destaque, e) outro ângulo onde a presença de sílica esférica é notada, f) aglomerado de sílica.	31
Figura 13 - Espectros de emissão a temperatura ambiente dos luminóforos YOErYb-EG e YOErYb_SB, sob excitação no UV em 380 nm, antes da aminofuncionalização.....	33
Figura 14 - Espectro de emissão do luminóforo RSS1_SB antes da aminofuncionalização, denominado YOErYb_SB, com excitação no IV em 980 nm.....	34
Figura 15 - Diagrama dos níveis energéticos dos íons dopantes Er^{3+} e Yb^{3+} , mecanismos de conversão ascendente, e emissão no visível apresentada com excitação em 980 nm. As setas em marrom (não pontilhadas) representam absorção de energia, as setas coloridas representam emissão no visível, as setas cinza pontilhadas representam relaxamento multi-fóton (decaimento não-radiativo) e as setas marrons curvas representam a transferência de energia. (extraído de ⁽⁵⁰⁾)	35
Figura 16 - Curvas obtidas na Titulação Potenciométrica das nanopartículas aminofuncionalizadas, amostras a) RCS2, b) RSS1, c) RSS2, d) RSS1_SB	36
Figura 17 - Gráfico da 1ª Derivada do pH, com aplicação do ajuste de curvas, função Lorentz, para as amostras a) RCS2, b) RSS1, c) RSS2, d) RSS1_SB.....	37
Figura 18 - Mecanismo da etapa de conjugação entre a nanopartícula luminescente aminofuncionalizada, ativada com glutaraldeído, com a proteína albumina.	40
Figura 19 - Representação esquemática da etapa de conjugação entre a nanopartícula luminescente aminofuncionalizada, ativada com glutaraldeído, com a proteína albumina.....	41
Figura 20 - Mecanismo da etapa de conjugação entre a nanopartícula luminescente aminofuncionalizada, ativada com Sulfo-GMBS, com a proteína albumina.	42
Figura 21 - Representação esquemática da etapa de conjugação entre a nanopartícula luminescente aminofuncionalizada, ativada com Sulfo-GMBS, com a proteína albumina.....	42
Figura 22 - Mecanismo da etapa de conjugação entre a nanopartícula luminescente aminofuncionalizada ativada com EDC com a proteína albumina.	43

Figura 23 - Representação esquemática da etapa de conjugação entre a nanopartícula luminescente aminofuncionalizada ativada com EDC com a proteína albumina.	43
Figura 24 - Espectros de absorção no UV-VIS na região de 200 a 340 nm das nanopartículas aminofuncionalizadas (RCS2) em tampão PBS, albumina pura, glutaraldeído puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RCS2)-glutaraldeído-albumina.....	44
Figura 25 - Espectros de absorção no UV-VIS das nanopartículas (RCS2) em tampão PBS, albumina pura, glutaraldeído puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RCS2)-glutaraldeído-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 200 a 240 nm...	45
Figura 26 - Espectros de absorção no UV-VIS das nanopartículas (RCS2) em tampão PBS, albumina pura, glutaraldeído puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RCS2)-glutaraldeído-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 240 a 340 nm...	46
Figura 27 - Estrutura do surfactante Triton X-100, utilizado como variação no processo de recobrimento das nanopartículas luminescentes.....	47
Figura 28 - (a) Seqüência de peptídeos da proteína albumina; (b) Modelo preenchimento espacial da molécula de albumina bovina com resíduos básicos coloridos em azul, resíduos ácidos em vermelho e neutros em amarelo (visão frontal). (c) Modelo estereoquímico bola-bastão da estrutura da albumina na região ao redor do resíduo Cisteína-34 (Cys-34), onde vermelho é O, Amarelo, C, Azul, N, Verde, S; ⁽³¹⁾	48
Figura 29 - Representação de aminoácidos presentes na proteína albumina (reproduzido de ⁽⁴³⁾).	48
Figura 30 - Transições eletrônicas possíveis para elétrons π , σ e n	49
Figura 31 - Espectros de absorção no UV-VIS na região de 200 a 340 nm das nanopartículas aminofuncionalizadas (RSS1) em tampão PBS, albumina pura, glutaraldeído puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado-glutaraldeído-albumina.....	50
Figura 32 - Espectros de absorção no UV-VIS das nanopartículas aminofuncionalizadas (RSS1) em tampão PBS, albumina pura, glutaraldeído puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS1)-glutaraldeído-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 200 a 240 nm.....	51
Figura 33 - Espectros de absorção no UV-VIS das nanopartículas aminofuncionalizadas (RSS1) em tampão PBS, albumina pura, glutaraldeído puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS1)-glutaraldeído-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 240 a 340 nm.....	52
Figura 34 - Espectros de absorção no UV-VIS na região de 200 a 340 nm das nanopartículas aminofuncionalizadas (RSS2) em tampão PBS, albumina pura, glutaraldeído puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado-glutaraldeído-albumina.....	54
Figura 35 - Espectros de absorção no UV-VIS da albumina pura, glutaraldeído puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado	

(RSS2)-glutaraldeído-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 200 a 240 nm.....	55
Figura 36 - Espectros de absorção no UV-VIS da albumina pura, glutaraldeído puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS2)-glutaraldeído-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 240 a 340 nm.....	56
Figura 37 - Espectros de absorção no UV-VIS na região de 200 a 340 nm das nanopartículas aminofuncionalizadas (RSS1) em tampão PBS, albumina pura, Sulfo-GMBS puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado- SulfoGMBS-albumina.....	58
Figura 38 - Espectros de absorção no UV-VIS das nanopartículas aminofuncionalizadas (RSS1) em tampão PBS, albumina pura, Sulfo-GMBS puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS1)-SulfoGMBS-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 200 a 240 nm.	59
Figura 39 - Espectros de absorção no UV-VIS das nanopartículas aminofuncionalizadas (RSS1) em tampão PBS, albumina pura, Sulfo-GMBS puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS1)-SulfoGMBS-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 240 a 340 nm.	60
Figura 40 - Espectros de absorção no UV-VIS na região de 200 a 340 nm das nanopartículas aminofuncionalizadas (RSS2) em tampão PBS, albumina pura, Sulfo-GMBS puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado-SulfoGMBS-albumina.....	61
Figura 41 - Espectros de absorção no UV-VIS da albumina pura, Sulfo-GMBS puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS2)-SulfoGMBS-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 200 a 240 nm.	62
Figura 42 - Espectros de absorção no UV-VIS da albumina pura, Sulfo-GMBS puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS2)-SulfoGMBS-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 240 a 340 nm.	63
Figura 43 - Espectros de absorção no UV-VIS na região de 200 a 340 nm das nanopartículas aminofuncionalizadas aminofuncionalizada (RCS2) em tampão PBS, albumina pura, EDC puro, sistema conjugado EDC-albumina, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RCS2)-albumina.	65
Figura 44 - Espectros de absorção no UV-VIS das nanopartículas aminofuncionalizadas (RCS2) em tampão PBS, albumina pura, EDC puro, sistema conjugado EDC-albumina, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RCS2)-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 200 a 240 nm.....	66
Figura 45 - Espectros de absorção no UV-VIS das nanopartículas aminofuncionalizadas (RCS2) em tampão PBS, albumina pura, EDC puro, sistema conjugado EDC-albumina, sistema conjugado luminóforo	

aminofuncionalizado (RCS2)-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 240 a 340 nm.....	67
Figura 46 - Espectros de absorção no UV-VIS na região de 200 a 340 nm das nanopartículas aminofuncionalizadas (RSS1) em tampão PBS, albumina pura, EDC puro, sistema conjugado EDC-albumina, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS1)-albumina.....	69
Figura 47 - Espectros de absorção no UV-VIS das nanopartículas aminofuncionalizadas (RSS1) em tampão PBS, albumina pura, EDC puro, sistema conjugado EDC-albumina, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS1)-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidadena região de 200 a 240 nm.....	70
Figura 48 - Espectros de absorção no UV-VIS das nanopartículas aminofuncionalizadas (RSS1) em tampão PBS, albumina pura, EDC puro, sistema conjugado EDC-albumina, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS1)-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 240 a 340 nm.....	71
Figura 49 - Espectros de absorção no UV-VIS na região de 200 a 340 nm comparando o sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS1_SB)-streptavidina-biotina com os reagentes puros e sistema conjugados intermediários.	74
Figura 50 - Espectros de absorção no UV-VIS do sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS1_SB)-streptavidina-biotina com os reagentes puros e sistema conjugados intermediários. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 200 a 240 nm.	75
Figura 51- Espectros de absorção no UV-VIS do sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS1_SB)-streptavidina-biotina com os reagentes puros e sistema conjugados intermediários. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 240 a 340 nm.	76
Figura 52 - Espectros de emissão a temperatura ambiente dos filmes cast do conjugado final e da Streptavidina pura (fenda de excitação 6 nm, fenda de emissão 15 nm), assim como do luminóforo na forma de pó YOErYb-SB (fenda de excitação e de emissão 2,5 nm), fixando-se comprimento de onda de excitação em 377 nm.	78
Figura 53 - Microscopia óptica do filme de streptavidina pura, a) aumentado em 200 vezes, b) aumentado em 1000 vezes.	80
Figura 54 - Microscopia óptica do filme do sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado-streptavidina-biotina, a) aumentado em 200 vezes, b) aumentado em 1000 vezes.....	80
Figura 55 - Imagens dos campos analisados por espalhamento Raman, obtidas a partir do Microscópio óptico acoplado ao equipamento, dos filmes a) biotina pura, b) streptavidina pura, c) conjugado luminóforo aminofuncionalizado-streptavidina-biotina.	81
Figura 56 - Espectros Raman da biotina pura, streptavidina pura e sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado-streptavidina-biotina. Todos em tampão PBS.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos reagentes utilizados na conjugação das nanopartículas aminofuncionalizadas com a proteína albumina/streptavidina e teste para o sistema de auto-reconhecimento avidina-biotina.....	16
Tabela 2. Condições de preparação das nanopartículas utilizadas nas conjugações.....	19
Tabela 3. Posição dos picos observados nos gráficos da 1ª derivada do pH x Volume de NaOH, valores gerados pelo ajuste aplicado.	38
Tabela 4. Concentração dos grupamentos amino presentes nas nanopartículas aminofuncionalizadas.....	38
Tabela 5. Características das amostras de nanopartículas luminescentes aminofuncionalizadas Y ₂ O ₃ :Er,Yb utilizadas na conjugação a proteína albumina ou streptavidina e diferentes <i>crosslinkers</i>	39
Tabela 6. Dados de máximos de absorção obtidos por espectroscopia UV-VIS para diferentes amostras e a relação de deslocamento entre bandas de uma mesma região apresentadas pelo sistema conjugado (RCS2/Glutaraldeído).	46
Tabela 7. Dados de máximos de absorção obtidos por espectroscopia UV-VIS para diferentes amostras e a relação de deslocamento entre bandas de uma mesma região apresentadas pelo sistema conjugado (RSS1/Glutaraldeído).....	52
Tabela 8. Dados de máximos de absorção obtidos por espectroscopia UV-VIS para diferentes amostras e a relação de deslocamento entre bandas de uma mesma região apresentadas pelo sistema conjugado(RSS2/Glutaraldeído).	56
Tabela 9. Dados de máximos de absorção obtidos por espectroscopia UV-VIS para diferentes amostras e a relação de deslocamento entre bandas de uma mesma região apresentadas pelo sistema conjugado (RSS1/Sulfo-GMBS).	60
Tabela 10. Dados de máximos de absorção obtidos por espectroscopia UV-VIS para diferentes amostras e a relação de deslocamento entre bandas de uma mesma região apresentadas pelo sistema conjugado (RSS2/Sulfo-GMBS).	63
Tabela 11. Dados de máximos de absorção obtidos por espectroscopia UV-VIS para diferentes amostras e a relação de deslocamento entre bandas de uma mesma região apresentadas pelo sistema conjugado (RCS2/EDC).	67
Tabela 12. Dados de máximos de absorção obtidos por espectroscopia UV-VIS para diferentes amostras e a relação de deslocamento entre bandas de uma mesma região apresentadas pelo sistema conjugado (RSS1/EDC).....	71

Tabela 13. Dados de máximos de absorção obtidos por espectroscopia UV-VIS para diferentes amostras e a relação de deslocamento entre bandas de uma mesma região apresentadas pelo sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS1_SB)-streptavidina-biotina. 76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APTS	3-aminopropiltriethoxisilano
BSA	<i>Bovin seric albumin</i>
Cys	Cysteine
EDC	Cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
EDS	Energy dispersive spectroscopy
EL	Espectroscopia de Luminescência
I. C.	Iniciação científica
IV	Infravermelho
Kda	Quilo Dalton
Kit ABC	<i>Kit Avidin-biotin complex</i>
M	Molaridade
m/v	Massa por volume
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
n	Número de mols
ORD	<i>Optical rotatory dispersion</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
RCS2	Amostra de óxido de ítrio dopado com érbio e itérbio recoberta com adição de surfactante, de número 2
rpm	
RSS1	Amostra de óxido de ítrio dopado com érbio e itérbio recoberta sem adição de surfactante, de número 1
RSS1_EG	Amostra de óxido de ítrio dopado com érbio e itérbio recoberta sem adição de surfactante, de número 1, preparada a partir do agente

	polimerizante etilenoglicol
RSS1_SB	Amostra de óxido de ítrio dopado com érbio e itérbio recoberta sem adição de surfactante, de número 1, preparada a partir do agente polimerizante sorbitol
RSS2	Amostra de óxido de ítrio dopado com érbio e itérbio recoberta sem adição de surfactante, de número 2
Sulfo-GMBS	Sulfo-N-succinimidil 4-maleimido-butirato sal de sódio
TEOS	Tetraetóxisilano
TR	Terra rara
UV-VIS	Ultravioleta-visível
v	volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	IMUNOENSAIO EM BIOLOGIA E MEDICINA.....	2
1.2	MARCADORES A BASE DE LUMINÓFOROS DE ÍONS TR....	2
1.3	A LIGAÇÃO CRUZADA E SEUS EMPREGOS BIOLÓGICOS..	4
1.3.1	Ligação cruzada (<i>cross linking</i>).....	4
1.3.2	Emprego dos <i>crosslinkers</i> em sistemas biológicos.....	5
1.4	CONJUGAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS AOS IMUNOREAGENTES: A IMPORTÂNCIA DO SISTEMA DE AUTO-RECONHECIMENTO AVIDINA-BIOTINA.....	6
1.4.1	Usos e aplicações do complexo avidina-biotina.....	6
1.4.2	Estreptavidina.....	8
1.4.3	Biotina.....	9
1.4.4	A Interação avidina-biotina como um sistema de detecção.....	9
1.5	ALBUMINA SÉRICA BOVINA.....	11
1.5.1	Estrutura da BSA.....	12
2	OBJETIVOS.....	15
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1	RELAÇÃO DE EQUIPAMENTOS DE APOIO UTILIZADOS....	17
3.2	PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LUMINESCENTES.....	17
3.3	PREPARAÇÃO DO TAMPÃO PBS.....	19
3.4	PREPARAÇÃO TAMPÃO BORATO.....	19
3.5	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA CONJUGAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS AMINOFUNCIONALIZADAS COM ALBUMINA E OS <i>CROSSLINKERS</i> GLUTARALDEÍDO E SULFO-GMBS.....	19

3.7	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA CONJUGAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS AMINOFUNCIONALIZADAS COM ALBUMINA/STREPTAVIDINA E O <i>CROSSLINKER</i> EDC.....	20
3.8	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL DE CONJUGAÇÃO DO SISTEMA CONJUGADO LUMINÓFORO AMINOFUNCIONALIZADO-STREPTAVIDINA, VIA EDC, COM A VITAMINA BIOTINA.....	21
4	CARACTERIZAÇÃO.....	23
4.1	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	23
4.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)....	23
4.3	ESPECTROSCOPIA DE LUMINESCÊNCIA NO UV-VISÍVEL (EL).....	24
4.4	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO UV-VIS.....	25
4.5	MICROSCOPIA ÓPTICA.....	25
4.6	MICROSCOPIA RAMAN.....	25
4.7	SISTEMÁTICA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS VIA ESPECTROSCOPIA UV-VIS DA CONJUGAÇÃO ENTRE A AMOSTRA $Y_2O_3:ER,YB$ AMINOFUNCIONALIZADA E PROTEÍNA UTILIZANDO-SE OS DIFERENTES <i>CROSSLINKERS</i> EM COMPARAÇÃO COM OS REAGENTES PUROS.....	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	27
5.3	ESPECTROSCOPIA DE LUMINESCÊNCIA.....	32
5.5	AMOSTRAS UTILIZADAS NAS CONJUGAÇÕES E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	39

5.6	MECANISMOS DE REAÇÃO PROPOSTOS PARA A CONJUGAÇÃO ENTRE O LUMINÓFORO AMINOFUNCIONALIZADO E A PROTEÍNA UTILIZANDO OS <i>CROSSLINKERS</i> GLUTARALDEÍDO, SULFO-GMBS E EDC.....	39
5.7	ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS RELATIVA AO ENSAIO DE CONJUGAÇÃO COM ALBUMINA DA AMOSTRA $Y_2O_3:Er,Yb$ AMINOFUNCIONALIZADA (CÓDIGOS: RCS2; RSS1; RSS2) UTILIZANDO O <i>CROSSLINKER</i> GLUTARALDEÍDO EM COMPARAÇÃO COM OS REAGENTES PUROS.....	44
5.7.1	Amostra código RCS2.....	44
5.7.2	Amostra código RSS1.....	50
5.7.3	Amostra código RSS2.....	54
5.8	ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS RELATIVA AO ENSAIO DE CONJUGAÇÃO COM ALBUMINA DA AMOSTRA $Y_2O_3:Er,Yb$ AMINOFUNCIONALIZADA (CÓDIGOS: RCS2; RSS1; RSS2) UTILIZANDO O <i>CROSSLINKER</i> SULFO-GMBS EM COMPARAÇÃO COM OS REAGENTES PUROS.....	58
5.8.1	Amostra código RSS1.....	58
5.8.2	Amostra código RSS2.....	61
5.9	ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS RELATIVA AO ENSAIO DE CONJUGAÇÃO COM ALBUMINA DA AMOSTRA $Y_2O_3:Er,Yb$ AMINOFUNCIONALIZADA (CÓDIGOS: RCS2; RSS1) UTILIZANDO O <i>CROSSLINKER</i> EDC EM COMPARAÇÃO COM OS REAGENTES PUROS.....	64
5.9.1	Amostra código RCS2.....	65
5.10	ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS DO SISTEMA CONJUGADO $Y_2O_3:Er,Yb$ AMINOFUNCIONALIZADO-STREPTAVIDINA-BIOTINA VIA EDC EM COMPARAÇÃO COM OS REAGENTES PUROS.....	73

5.10.1	Amostra código RSS1_SB.....	74
5.11	ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE LUMINESCÊNCIA DO SISTEMA CONJUGADO Y₂O₃:Er,Yb AMINOFUNCIONALIZADO-STREPTAVIDINA-BIOTINA VIA EDC.....	78
6	CONCLUSÕES.....	84
7	PERSPECTIVAS.....	85
8	REFERÊNCIAS.....	87

1 INTRODUÇÃO

A luz proveniente de fontes luminescentes origina-se da absorção de outras formas de energia que não sejam de origem térmica. Assim, compostos luminescentes possuem a propriedade de absorver energia quando submetidos a alguma forma de excitação (radiação ultravioleta, raios X, bombardeamentos de elétrons, etc) e convertê-la em radiação emitida na forma de fótons, podendo esta emissão ser nas regiões visível, ultravioleta e infravermelho do espectro. Tal fenômeno de conversão de energia eletromagnética é conhecido como luminescência.⁽¹⁾ Na luminescência, portanto, a principal propriedade é a emissão de luz, resultante da absorção de energia. Esta absorção de energia pode ser promovida tanto pela matriz hospedeira e posterior transferência de energia aos centros emissores, como pelas próprias espécies ativadoras.⁽²⁾ Os luminóforos sólidos normalmente convertem radiação de energia mais alta em radiação eletromagnética com menor energia, apresentando o chamado deslocamento *Stokes*.⁽³⁾ No entanto, existem materiais capazes de converter radiação de excitação com energia menor (ou comprimento de onda maior, por exemplo, infravermelho próximo) e emitir radiação de aproximadamente a metade ou um terço do comprimento de onda da excitação. Estes luminóforos apresentam o fenômeno chamado de conversão ascendente, ou o termo mais comumente utilizado originado da língua inglesa, *up conversion*.^(4, 5, 6)

Íons Terras Raras (TR) constituem um importante grupo formado por lantanídeos acrescido dos elementos escândio e ítrio, e são tanto utilizados como composição na matriz hospedeira como centros ativadores. Na maioria dos casos, a emissão dos íons terras raras é devido às transições *f-f* e *d-f*. Os espectros de emissão das transições *f-f* consistem de linhas estreitas, além de serem transições proibidas por paridade e muitas delas também por spin. Nestas transições ópticas *d-f*, o espectro de emissão consiste de bandas largas, sendo que por serem permitidas conseqüentemente são muito rápidas.⁽⁷⁾

Os materiais luminescentes são ótimos conversores de radiação, e as suas aplicações estão voltadas para dispositivos de imagem ou iluminação. No entanto, recentemente, a utilização de compostos luminescentes também tem ganhado espaço cada vez maior como marcadores em testes sorológicos ou imunoensaios.

Como se pode observar, as aplicações baseadas na luminescência das terras raras têm alcançado uma posição importante na sociedade moderna. ⁽¹⁾

1.1 IMUNOENSAIO EM BIOLOGIA E MEDICINA

Dentre os ensaios biológicos, aqueles que envolvem os testes sorológicos para detecção e quantificação de antígenos ou anticorpos utilizando reagentes específicos são denominados de imunoenaios. Nesta categoria, o ensaio pode utilizar reagentes não marcados ou marcados. Os primeiros, como precipitação e aglutinação, possuem sensibilidade de detecção menor, pois é necessário que se formem grandes complexos antígeno – anticorpo para a sua detecção. Nos ensaios com reagentes marcados, estes amplificam o sinal, aumentando a sensibilidade de detecção. Os marcadores comumente utilizados são aqueles do tipo radioativos, enzimáticos, fluorescentes, quimiluminescentes dentre outros métodos aplicados em pesquisas biomédicas e médicas de laboratório clínico. ^(8, 9)

Em estudos com sistemas biológicos, o emprego de íons de TR apresenta uma ampla importância, pois além de sua grande relevância como marcadores em imunologia, são bastante utilizados na detecção de funções celulares *in vivo* para elucidação estrutural e função de enzimas e proteínas. Os estudos de novas aplicações biomédicas dos íons TR têm sido o enfoque de muitos pesquisadores nos últimos anos. Além de agentes de contraste que já estão em uso, novos agentes mais seletivos estão sendo pesquisados e os resultados têm sido muito promissores. Estão sendo investigados também lantanídeos radioativos para aplicação médica nuclear, por exemplo, no tratamento do câncer. ⁽¹⁰⁾ A sensibilidade de detecção está relacionada com o tipo de marcador empregado e a qualidade do tipo de equipamento disponível para detectá-lo. ^(11, 12)

1.2 MARCADORES A BASE DE LUMINÓFOROS DE ÍONS TR

No campo da imunologia, marcadores luminescentes são uma excelente alternativa aos radioisótopos, devido ao alto custo e periculosidade destes últimos. O método imunológico baseado no uso de marcadores luminescentes é também

usualmente denominado fluoroimunoensaio. O marcador luminescente é acoplado quimicamente a um anticorpo, o qual se liga de uma forma específica a uma dada biomolécula. Desta forma, a presença de luminescência pode ser relacionada à presença de certas moléculas ou organismos, possibilitando sua detecção. Geralmente, as amostras a serem analisadas têm sua própria luminescência. Quando marcadores contendo íons terras raras são utilizados, como a luminescência intrínseca aos materiais biológicos usualmente apresenta curta duração, e íons como Eu^{3+} e Tb^{3+} têm estados emissores com tempos de vida longos, podem-se facilmente separar estes dois tipos de emissão. Desde que toda a determinação é feita em meio aquoso, o íon TR tem que estar protegido do ambiente em que se encontra, caso contrário sua luminescência é fortemente suprimida pelas moléculas de água. Desta forma, é necessária a inserção do íon em molécula(s) que o isolem do meio, daí o freqüente uso de quelatos neste tipo de aplicação. ⁽⁴⁾

A luminescência de complexos de íons TR, na sua maioria quelatos, tem sido utilizada com bastante sucesso como método em determinação de espécies biológicas, especialmente para aplicações clínicas. O método é superior a muitos outros em termos de sensibilidade e especificidade. ⁽⁴⁾

Apesar de todas as vantagens do fluoroimunoensaio, deve-se lembrar que a radiação ultravioleta pode causar danos em ácidos nucléicos e em outras macromoléculas biológicas, limitando seu uso em sistemas onde é necessário à preservação das células vivas e estruturas celulares. ⁽¹³⁾ Desta forma, a necessidade do desenvolvimento de novos marcadores e sistemas de detecção que apresentem alta sensibilidade óptica, alta seletividade, não geração de autofluorescência, compatibilidade com células vivas e estabilidade em ambientes aquosos e oxigenados, tem feito com que luminóforos de íons TR continuem tendo muito interesse neste tipo de aplicação. Recentemente, a utilização de luminóforos com conversão ascendente como marcadores em imunoensaios tem demonstrado as inúmeras vantagens destes materiais no estudo de sistemas biológicos. ⁽¹⁴⁾ Tendo a característica de conversão ascendente, os luminóforos utilizados como marcadores apresentam emissão anti-Stokes de luz na região do visível quando iluminados por radiação na região do infravermelho, a qual não acarreta danos a células vivas nem gera autofluorescência do meio.

Em trabalho recente, partículas de oxissulfeto de ítrio dopado com íons érbio e itérbio ou itérbio e túlio, com forma esférica e com tamanho controlado, foram obtidas a partir de precursor hidroxicarbonato e posteriormente recobertas com camadas de sílica funcionalizada. Neste caso, os grupos funcionais na sílica servem de sítios ativos para ligação de reagentes biológicos, tais como anticorpos, usando química de ligação cruzada padrão, potencializando seu uso como marcador fluorescente com alta especificidade. ⁽¹⁴⁾

1.3 A LIGAÇÃO CRUZADA E SEUS EMPREGOS BIOLÓGICOS

1.3.1 Ligação cruzada (*cross linking*)

Tal processo consiste em unir quimicamente duas ou mais moléculas por meio de ligação covalente, onde os reagentes (*crosslinkers*), que podem ser homo, heterobifuncionais ou comprimento zero (*zero-length*), contêm terminais reativos para grupos funcionais específicos em proteínas ou outras moléculas. ^(15, 16)

Crosslinker homobifuncional caracteriza-se por possuir em sua molécula dois grupos reativos idênticos e freqüentemente é usado ⁽¹⁷⁾ em reações de única etapa (*one-step*) entre um composto e uma proteína ou entre duas proteínas diferentes (é utilizado até mesmo para estabilizar a estrutura quaternária protéica). O glutaraldeído é um bom exemplo, nesse caso, com ampla aplicabilidade: uso em fluoroimunoensaios conjugando biomoléculas com nanopartículas funcionalizadas; aplicado a imunoensaio para determinação de HIgH (imunoglobulina G humana); desenvolvimento de novos sistemas de imunoensaios como aqueles empregados para determinação de antígeno carcinoembrionário. ^(18, 19, 20) Sua desvantagem é a possibilidade do processo resultar em ligação cruzada intramolecular e/ou polimerização ⁽²¹⁾, embora possa ser minimizado com o uso do reagente em excesso e posteriores etapas de lavagens. Já o *crosslinker* heterobifuncional apresenta dois grupos reativos diferentes em sua molécula permitindo conjugações seqüenciais, ajudando a minimizar os problemas citados anteriormente com o homobifuncional. Sua utilização é vantajosa quando a modificação de aminas é problemática, pois se estiverem presentes nos locais ativos de proteínas a modificação pode conduzir à

perda de atividade. Outros grupos funcionais tais como o sulfídrico, carboxílico, fenólicos e carboidratos, podem ser alvos mais apropriados. Uma conjugação de duas etapas (*two-step*) permite que uma proteína tolerante à modificação de suas aminas seja acoplada a outra ou, ainda, a uma molécula diferente que tenha grupos de acesso distintos. *Crosslinkers* que são amino-reativos em uma extremidade e sulfídrico-reativos na outra são especialmente úteis para tal consideração. Muitos trabalhos são encontrados usando *crosslinkers* heterobifuncionais com bons resultados na etapa de conjugação. Exemplos desses tipos de reagentes são: o 4-(4-N-maleimidophenyl)butyric acid hydrazide HC $\nearrow$ 1/2 dioxane (MPBH), sulfosuccinimidyl 6-[3-(2-pyridyldithio)-propionamido] hexano (sulfo-LC-SPDP), 3,3'-dithiobis[sulfo-succinimidyl]propionate (DTSSP), N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP), sulfosuccinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)-butyrate (sulfo-SMPB), sulfo-N-succinimidil 4-maleimido-butirato sal de sódio (Sulfo-GMBS).^(22, 23, 24) *Crosslinkers* do tipo *zero-length* representam uma classe especial de compostos, sendo semelhantes aos outros reagentes de ligação cruzada citados acima em termos de função, embora sua ação induza a uma ligação de dois grupos químicos intrínsecos de proteínas sem a introdução de material extrínseco. Assim, durante a reação de ligação cruzada, os átomos dos reagentes são eliminados, encurtando a distância entre os sítios ligados. Sendo exemplo desse tipo de reagente o cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC).⁽¹⁵⁾

1.3.2 Emprego dos *crosslinkers* em sistemas biológicos

Em sistemas biológicos o uso de *crosslinkers* compreende uma gama muito variada de aplicações. Vale destacar a aplicabilidade quando se tratam de proteínas, podendo ser útil na determinação de suas estruturas tridimensionais, associações moleculares em membranas celulares e interações com as vizinhanças. Também são empregados para imobilização em fase sólida, conjugação de proteína do tipo “*hepteno-carrier*”, preparação de conjugado anticorpo-enzima, imunotoxinas e imunoensaios.

São importantes, também, ao analisar mudanças conformacionais de proteínas associadas com uma interação em particular, revelando obstrução ou exposição de aminoácidos na estrutura terciária e quaternária. Como cada reagente

de ligação cruzada exibe um comprimento, informações relativas às distâncias de interação entre as moléculas conjugadas podem ser obtidas.

Outros usos incluem modificação de ácidos de nucléicos, drogas e superfícies sólidas. Vale ressaltar que a utilização dos *crosslinkers* veio facilitar o estudo de receptores de superfície, pois a partir da derivatização de um receptor com um *crosslinker* antes ou após o contato com o ligante, é possível isolar o complexo receptor-ligante. O uso de *crosslinkers* radiomarcados torna possível identificar um receptor particular através da detecção de autoradiografia.⁽¹⁵⁾

1.4 CONJUGAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS AOS IMUNOREAGENTES: A IMPORTÂNCIA DO SISTEMA DE AUTO-RECONHECIMENTO AVIDINA-BIOTINA

1.4.1 Usos e aplicações do complexo avidina-biotina

Ocorreu uma popularização nas técnicas em ensaios biológicos utilizando o sistema de auto-reconhecimento avidina-biotina, pois a marcação da avidina e/ou biotina tem emprego em diferentes experimentos, além do baixo custo e fácil aquisição em relação aos anticorpos marcados. Outros reagentes são usados para detecção, tais como: enzimas, marcadores fluorescentes, metaloproteínas, radio-marcadores e marcadores de ouro coloidal.⁽²⁵⁾

Avidina (ou streptavidina que também é um tipo de avidina) pode ser conjugada covalentemente a enzimas ou nanopartículas aminofuncionalizadas por meio de reagentes de ligação cruzada (*crosslinkers*) ou outro reagente de conjugação. Desta forma, avaliar o método e o reagente para conduzir uma conjugação é importante para resguardar a atividade enzimática, bem como o sítio de ligação para a biotina no conjugado.⁽²⁶⁾ Enquanto a avidina é uma proteína presente na clara do ovo, a streptavidina é uma proteína semelhante retirada da *Streptomyces avidinii*. Ambas se ligam com alta afinidade à vitamina biotina. Essa interação representa um mecanismo de defesa natural, pois a ligação com a avidina ou a streptavidina de enzimas biotiniladas que participam em transferência de CO₂ inativam as enzimas e assim inibem o crescimento de bactérias que dependem de tais enzimas.

As características únicas desse sistema de auto-reconhecimento o tornam ideal para inúmeras aplicações devido à interação não covalente da avidina com a biotina ser caracterizada por uma constante de formação (afinidade) de $10^{15} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ valor mais alto entre as constantes conhecidas, aproximadamente 10^3 - 10^6 vezes maior que a interação de ligantes com seus anticorpos específicos. Esta alta afinidade assegura que, uma vez formado o complexo, este não é perturbado por mudanças de pH, presença de agentes caotrópicos ¹, ou manipulações, tais como lavagens múltiplas quando o complexo é imobilizado. É uma ligação tão específica que assegura que a ligação é dirigida somente para a molécula de interesse. Ambas as proteínas possuem quatro sítios de ligação por molécula proporcionando usar múltiplos grupos específicos biotinilados (por exemplo, enzimas polibiotiniladas) e avidina para criar misturas que consistem em polímeros desses compostos. Estes polímeros ainda podem ter alguns sítios de ligação livres para biotina, assim tornando a detecção de reagentes mais sensíveis em pertinentes aplicações.

Em diversas ocasiões, avidina ou streptavidina devem ser quimicamente derivadas com vários reagentes orgânicos para conjugação com compostos de alta ou baixa massa molecular ou suportes sólidos. Como uma regra, ambas as proteínas são moléculas excepcionalmente estáveis e sua atividade de ligação com a biotina pode resistir a condições de reação severas e derivatização extensa.

No sistema avidina-biotina ou streptavidina-biotina, um componente participante sempre deve ser biotinilado. Felizmente, muitos reagentes de biotinilação estão agora comercialmente disponíveis; estes são extremamente fáceis de serem usados, seguindo procedimentos bem conhecidos disponíveis na literatura e pelos fabricantes dos reagentes. Também, a avidina altamente purificada e streptavidina são comercialmente disponíveis e relativamente baratas. Conjuntos de derivados da avidina e streptavidina (por exemplo, com fluoróforos, enzimas, metais, proteínas, fase sólida) são comercialmente disponíveis. Estes reagentes, em combinação com grupos específicos biotinilados, têm contribuído na rápida

¹ Um agente desnaturante é um agente caotrópico, mas agentes caotrópicos não são necessariamente agentes desnaturantes. Agentes caotrópicos rompem as forças intermoleculares entre as moléculas de água, permitindo que as proteínas e outras macromoléculas se dissolvam mais facilmente. Também interferem com a estabilização de interações intramolecular mediado por forças não covalentes como ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e efeitos hidrofóbicos.

disseminação de diversas aplicações e encorajando diversas investigações para usar o sistema.

A literatura sobre o sistema expandiu durante os últimos 10 anos, e muitas revisões especializadas têm sido publicadas. ^(27, 28)

1.4.2 Estreptavidina

A ligação específica da proteína streptavidina à biotina consiste de quatro subunidades de aminoácidos sem conter carboidrato; seu pI (ponto isoelétrico) é 5-6. Esta proteína é extensamente usada no lugar da avidina devido sua mais baixa ligação não específica. A streptavidina é isolada do meio de cultivo da *Streptomyces avidinii* através de precipitação por sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e cristalização. Alternativamente, colunas de iminobiotina podem ser usadas diretamente no meio bacteriano.

O gene da streptavidina foi recentemente clonado e seqüenciado. Da seqüência nucleotídica completa, a seqüência de aminoácido foi deduzida, comparando-a com a da avidina. Muitas regiões das duas moléculas mostram significativa homologia. A massa molecular encontrada para a streptavidina é de 60 kDa, fruto do produto isolado, como descrito acima, por uma precipitação inicial por sulfato de amônio (muitos produtos comercialmente disponíveis são preparados com tais métodos). Da seqüência genética, foi predita uma massa de 66 kDa; um produto de 75 kDa foi isolado em colunas de iminobiotina. Sabe-se, agora, que a streptavidina nativa de massa relativamente alta (66-75 kDa) pode ser convertida a uma forma de menor massa (por exemplo, 60 kDa) através de digestão proteolítica, tanto do terminal N como do C, os quais ocorrem durante a etapa de precipitação por sulfato de amônio; esta conversão é impedida se uma coluna de iminobiotina for usada. A streptavidina de baixa massa molecular é um produto comercialmente disponível apresentando melhores características para ligação com a biotina do que a proteína nativa. Streptavidina nativa pode ser convertida a streptavidina de baixa massa molecular por uma digestão simples com proteinase K. ⁽²⁵⁾

1.4.3 Biotina

Biotina, também conhecida como vitamina H, está presente em pequenas quantias em toda célula viva. Age como um co-fator de enzimas carboxilantes, por exemplo, piruvato carboxilase, a qual catalisa a formação de oxaloacetato por condensação de piruvato e CO_2 . O grupo carboxil da biotina é o sítio reativo da molécula para grupos α -amino de resíduos de lisina por uma ligação amida. Durante uma reação de carboxilação, o CO_2 é o primeiro fixado ao grupo imino da biotina para formar carboxi-biotina, o qual em uma segunda etapa passa o CO_2 ao substrato, por exemplo, piruvato.

Numerosos derivados da biotina estão disponíveis. Biocitina, um aduto de biotina e lisina (N- ϵ -biotinil-L-lisina), é encontrado naturalmente, mas também é sintetizado da biotina e lisina. ⁽²⁵⁾

1.4.4 A Interação avidina-biotina como um sistema de detecção

A interação avidina-biotina pode ser usada para detecção de um número diverso de moléculas de interesse com três diferentes configurações básicas:

(a) Avidina é marcada com uma molécula detectável, por exemplo, uma enzima fluorescente, quimiluminescente, ou sonda radioativa; um metal; ou algum outro grupo específico. A biotina está presente em outro reagente (anticorpo, nucleotídeo, proteína A, lectina, etc.) ligado a molécula de interesse com um sistema de marcação (Figura 1A). Este formato de detecção é amplamente usado para imunensaio, ensaio de hibridação de DNA, imuno-histoquímica, e citometria de fluxo.

(b) Streptavidina é usada sem marcação, servindo para ligar ligantes biotinilados com a molécula de detecção também biotinilada (Figura 1B). Esta variação do sistema possui a vantagem dos múltiplos sítios de ligação da biotina em cada molécula de avidina ou streptavidina. Também é usado amplamente em imunensaio e técnicas de hibridação de DNA, especialmente com sondas que podem ser facilmente biotiniladas (por exemplo, enzimas e moléculas protéicas fluorescentes). ⁽²⁵⁾

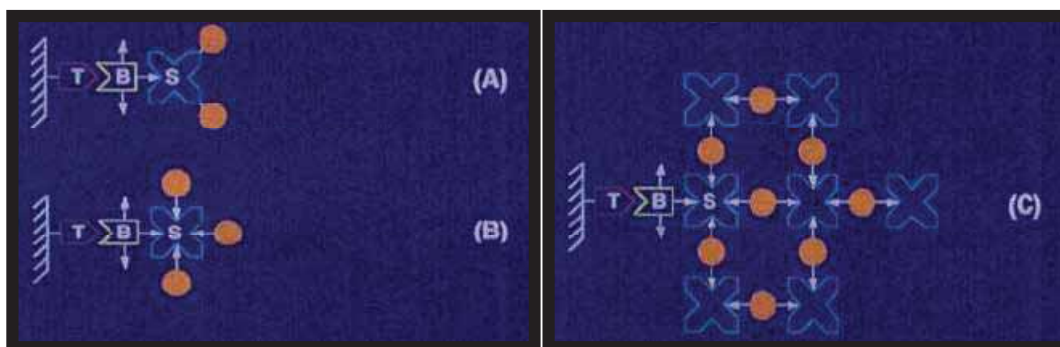


Figura 1 - Configurações básicas do sistema avidina-biotina. Em todos os casos a molécula de interesse T é mostrada imobilizada em um suporte sólido. (A) O ligante específico B da molécula de interesse é biotilado ($\rightarrow$) e a streptavidina S carrega um marcador ●. (B) Mesmo caso de (A), mas a streptavidina é usada sem marcação para ligar o ligante biotilado ao marcador biotilado. (C) Streptavidina sem marcação é misturada ao marcador biotilado para formar um complexo polimérico com alguns dos resíduos ativos de ligação à biotina. Esse polímero liga o ligante biotilado como em (A). (reproduzido de ⁽²⁵⁾).

(c) O terceiro método combina efetivamente os princípios de **(a)** e **(b)** para prover um sistema significativamente mais sensível. A idéia básica é misturar, sob condições controladas, streptavidina sem marcação ou avidina e um reagente biotilado de detecção, por exemplo, uma enzima. Tendo a biotina múltiplos sítios de ligação para a avidina ou streptavidina, pode-se gerar um polímero tendo alguns sítios de ligação na biotina livres. Este reagente é então usado como em **(a)**, mas dispõe de sensibilidade superior. *Kits* oferecem a streptavidina/avidina e enzimas biotiladas à concentrações otimizadas, de modo que pode formar um complexo por simples mistura dos reagentes, estão disponíveis comercialmente e são conhecidos como *Kits ABC (avidin-biotin complex)*. ⁽²⁵⁾

No método de conjugação das nanopartículas luminescentes deve haver uma prévia conjugação do marcador já recoberto com sílica aminofuncionalizada com o sistema biológico de auto-reconhecimento.

De acordo com o esquema da Figura 2, a estratégia básica do método consiste na adesão do anticorpo (primário) não marcado a um antígeno presente no tecido ou célula estudado (o hemicírculo da Figura). Essa adesão é visualizada através da união entre esse anticorpo ao complexo avidina-biotina-enzima. Neste exemplo, a enzima do complexo, que pode ser peroxidase ou fosfatase alcalina, tem a função de converter uma substância adicionada ao processo, denominada cromógeno, em um produto final colorido, que pode ser visualizado ao microscópio.

^[29] No caso do imunoensaio com marcador inorgânico este faz o papel da enzima, e

deve ser acoplado à avidina que por sua vez liga-se à biotina que já foi previamente conjugada ao anticorpo.

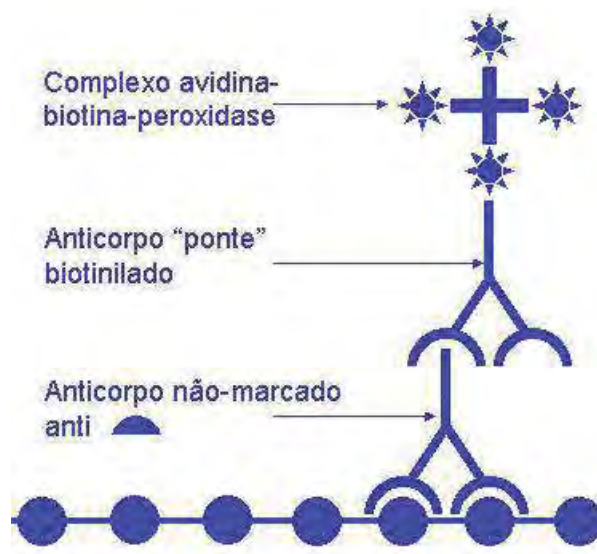


Figura 2 - Complexo avidina-biotina-enzima. Modificado de Falini B, Taylor CR: New developments in immunoperoxidase techniques and their application.

1.5 ALBUMINA SÉRICA BOVINA

O sistema de auto-reconhecimento avidina-biotina, apresenta um custo elevado para ser empregado em testes de conjugação com nanopartículas aminofuncionalizadas. A streptavidina possui estrutura e peso molecular bastante parecido com a albumina, sendo assim, para o desenvolvimento do presente estudo, esta foi escolhida como proteína de trabalho em substituição à streptavidina nas etapas iniciais e de padronização do protocolo.

Albumina geralmente é denominada albumina sérica, vindo da expressão na língua inglesa *bovin seric albumin* (BSA) ou albumina do plasma (para diferenciar da albumina do ovo). É a proteína mais abundante no sistema circulatório, contribuindo em 80% para a pressão osmótica sanguínea coloidal, além de ser a principal responsável pela manutenção de pH do sangue. Em mamíferos é sintetizada inicialmente como pré-pro-albumina pelo fígado. Após a remoção do peptídeo sinalizador, a pro-albumina resultante é processada mais adiante pela remoção de seis resíduos pro-peptídeos da nova terminação N. A albumina livre na circulação possui uma meia-vida de 19 dias. ⁽³⁰⁾

1.5.1 Estrutura da BSA

A partir de experimentos hidrodinâmicos e de espalhamento de raios X de baixo ângulo, albumina sérica foi postulada para ser um elipsóide achatado com dimensões de $140 \times 40 \text{ \AA}$ (Figura 3). Brown e Shockley (1982) compilaram uma variedade diversa de dados, construindo um modelo para a BSA como tendo a forma de um charuto. ⁽³⁰⁾

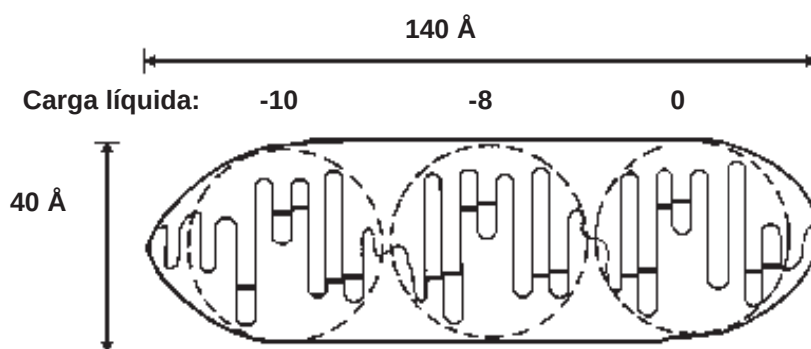


Figura 3 - Percepção clássica da estrutura da albumina sérica (reproduzido de ⁽³⁰⁾).

No entanto, estudos utilizando espectroscopia de prótons por ressonância magnética indicaram que uma estrutura elipsóide achatada da albumina era improvável; então uma estrutura cordiforme foi proposta, em acordo com dados de cristalografia de raios X. Estudos prévios indicaram que a estrutura secundária continha aproximadamente 50% - 68% alfa-hélice e 16% -18% beta-pregueado. Em contraste, de acordo com dados da cristalografia de raios X, não há nenhuma beta-pregueada na estrutura nativa da albumina sérica. Riley e Arndt (1952, 1953) sugeriram que a desnaturação térmica da albumina sérica bovina tem o mesmo tipo fundamental de dobramento das cadeias polipeptídicas, ou seja, como a nativa, a qual é 55% alfa-hélice e 45% conformação aleatória, dados estes obtidos por estudos de espalhamento de raios X. Harmsen e Braam (1969), usando espectros no infravermelho e ORD concluíram que álcali ou desnaturação por calor causam uma perda parcial da estrutura alfa-helicoidal sem a formação de beta-pregueado; no entanto, nos seus espectros no infravermelho, foi observado um ombro em 1620 cm^{-1} para BSA aquecida acima de $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$, indicativo de formação de beta-pregueado. Clark et al. (1981) testando a teoria de Astbury, a partir de testes em BSA usando espectros no infra-vermelho e Raman verificaram que géis formados pelo calor ou proteínas desnaturadas quimicamente surgiram da interação de regiões de beta-

pregueado. Um ombro foi observado nos seus espectros no infra-vermelho a 1620 cm^{-1} para *BSA* aquecida a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ e acima. Os espectros Raman mostraram um aumento da banda em 1235 cm^{-1} e uma diminuição em 940 cm^{-1} para o gel de *BSA*, indicando uma porção contendo alfa-hélice com formação de beta-pregueada. Lin e Koenig (1976) investigaram calor, ácido e desnaturação por álcali de *BSA* através de espectroscopia Raman, encontrando que aquecimento a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou uma mudança em pH abaixo de 5 ou acima de 10, causaram um aumento da banda em 1246 cm^{-1} e uma diminuição da banda em 938 cm^{-1} . A interpretação foi semelhante às de Clark et al., (1981), isso é, uma diminuição no conteúdo de alfa-hélice acompanhado por um aumento em beta-pregueado. ⁽³⁰⁾

Na Figura 4 está representada a seqüência de aminoácidos da albumina bovina. A molécula de *BSA* é composta de três domínios homólogos (I, II, III) que são divididos em nove voltas (L1-L9) através de 17 pontes de dissulfeto. As voltas em cada domínio são compostas por uma seqüência de voltas grande-pequeno-grandes que formam um triplete. Cada domínio por sua vez é produto de dois subdomínios (IA, IB, etc.).

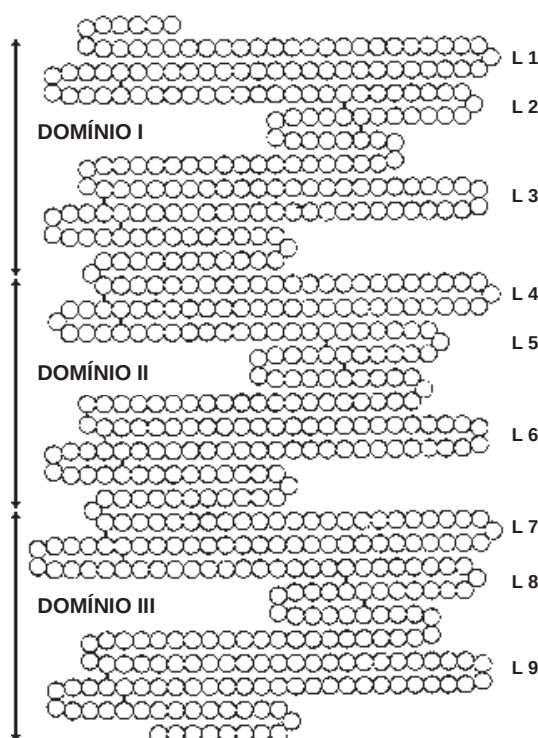


Figura 4 - Seqüência de aminoácidos da albumina bovina, destacando os nove domínios homólogos, ligados por pontes dissulfeto (reproduzido de ⁽³⁰⁾).

A estrutura primária de albumina é incomum entre proteínas extracelulares possuindo um único grupo sulfidril (Cys-34). Segundo dados de cristalografia de

raios X, a estrutura da albumina é predominantemente alfa-helicoidal (67%) com o polipeptídeo remanescente ocorrendo nas voltas e regiões estendidas ou flexíveis entre subdomínios sem beta-pregueado (Figura 5a). Cada um dos domínios pode ser dividido em 10 segmentos helicoidais, 1 – 6 para subdomínio A e 7 – 10 para subdomínio B (Figura 5b). A representação para subdomínio A é mostrada na Figura 5c e para subdomínio B na Figura 5d. Domínios I e II e domínios II e III estão conectados por extensões helicoidais de 10 (I) – 1 (II) e 10 (II) – 1 (III), criando as duas hélices mais longas em albumina. ⁽³⁰⁾

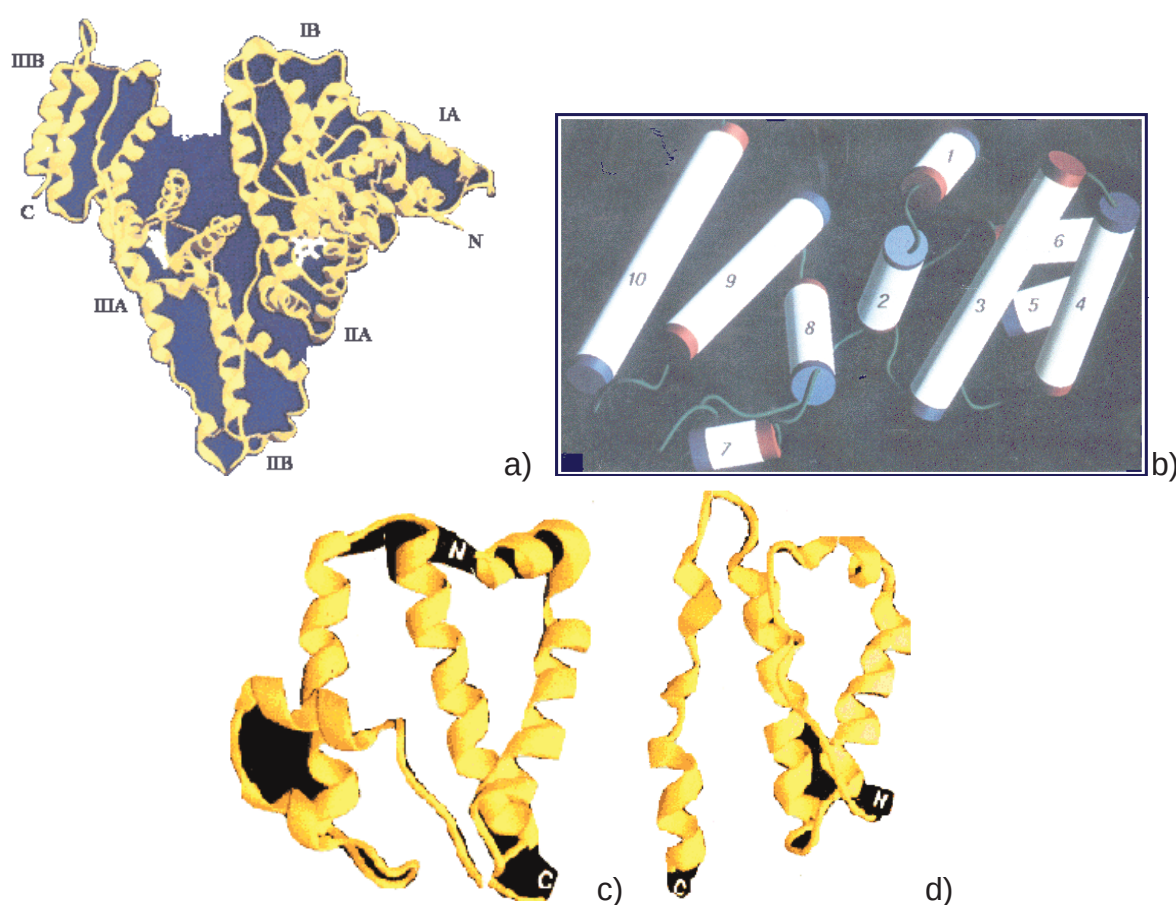


Figura 5 - a) Estrutura da albumina com o polipeptídeo remanescente ocorrendo nas voltas e regiões estendidas ou flexíveis entre subdomínios sem beta-pregueada. B) Divisão dos domínios em segmentos helicoidais. c) Subdomínio A. d) Subdomínio B (reproduzido de ⁽³⁰⁾).

2 OBJETIVOS

O objetivo geral foi desenvolver e aprimorar protocolos de conjugação entre nanomarcadores luminescentes recobertos com sílica aminofuncionalizada e proteínas ou moléculas de interesse biológico utilizadas em imunoenaios. Assim, foi necessário proceder a uma escolha cuidadosa do *crosslinker* a ser utilizado, pois desempenha papel fundamental ao ligar o luminóforo à proteína.

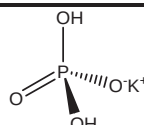
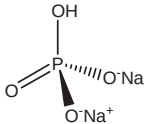
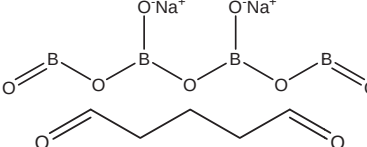
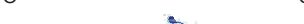
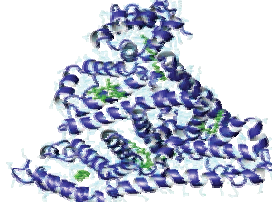
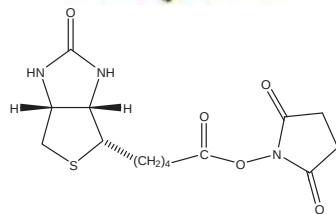
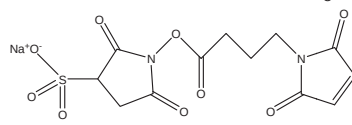
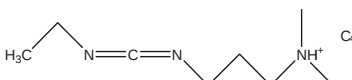
Desta forma, os objetivos específicos foram:

- A partir dos protocolos desenvolvidos com *crosslinker* homobifuncional glutaraldeído, verificar, após a modificação desse tipo de reagente de ligação cruzada por outro de natureza diferente, heterobifuncional, o comportamento da ligação luminóforo-proteína. Tal alteração implica em aperfeiçoar o protocolo de conjugação, estabelecendo comparativos entres os dados experimentais já obtidos e as possíveis vantagens resultantes dos *crosslinkers* a serem utilizados, uma vez que no caso de empregar *crosslinkers* heterobifuncionais, a possibilidade de ocorrer ligação cruzada intramolecular e/ou polimerização entre as nanopartículas aminofuncionalizadas pode ser nula;
- Após comparação dos dados resultantes da variação dos *crosslinkers*, selecionar aquele que apresentar melhor resultado para ser empregado em imunoenaios.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

No presente trabalho foram utilizados vários reagentes para a conjugação do luminóforo à proteína, além dos testes de auto-reconhecimento avidina-biotina. A Tabela 1 relaciona todos os reagentes empregados.

Tabela 1. Características dos reagentes utilizados na conjugação das nanopartículas aminofuncionalizadas com a proteína albumina/streptavidina e teste para o sistema de auto-reconhecimento avidina-biotina.

Reagentes utilizados	Fórmula	Estrutura	Massa molecular (g.mol ⁻¹)
Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄		136,09
Cloreto de sódio	NaCl		58,44
Fosfato ácido de sódio	Na ₂ HPO ₄		141,96
Cloreto de potássio	KCl		74,55
Tetraborato de sódio	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O		100,12
Glutaraldeído em água 1,2 % (m/v)	C ₆ H ₈ O ₇		100,12
Albumina sérica bovina	-		66*
Streptavidina de <i>Streptomyces avidinii</i>	-		60*
N-Hidroxisuccinimidabiotina	C ₁₄ H ₁₉ N ₃ O ₅ S		314,38
Sulfo-N-succinimidil 4-maleimido-butirato sal de sódio (Sulfo-GMBS)	C ₁₂ H ₁₁ N ₂ NaO ₉ S		382,28
Cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC)	C ₈ H ₁₇ N ₃ · HCl		191,70

*Unidade = Kda.

3.1 RELAÇÃO DE EQUIPAMENTOS DE APOIO UTILIZADOS

- Micropipeta - *Gilson*
- Balança analítica - *AB204 Metter Toledo*
- Aparelho de ultra-som - *Ultracleaner 700 Merse*
- Centrífuga - *Microfuge Life Beackman*
- pHmetro - *PG2000 Gehaka*

3.2 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LUMINESCENTES

O luminóforo de $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$ (1%, 2% em mol) em estrutura cúbica, grupo espacial Ia_3 , foi previamente preparado empregando-se o método Pechini modificado^(31, 32, 33), utilizando etilenoglicol e sorbitol como agentes polimerizantes. Neste método, uma resina polimérica precursora é obtida a partir da mistura dos nitratos dos metais envolvidos, mais etilenoglicol ou sorbitol e ácido cítrico, a qual é aquecida em chapa sob agitação para início da eliminação da matéria orgânica, sendo posteriormente colocada em forno mufla por 4 horas a 750° C, seguida de reaquecimento a 800° C por duas horas. Após cada etapa de aquecimento, a amostra é deixada esfriar a temperatura ambiente para início do novo aquecimento. As partículas obtidas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de luminescência com excitação na região do UV-VIS e também no IV próximo. É importante destacar que, com a utilização do agente polimerizante sorbitol, estima-se que este produziu um luminóforo com melhor desempenho luminescente relativamente à amostras preparadas utilizando etilenoglicol.

Após obtenção do luminóforo, este foi recoberto com sílica aminofuncionalizada.^(34, 38) No entanto, essas partículas tiveram que passar por um tratamento de desagregação e separação de tamanho, já que sua rota de síntese levou a formação de aglomerados considerados grandes. Assim, quantidades pré-determinadas das nanopartículas foram suspensas em quantidades suficientes de água sob agitação em ultra-som (US), sendo posteriormente centrifugadas a 4000 rpm por 30 minutos e separadas, esse procedimento sendo repetido 3 vezes.

As partículas que decantaram nesse processo foram secas em estufa a 60° C e quantificadas. Por diferença de massa as nanopartículas que permaneceram em suspensão foram determinadas. Posteriormente foram adicionadas a essas nanopartículas suspensas quantidades estequiométricas de etanol e água. Em algumas amostras foram adicionadas também surfactante Triton X-100, que a princípio tinha somente a função de melhorar a dispersão das nanopartículas, no entanto, estudos realizados no grupo de pesquisa demonstraram que o surfactante também contribuía na formação de sílica esférica. O pH foi ajustado ~10 com NH_4OH para favorecer as reações de hidrólise e condensação dos alcóxidos. A esta solução resultante adicionou-se 1 mL a cada 30 minutos de uma mistura 10 mM de TEOS (tetraetoxisilano) e APTS (3-aminopropiltietoxisilano) numa proporção de 5:3 sob agitação magnética constante, ao final dos acréscimos dos silanos a solução permaneceu sob agitação magnética por mais 2 horas sendo em seguida colocada em repouso over night. As nanopartículas recobertas foram então centrifugadas a 4000 rpm por 30 minutos, separadas e novamente suspensas com novas alíquotas de etanol sob agitação em US. Esse procedimento foi repetido varias vezes para eliminar excessos de reagentes.

A etapa de preparação das nanopartículas luminescentes foi desenvolvida pela Prof^a Dr^a Ana Maria Pires e também pela então aluna de I.C. Sabrina Alessio Camacho, Processo FAPESP n. 2007/05600-5. A etapa de recobrimento do luminóforo e quantificação dos grupamentos amino foram desenvolvidas pelo então aluno de I.C., Marlon Larry Laranja, Processo FAPESP nº 2007/05603-4 e pela aluna de I. C. Thais Cerqueira. Algumas imagens de MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão) foram feitas para as partículas de óxido de ítrio dopado após o recobrimento para avaliar a homogeneidade do mesmo.

Na Tabela 2 estão as principais características relativas às condições de preparo das nanopartículas utilizadas neste trabalho.

Tabela 2. Condições de preparação das nanopartículas utilizadas nas conjugações.

Código do luminóforo antes da funcionalização	Agente polimerizante	Código da amostra após funcionalização	Uso de surfactante Triton X-100 (recobrimento)	Crosslinker empregado para conjugação
YOErYb-EG	Etilenoglicol	RCS2 (1)	Sim	Glutaraldeído
“	“	RCS2 (A)	“	EDC
“	“	RSS1 (2)	Não	Glutaraldeído
“	“	RSS1 (B)	“	Sulfo-GMBS
“	“	RSS1 (5)	“	EDC
“	“	RSS2 (3)	“	Sulfo-GMBS
“	“	RSS2 (6)	“	Glutaraldeído
YOErYb-SB	Sorbitol	RSS1_SB	“	EDC

3.3 PREPARAÇÃO DO TAMPÃO PBS

O tampão PBS 0,01 mol/L (pH 7,30 - 7,60), foi preparado adicionando-se 8 g de NaCl, 1,15 g de Na₂HPO₄, 0,2 g de KCl e 0,2 g de KH₂PO₄. O volume foi completado para 1 L de solução.

3.4 PREPARAÇÃO TAMPÃO BORATO

Preparou-se tampão borato 0,1 mol/L (pH 8,80 - 9,20) pela dissolução de 1,24 g de tetraborato de sódio decaidratado em água deionizada. O volume foi completado para 50 mL de solução.

3.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA CONJUGAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS AMINOFUNCIONALIZADAS COM ALBUMINA E OS CROSSLINKERS GLUTARALDEÍDO E SULFO-GMBS

Tendo a nanopartícula aminofuncionalizada preparada, recoberta e com os grupamentos amino quantificados procedeu-se à etapa de conjugação, representado na Figura 6. ^(35, 36)

A uma amostra de massa conhecida de nanopartículas aminofuncionalizadas foi adicionado de *crosslinker* de interesse, e colocado em agitação em US por 10 minutos, sendo deixado, posteriormente, reagir à temperatura ambiente por 2 horas. Após a ativação das nanopartículas, estas foram centrifugadas (3500 rpm por 30 minutos) a fim de se eliminar o excesso de *crosslinker*, sendo posteriormente lavadas com tampão PBS 0,01 mol/L e novamente centrifugadas. Repetiu-se o procedimento de lavagem e centrifugação por três vezes. Em seguida, uma alíquota de solução 1 mg/mL de albumina diluída em tampão PBS, na proporção de para cada 10 mg de luminóforo utiliza-se 200 µL de solução, foi adicionada à suspensão das nanopartículas ativadas e deixadas sob agitação a 4 °C por 24 horas. Após lavagem com tampão, as partículas foram separadas por centrifugação e analisadas por espectroscopia no UV-VIS para detecção do sistema conjugado nanopartícula-proteína e conseqüente avaliação da eficiência do método de conjugação.

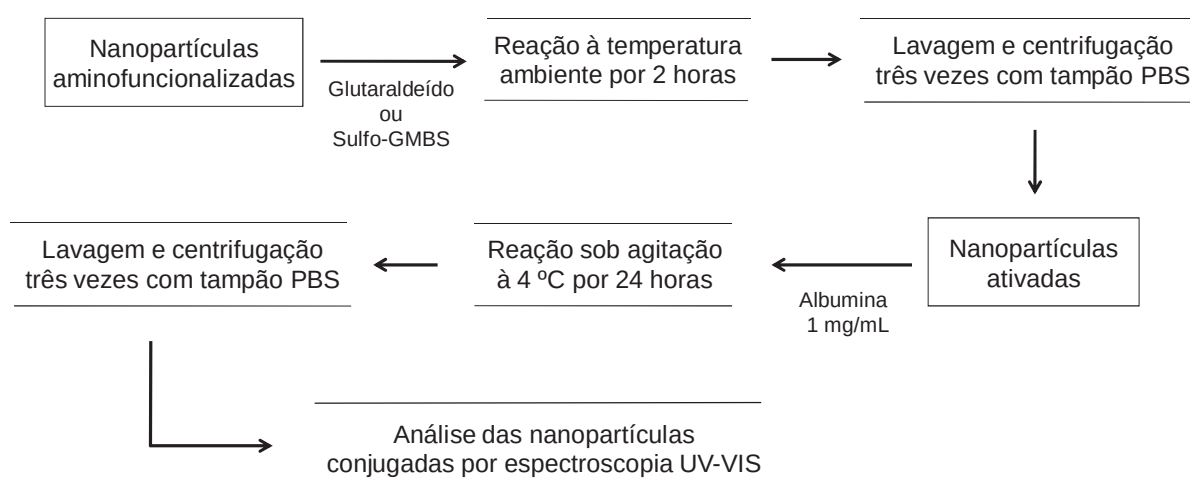


Figura 6 - Fluxograma esquematizando a etapa de conjugação das nanopartículas aminofuncionalizadas com a proteína albumina e os diferentes *crosslinkers* (glutaraldeído ou Sulfo-GMBS).

3.7 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA CONJUGAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS AMINOFUNCIONALIZADAS COM ALBUMINA/STREPTAVIDINA E O *CROSSLINKER* EDC

Na Figura 7, tem-se o fluxograma do procedimento experimental do luminóforo aminofuncionalizado com a proteína albumina/streptavidina e o *crosslinker* EDC. A uma alíquota de solução de albumina/streptavidina 1 mg/mL (na

proporção de para cada 10 mg de luminóforo utiliza-se 200 μ L de solução) foi adicionado um volume conhecido de solução do *crosslinker* EDC em concentração estequiométrica, de acordo com a quantidade de grupos carboxila presentes na albumina (aproximadamente 100 grupos carboxila por molécula ⁽³⁷⁾) e uma estimativa de mesma quantidade desses grupos presentes na streptavidina, e deixado reagir por 2 horas à temperatura ambiente. Após a conjugação com a proteína uma massa conhecida de nanopartículas aminofuncionalizadas foi suspensa (agitação por 10 minutos em US) em 1 mL tampão PBS 0,01 mol/L e a solução adicionada ao conjugado EDC-albumina ou EDC-streptavidina, permanecendo em reação por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida procedeu-se a etapa de lavagem por centrifugação (3500 rpm por 30 minutos) a fim de se eliminar o excesso de *crosslinker*, sendo posteriormente lavadas com tampão PBS 0,01 mol/L e novamente centrifugadas por 3 vezes. Após lavagem com tampão, as partículas foram analisadas por espectroscopia no UV-VIS para detecção do sistema conjugado nanopartícula-proteína e conseqüente avaliação da eficiência do método de conjugação.

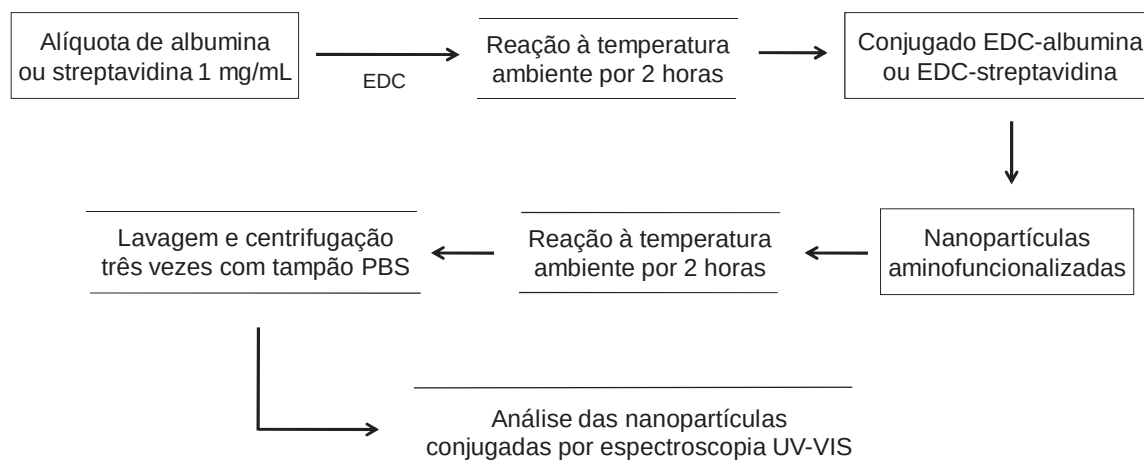


Figura 7 - Fluxograma esquematizando a etapa de conjugação das nanopartículas aminofuncionalizadas com a proteína albumina ou streptavidina e o *crosslinker* EDC.

3.8 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL DE CONJUGAÇÃO DO SISTEMA CONJUGADO LUMINÓFORO AMINOFUNCIONALIZADO-STREPTAVIDINA, VIA EDC, COM A VITAMINA BIOTINA.

Preparou-se uma solução de biotina, dissolvendo-se 2 mg de N-hidroxisuccinimidabiotina em 0,2 mL de tampão borato de sódio, seguindo-se os procedimentos descritos na Figura 8. Ao sistema previamente conjugado, seguindo os procedimentos descritos no item 3.7, contendo luminóforo aminofuncionalizado-streptavidina foi adicionada toda a solução preparada de biotina. O sistema foi deixado em reação à temperatura ambiente por 1 hora e 30 minutos, sendo em seguida transferido para um saco de diálise (Dialysis Tubing Cellulose Membrane – 12000 PM). O conjugado luminóforo-aminofuncionalizado-streptavidina-biotina foi dialisado por 24 horas *over night* em tampão PBS a 17 °C sob agitação. Terminada essa etapa as partículas foram analisadas por espectroscopia no UV-VIS para detecção do sistema conjugado nanopartícula-proteína-vitamina e conseqüente avaliação da eficiência do método.

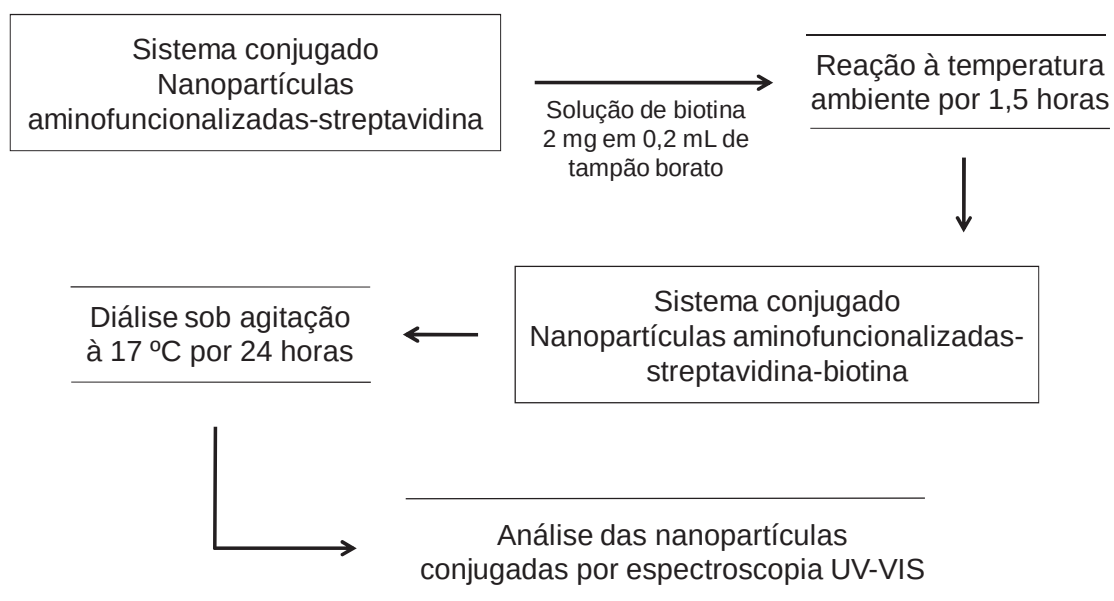


Figura 8 - Fluxograma esquematizando a etapa de conjugação das nanopartículas aminofuncionalizadas com a vitamina biotina (sistema de auto-reconhecimento avidina-biotina) .

Para uma melhor investigação deste sistema conjugado final luminóforo aminofuncionalizado-streptavidina-biotina obtido em suspensão, foi feito um filme cast dessa suspensão. Filmes cast são filmes finos fabricados a partir da deposição de gotas da solução ou suspensão do material de interesse sobre um substrato (de quartzo ou de vidro). No caso deste trabalho, foram realizadas 12 deposições em uma placa de sílica fundida, sendo que entre uma e outra se esperou a secagem ao ar para realização da próxima. Para efeito de comparação o mesmo tipo de filme foi

obtido para a solução de streptavidina pura utilizada nas conjugações. Os filmes produzidos foram caracterizados por Microscopia Óptica, Espectroscopia Raman e de Luminescência.

4 CARACTERIZAÇÃO

4.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para a obtenção das imagens de MEV, foi utilizado o microscópio de varredura JSM-5900LV do Laboratório de Microscopia Eletrônica, LME do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, Campinas, SP. As amostras foram suspensas em solvente adequado (acetona, dimetilsulfóxido ou álcool isopropílico), sob ação de banho de ultra-som. Colocou-se 1 gota da suspensão em suporte metálico previamente recoberto com lamínula de vidro e deixou-se secar em dessecador contendo sílica gel. As amostras depois de secas foram metalizadas com ouro utilizando-se um sistema *Sputter Coater Baltec SCD 050*.

4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para obtenção das imagens de MET, o equipamento utilizado foi o microscópio de transmissão Philips CM200, o qual opera com voltagem máxima de 120 kW, equipado com um Espectrômetro Digital – Prism PGT – Princeton Gamma Tech, do Laboratório de Caracterização Estrutural – LCE, do Departamento de Engenharia de Materiais – DEMA – da Universidade Federal de São Carlos, operado pela Técnica Maria Helena Racy. As amostras foram suspensas em etanol absoluto e nesta suspensão mergulhou-se grade de cobre recoberta com resina polimérica, gentilmente cedidas pela Prof^a. Dr^a. Hebe de Las Mercedes Villullas a pedido do Prof. Dr. Assis Vicente Benedetti.

4.3 ESPECTROSCOPIA DE LUMINESCÊNCIA NO UV-VISÍVEL (EL)

As amostras do luminóforo óxido de ítrio dopado com Er e Yb denominadas YOErYb-EG e YOErYb-SB foram analisadas por Espectroscopia de Fotoluminescência – utilizando o Espectrofotômetro Fluorolog Horiba Jobin Yvon, modelo FL3-222, o qual é equipado com lâmpada de xenônio contínua para análise de Fluorescência e de Fosforescência com excitação no intervalo de 200 a 1000 nm e uma fotomultiplicadora R928 Hamamatsu para detecção do sinal. Este equipamento encontra-se no Departamento de Química Geral e Inorgânica do Instituto de Química (IQ) da Unesp – Araraquara-SP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro.

Já o sistema conjugado $Y_2O_3:Er, Yb$ aminofuncionalizado-streptavidina-biotina via EDC descrito no item 5.11, foi investigado por Espectroscopia de Luminescência no UV-Visível – utilizando o Espectrofluorímetro de bancada PerkinElmer Modelo LS55, o qual é equipado com lâmpada de Xenônio pulsante para análise de Fluorescência e de Fosforescência de 9,9 watt de potência, com indicador de tempo de deterioração/decaimento. Excitação no intervalo de 200 a 800 nm e emissão no intervalo de 200 a 900 nm com comando de ordem zero selecionável. Fotomultiplicadora R928 PMT disponível para toda a escala e sincronicidade de varredura com comprimento de onda constante ou da diferença de frequência incluída. Os espectros de excitação são corrigidos automaticamente. Fenda de excitação variável de 2,5 nm até 15 nm e fenda da emissão de 2,5 nm até 20 nm, com incremento de 0,1 nm. As velocidades da varredura podem ser selecionadas em incrementos de 1 nm e velocidades de varredura de 10 à 1500 nm/minuto. Está também equipado com uma roda de filtros controlada por software no monocromador de emissão com filtros de interrupção de 290 nm, 350 nm, 390 nm, 430 nm e 515 nm, um atenuador de 1% T e feixe desobstruído. No caso das medidas efetuadas neste equipamento, utilizou-se acessório para amostra sólida com detecção do tipo front face e suporte de sílica fundida para acondicionar a amostra.

4.4 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO UV-VIS

O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-1601, feixe duplo, lâmpada de deutério, disponível no Laboratório de Bioquímica de Carboidratos, Faculdade de Ciências e Tecnologia - UNESP de Presidente Prudente, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes Corradi Custódio da Silva. Para a obtenção dos espectros, acondicionou-se as amostras, suspensas em tampão PBS, e a referência (tampão PBS) em cubetas de quartzo, ambas com 1 cm de caminho óptico. No caso da cubeta contendo a amostra, a cubeta possui um volume de até 1 mL. Então se realizou uma varredura de 760 a 190 nm, com velocidade média e intervalo de aquisição de dados de 0,5 nm. Todos os dados para compor os espectros foram adquiridos por meio do software UV-Probe interligado ao aparelho.

4.5 MICROSCOPIA ÓPTICA

Para a aquisição de imagens superficiais dos filmes *cast* obtidos para as suspensões do conjugado final e da streptavidina, descritos no item 3.8, utilizou-se um microscópio da marca Leica DMRX e um computador Pentium III acoplado a uma câmera digitalizadora Exwave HAD, Sony, modelo SSC-DC54A, disponível no Laboratório de Microscopia e Preparação de Amostras sob responsabilidade da Profa. Dra. Ana Maria Osório Araya Balan, no DFQB, FCT-UNESP. A análise microscópica de cada filme foi realizada com aumento de 50, 100, 200 ou 500 vezes, sendo registradas imagens representativas do sistema analisado.

4.6 MICROSCOPIA RAMAN

Espectros de espalhamento Raman foram registrados para os filmes *cast* obtidos da suspensão do conjugado final e da streptavidina, descritos no item 3.8, utilizando-se um Espectrógrafo micro-Raman Renishaw modelo in-Via equipado com um microscópio Leica série DMLM para focar as amostras, detector CCD Peltier e plataforma móvel (XYZ), cujo passo mínimo é de 0,1 μm , onde são colocadas as amostras. Imagens dos locais analisados foram adquiridas no momento de ajuste do

foco do laser. Foi utilizado laser em 633 nm, cuja potência máxima incidida nas amostras era da ordem de 1,5 μW . O espectrógrafo é equipado com redes de difração com 1800 e 1200 l/mm permitindo que os espectros sejam coletados com uma resolução de cerca de 4 cm^{-1} . Várias porcentagens da máxima potência do laser foram utilizadas para se chegar ao espectro com a relação sinal/ruído mais adequada. Este equipamento está disponível no Laboratório de Filmes Finos e Espectroscopia Raman, sob responsabilidade do Prof. Carlos José Leopoldo Constantino, no Departamento de Química, Física e Biologia da FCT-UNESP.

4.7 SISTEMÁTICA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS VIA ESPECTROSCOPIA UV-VIS DA CONJUGAÇÃO ENTRE A AMOSTRA $\text{Y}_2\text{O}_3\text{:ER,YB}$ AMINOFUNCIONALIZADA E PROTEÍNA UTILIZANDO-SE OS DIFERENTES *CROSSLINKERS* EM COMPARAÇÃO COM OS REAGENTES PUROS

Para cada conjugação realizada a exposição dos dados obtidos por espectroscopia foi disposta em duas Figuras, uma com os espectros organizados de forma mais geral, sem ressaltar os deslocamentos de bandas e com uma resolução para análise diminuída. No entanto, na outra Figura são apresentados dois conjuntos de espectros com as curvas em comparação separadas em dois intervalos de comprimento de onda: de 200 a 240 nm e de 240 a 340 nm. Assim, há uma ampliação mais evidente dos deslocamentos de bandas, além de permitir uma discussão consistente ao relacionar os dados. Vale ainda destacar que em algumas curvas foi necessário realizar um tratamento aplicando a ferramenta *Smoothing* disponível no editor de gráficos Origin Pro 7.0[®] para melhorar a resolução das mesmas e para que seus picos de maior intensidade pudessem ser observados claramente.

Na sequência dos gráficos constituíram-se tabelas com os dados obtidos experimentalmente a fim de imprimir o perfil dos deslocamentos ocorridos entre os sistemas puros e o conjugado final, revelando se houve deslocamento para comprimento de onda menor (deslocamento para o azul) ou se para comprimento de onda maior (deslocamento para o vermelho).

Uma ultima observação a ser destacada é que em cada caso as bandas foram integradas para obtenção de seus valores de máximo de absorção.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A técnica de MEV foi utilizada para avaliação da forma e tamanho das partículas obtidas antes do recobrimento com sílica aminofuncionalizada.

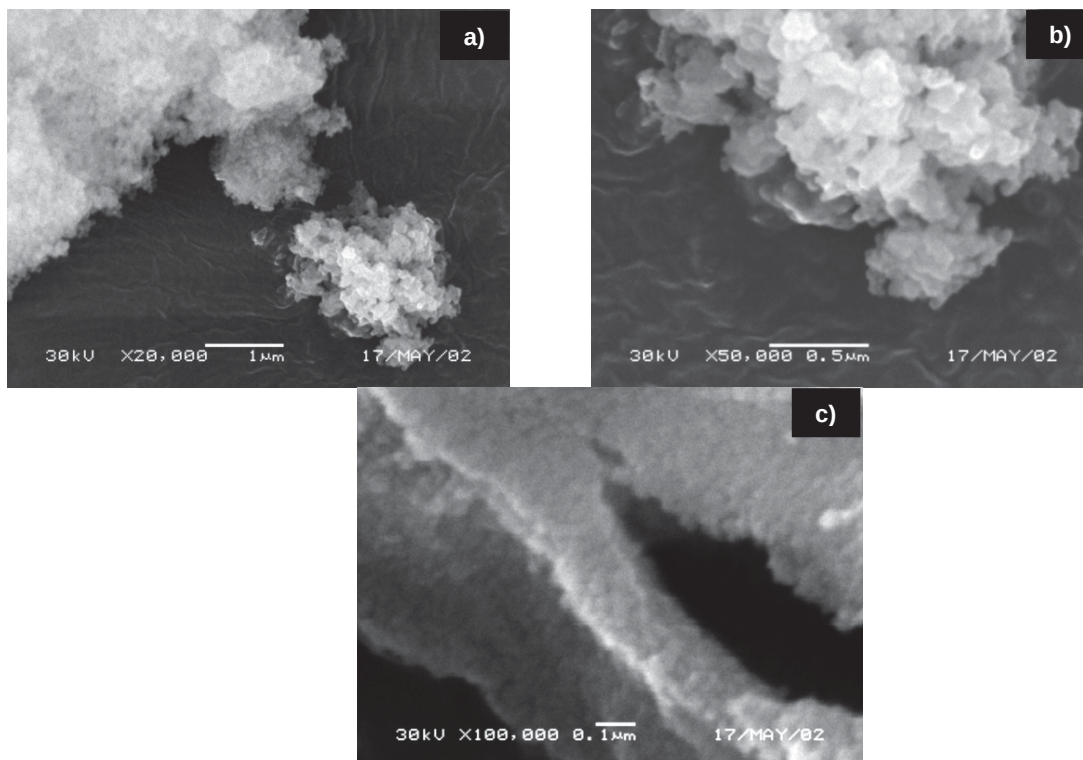


Figura 9 - Imagens de MEV obtidas para amostras de óxido de ítrio dopado a partir da resina polimérica preparada pelo método Pechini utilizando etilenoglicol como agente polimerizante, a) imagem aumentada em 20.000 vezes, b) imagem aumentada em 50.000 vezes, c) imagem aumentada em 100.000 vezes.

Com a ampliação de 100.000 vezes na Figura 9 c), é possível observar que as partículas são bastante homogêneas em tamanho, formando aglomerados. Por ampliação da imagem e análise dos contornos das partículas estima-se que tenham um diâmetro da ordem de 50 nm.

5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Analisando-se as imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), o uso da mistura TEOS/APTS leva ao recobrimento das nanopartículas, onde é possível observar uma camada com contraste diferenciado em torno das mesmas, atribuída à presença de sílica amorfa superficial e esférica. A existência da sílica no meio recobrindo o luminóforo foi comprovada anteriormente, assim como a natureza das esferas observadas, a partir da técnica de Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X, mais conhecida pela sua sigla vindo da língua inglesa, *EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy)*, quando do recobrimento do luminóforo $\text{Y}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Er},\text{Yb}$ em trabalho anteriormente publicado ⁽³⁸⁾, sendo que os mesmos parâmetros foram mantidos para a aminofuncionalização de todas as amostras de $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er},\text{Yb}$.

As Figuras de 10 a 12 apresentam as imagens de MET das amostras recobertas. A primeira a ser analisada é a de código RCS2, na qual se utilizou para o recobrimento surfactante Triton X-100. A partir da observação das imagens nota-se que a amostra RCS2 apresenta esferas de sílica no meio, juntamente com as partículas recobertas.

Na Figura 10, itens a), b) e h) é possível visualizar esferas de sílica com um contraste mais escuro na borda e no seu interior mais claro, com aparência de cerne oco. Também o tamanho das esferas varia muito, de 230 nm até 700 nm. Na Figura 10 c) tem-se duas esferas com diâmetro em torno de 700 nm envoltas por mais uma camada de sílica, com partículas aderidas, e com formato ligeiramente deformado. A espessura das bordas externas dos aglomerados de partículas recobertas também está em torno de 12 nm, indo até valores maiores, dependendo da posição. Vale ressaltar que mesmo apresentando uma quantidade razoável de sílica esférica no meio, também há sílica amorfa recobrindo o luminóforo.

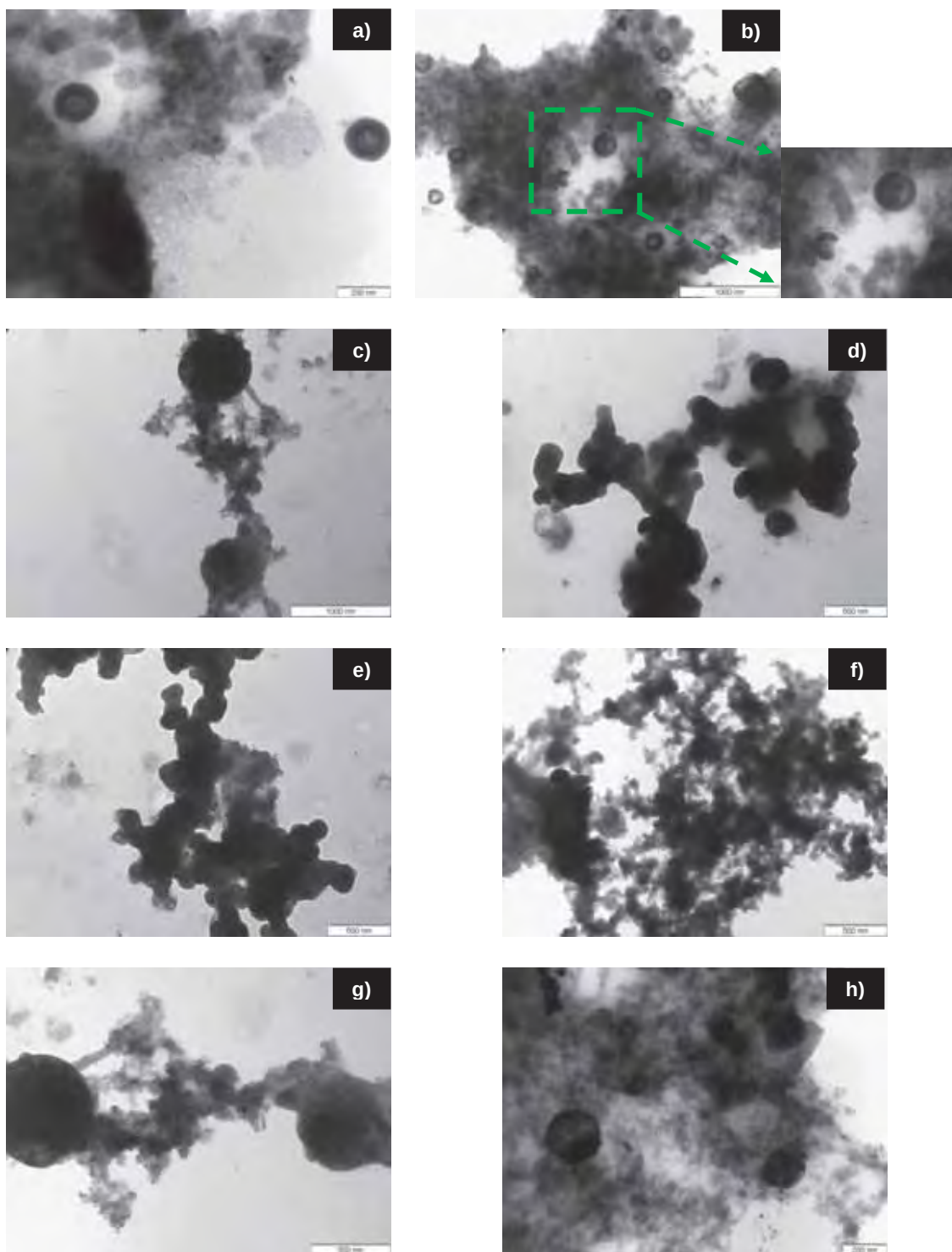


Figura 10 - Imagens de MET da amostra RCS2, a) sílica formando aglomerados, com presença de sílica esférica, b) em destaque esferas de sílica, c) esferas de sílica com diâmetro aproximado de 700 nm, d) em destaque aglomerados de sílica, e) aglomerado de sílica visto por outro ângulo, f) visão mais geral dos aglomerados sílica, g) em destaque esferas de sílica com diâmetro em torno de 500 nm, h) sílica esférica em destaque.

Nas Figuras 11 e 12 têm-se as imagens das amostras recobertas (RSS1 e RSS2) sem a presença de surfactante e com também a presença de sílica esférica.

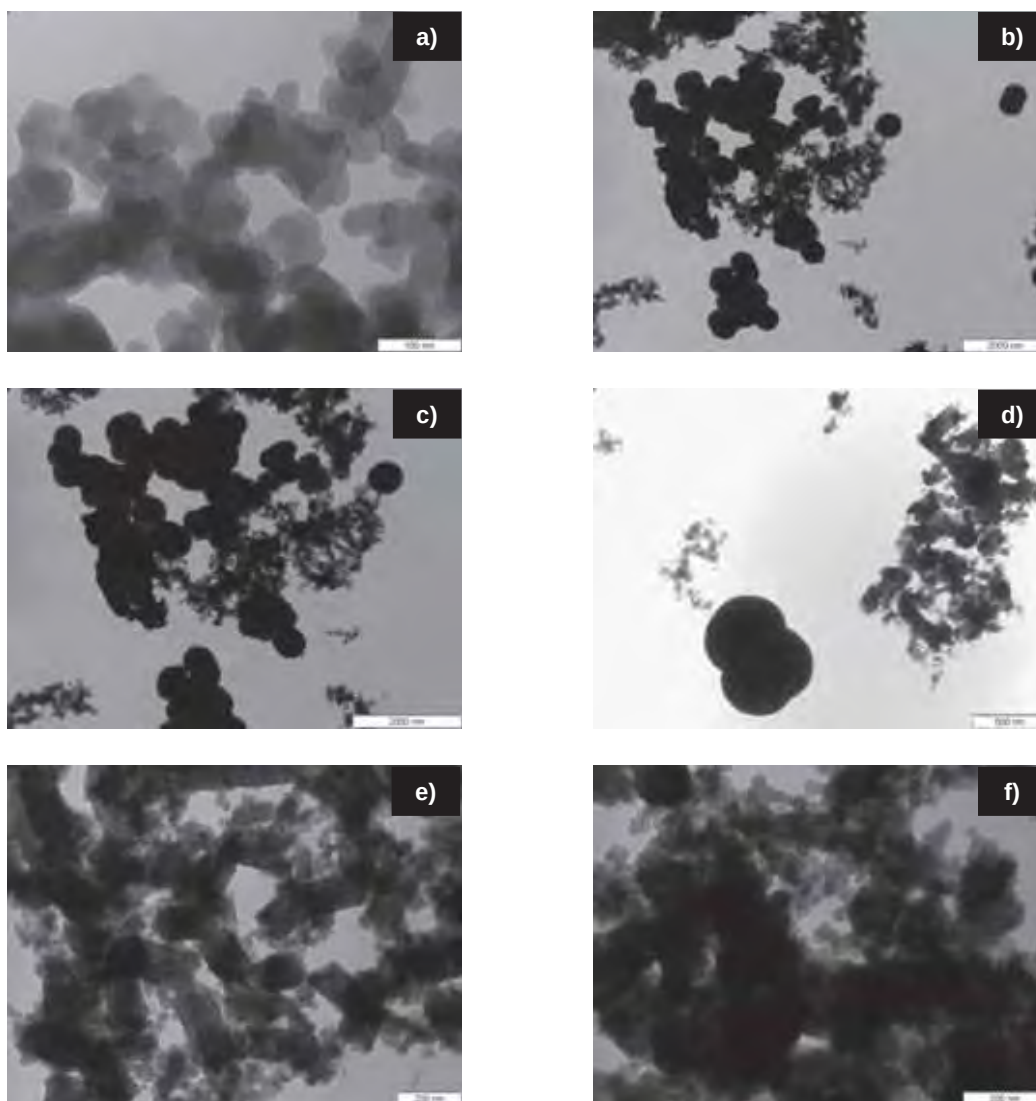


Figura 11 - Imagens de MET da amostra RSS1, a) predominância de aglomerados de sílica, b) destaque para esferas de sílica, c) imagem ampliada das esferas de sílica, d) aglomerado de sílica esférica em destaque, e) aglomerados sem a presença de sílica esférica, f) novamente aglomerados de sílica sem a presença de sílica esférica.

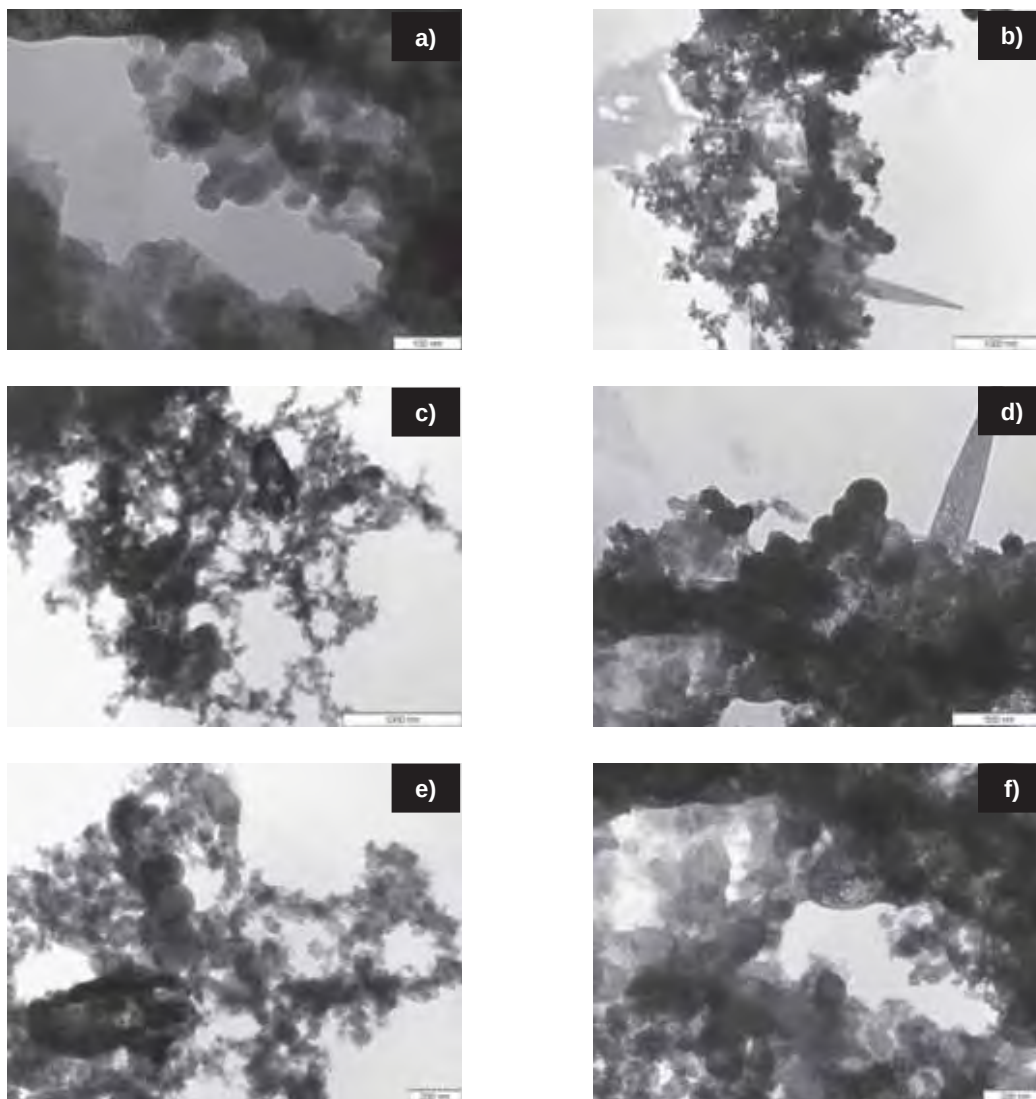


Figura 12 - Imagens de MET da amostra RSS2, a) presença de sílica formando aglomerados, b) uma visão mais geral dos aglomerados de sílica, c) aglomerados de sílica com presença de esferas de sílica, d) região com algumas esferas de sílica em destaque, e) outro ângulo onde a presença de sílica esférica é notada, f) aglomerado de sílica.

Faz-se necessário citar que a formação de esferas de sílica pode ocorrer por duas vias: método Stöber e formação de micela inversa (uso de surfactante). Esses processos concomitantes no meio são responsáveis pela grande variação de tamanho da sílica esférica formada.

O método Stöber se baseia na hidrólise e condensação de um alquil silicato em solução alcoólica na presença de água e amônia. A formação de esferas e o seu tamanho relativo são dependentes da concentração de silano no meio e da interferência das partículas em suspensão durante o processo de polimerização. No entanto, os mecanismos envolvidos no método Stöber ainda são motivo de discussão. ^(39, 40, 41)

O outro processo concomitante que pode levar à formação de esferas de sílica na etapa de aminofuncionalização deve-se a presença de surfactante no meio a partir do surgimento de micelas inversas. Cada micela é composta por certo número de moléculas de tensoativo, denominado como número de agregação, que rege geralmente o tamanho e a geometria do sistema micelar. O termo “micela normal” é utilizado para se referir a agregados de tensoativos em meio aquoso. A estrutura da micela normal formada indica que o grupo cabeça hidrofílico está direcionado para o contato com a solução aquosa formando uma superfície polar, enquanto que a cadeia linear (cauda) está em sentido inverso ao da água, formando um núcleo central não polar. A formação de associações de colóides pode também ocorrer em vários solventes não-polares; neste caso, os agregados dos tensoativos são denominados “micelas reversas” ou “micelas invertidas”. Nos sistemas de micelas reversas, as cabeças polares dos anfifílicos estão concentradas no interior do agregado e por esta razão formam um núcleo central hidrofílico. ⁽⁴²⁾

5.3 ESPECTROSCOPIA DE LUMINESCÊNCIA

Todos os luminóforos utilizados para o recobrimento com sílica aminofuncionalizada e posteriormente utilizados nos protocolos de conjugação, Tabela 2, foram previamente caracterizados por espectroscopia de luminescência a fim de avaliar os processos ópticos relativos aos íons dopantes Er^{3+} e Yb^{3+} , quando submetidos à excitação em comprimentos de onda diferentes de excitação, ou seja, 380 nm (UV) e 980 nm (IV). A amostra RSS1_SB foi escolhida para finalização dos testes de conjugação porque, dentro do trabalho desenvolvido pela então aluna Sabrina Alessio Camacho o uso de sorbitol no lugar de etilenoglicol levou à formação de um luminóforo com maior intensidade relativa de emissão. Com exceção da intensidade de luminescência, todas as demais características ópticas dos luminóforo preparados, independente do agente complexante, são idênticas. Dados de espectroscopia vibracional de absorção no IV das amostras preparadas a partir de etilenoglicol e sorbitol foram correlacionados com os resultados de luminescência, sugerindo que o uso de sorbitol deve estar influenciando a etapa de polimerização da resina precursora. O agente polimerizante utilizado – sorbitol, que possui uma estrutura molecular maior que o etilenoglicol, gera um precursor

polimérico que ao ser calcinado deve promover um aumento do crescimento do grão, com diminuição da área superficial, e que deve estar favorecendo a diminuição de espécies desativadoras da luminescência na superfície das partículas formadas. Estas espécies desativadoras podem ser moléculas do tipo carbonato, água e outros grupos cujas vibrações estão afetando os mecanismos de excitação e de emissão do luminóforo via perda de energia por processos não radiativos. Estes estudos ainda estão em andamento para complementação dos resultados e comprovação das explicações sugeridas.

Desta forma, na Figura 13 estão apresentados os espectros de emissão dos luminóforos YOErYb-EG e YOErYb-SB antes da aminofuncionalização, preparados utilizando etilenoglicol e sorbitol, respectivamente, e citados na Tabela 2. Para aquisição destes espectros, foi fixada a excitação 380 nm (UV) relativa à transição $^4I_{15/2} \rightarrow ^4G_{11/2}$, característica do érbio(III), de acordo com dados encontrados na literatura ^[43] que relatam o espectro de absorção no UV-VIS deste íon.

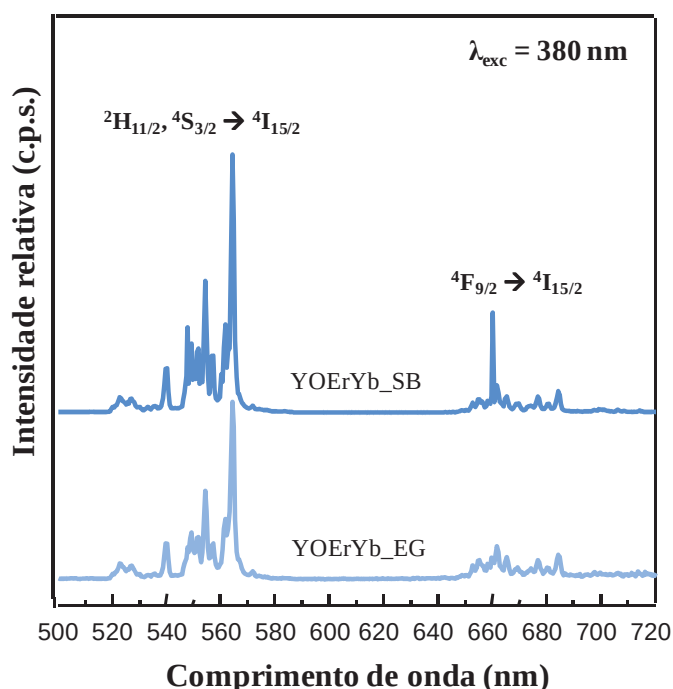


Figura 13 - Espectros de emissão a temperatura ambiente dos luminóforos YOErYb-EG e YOErYb-SB, sob excitação no UV em 380 nm, antes da aminofuncionalização.

Quando a fonte de excitação aplicada é UV, somente o Er(III) absorve e não há transferência de energia entre os íons dopantes, ocorrendo então o processo usual denominado Stokes. ⁽⁴⁴⁾ O processo Stokes então consiste da absorção direta da excitação pelo centro ativador (Er^{3+}) e seu retorno ao estado fundamental se

traduz em emissão na forma de fótons (Luminescência) e em dissipação de calor. Essa forma de excitação é pouco eficiente, pois os íons lantanídeos não possuem absorvidades molares suficientemente altas para que o mesmo íon possa absorver a energia de excitação e emití-la. Desta forma, analisando-se os espectros da Figura 13 observam-se as transições características do íon Er^{3+} no verde $^2\text{H}_{11/2}, ^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ entre 520 e 570 nm e no vermelho $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$, entre 650 e 670 nm, ^(45, 46, 47) sem alteração de posição ou intensidade relativa, o que comprova a reprodutibilidade quanto ao ambiente químico ocupado pelo íon ativador. Assim, é possível verificar também que a utilização de sorbitol não altera a estrutura local do sistema, mas leva a uma intensidade relativa de emissão maior do que quando o material é preparado com etilenoglicol.

Já na Figura 14, sob excitação no IV próximo, ou seja, 980 nm, é possível observar nos espectros a reprodutibilidade das linhas de transição características do íon Er^{3+} no verde - $^2\text{H}_{11/2}, ^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ entre 510 e 570 nm. No entanto, não se detecta a transição correspondente ao vermelho $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ entre 630 e 680 nm, como apresentado na Figura 13. Este fato está relacionado à baixa sensibilidade do detector nesta região do vermelho, assim como da emissão mais fraca da lâmpada de Xe no comprimento de onda selecionado de 980 nm. Logo, não é possível por meio destas medidas a caracterização da transição no vermelho, já que se observa apenas ruído.

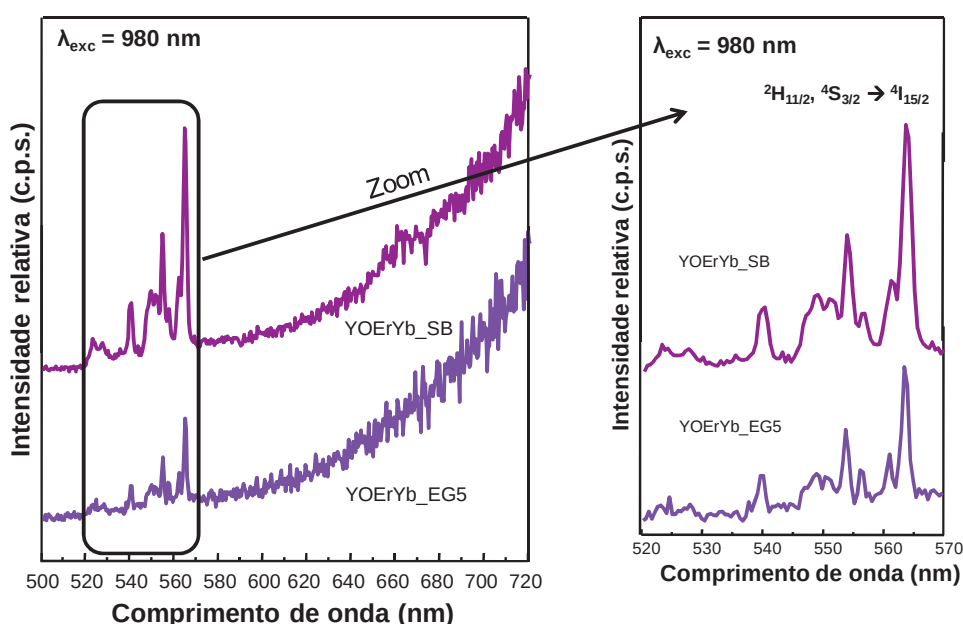


Figura 14 - Espectro de emissão do luminóforo RSS1_SB antes da aminofuncionalização, denominado YOEryb_SB, com excitação no IV em 980 nm.

Estudos sobre a dependência energética do processo de conversão ascendente revelaram que os estados emissores de luz verde ($^2H_{11/2}$, $^4S_{3/2}$) são populados através de um processo de dois fótons, típico dos materiais contendo o par Er^{3+}/Yb^{3+} . A população desses estados ocorre geralmente via duas transferências sucessivas de energia de íons Yb^{3+} para íons Er^{3+} (ambos no estado excitado $^2F_{5/2}$), excitando primeiramente para o estado intermediário $^4I_{11/2}$ e, posteriormente, para o estado excitado $^4F_{7/2}$ ^(48, 49) (Figura 15). Pode haver também um decaimento não radiativo do íon para um nível de menor energia, $^2H_{11/2}$ e $^4S_{3/2}$, resultando em emissão no verde. Alternativamente, ele pode decair não radiativamente para o estado $^4F_{9/2}$, levando à emissão no vermelho, de acordo com estudos da dependência energética, demonstrando que este nível envolve um processo de dois fótons ⁽⁵⁰⁾.

O estado $^4F_{9/2}$ também pode ser populado por meio de outro mecanismo de dois fótons, que excita diretamente o estado, ao contrário da população por relaxamento não-radiativo do estado $^4S_{3/2}$ mais energético. Após a primeira transferência de energia entre os íons Er^{3+}/Yb^{3+} , o érbio(III), no estado intermediário, $^4I_{11/2}$, pode decair não radiativamente para um estado de nível energético inferior, $^4I_{13/2}$. Ocorre, então, subsequente, uma transferência de energia do íon excitado, Yb^{3+} , diretamente para o íon Er^{3+} do estado $^4F_{9/2}$ para $^2H_{9/2}$, levando a emissão no vermelho - $^2H_{9/2} \rightarrow ^4I_{11/2}$ (Figura 15). ⁽⁵⁰⁾

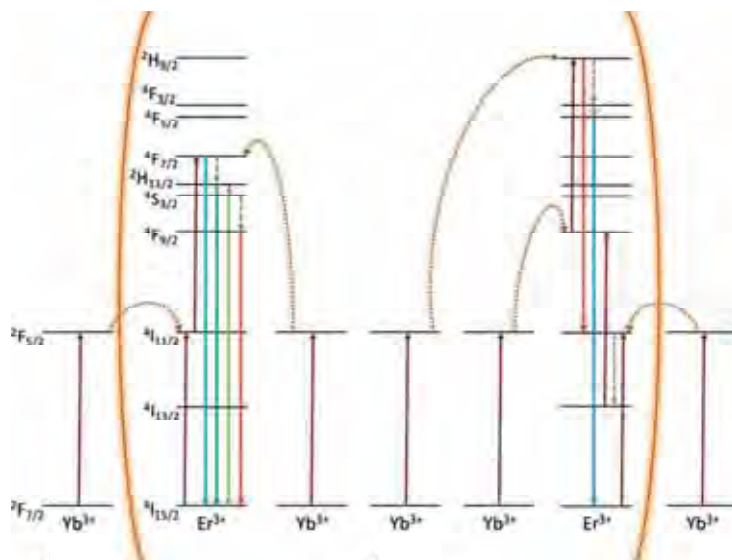


Figura 15 - Diagrama dos níveis energéticos dos íons dopantes Er^{3+} e Yb^{3+} , mecanismos de conversão ascendente, e emissão no visível apresentada com excitação em 980 nm. As setas em marrom (não pontilhadas) representam absorção de energia, as setas coloridas representam emissão no visível, as setas cinza pontilhadas representam relaxamento multi-fóton (decaimento não-radiativo) e as setas marrons curvas representam a transferência de energia. (extraído de ⁽⁵⁰⁾)

5.4 TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA

As nanopartículas aminofuncionalizadas tiveram seus grupos NH_2 quantificados por Titulação Potenciométrica ⁽⁵¹⁾, como pode ser observado nas curvas obtidas, Figura 16.

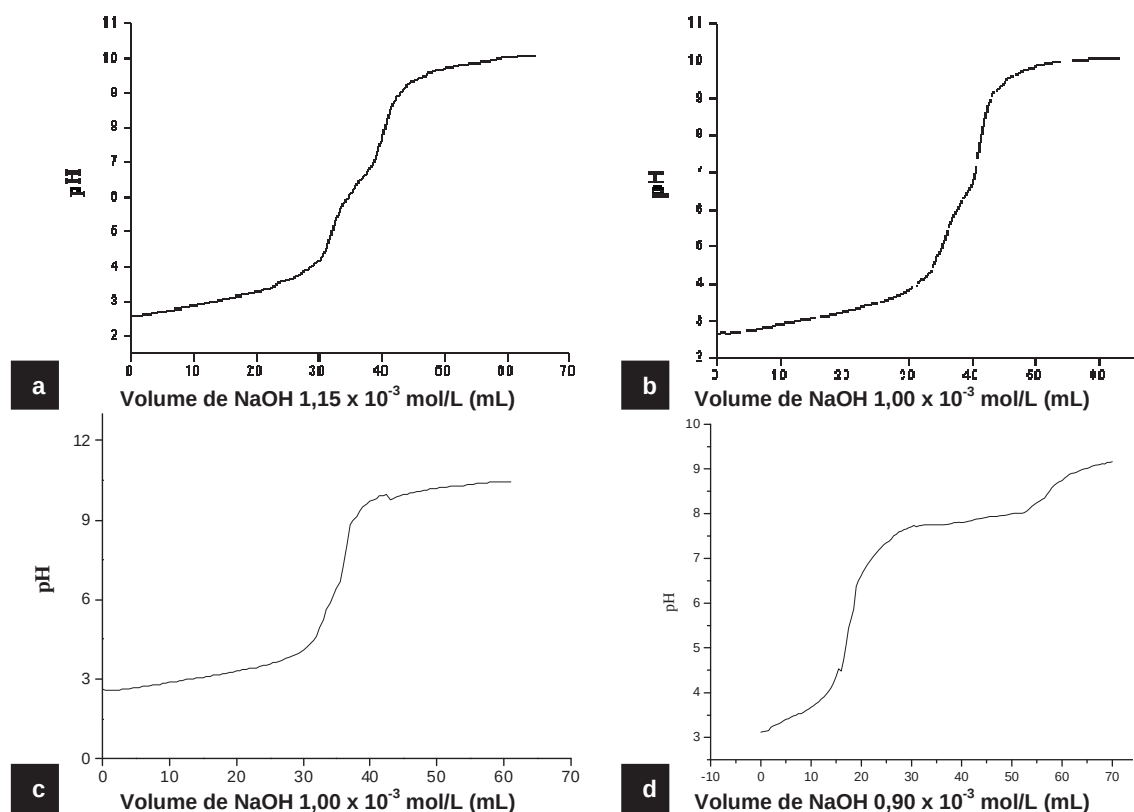


Figura 16 - Curvas obtidas na Titulação Potenciométrica das nanopartículas aminofuncionalizadas, amostras a) RCS2, b) RSS1, c) RSS2, d) RSS1_SB

Observa-se que todos os gráficos apresentam duas inflexões, que são atribuídas às neutralizações dos hidrogênios dos grupos amino presentes nas nanopartículas aminofuncionalizadas. Para se determinar o ponto de cada inflexão foi calculada a 1ª derivada do pH, obtendo-se novos gráficos, Figura 17. A equação pela qual a 1ª derivada pode ser calculada está abaixo representada:

$$\frac{df(x)}{dx} = \frac{f(x + \Delta x) - f(x)}{\Delta x} \cong \frac{\text{pH}(v + \Delta v) - \text{pH}(v)}{\Delta v}, \text{ onde } v = \text{volume de NaOH adicionado}$$

A posição de cada pico é referente ao ponto de cada inflexão observada nas curvas de titulação, e são através desses picos que se determina o volume exato de NaOH utilizado na neutralização de cada hidrogênio do grupo NH_2 . Para a sistematização da determinação da posição dos picos e evitar erros de visualização

foi realizado um ajuste de curvas aplicando a ferramenta *Fit Multi-peaks Lorentzian* disponível no editor de gráficos Origin Pro 7.0[®], a qual utiliza a função de Lorentz para geração de curva calculada.

A adição de HCl nas soluções aquosas onde foram suspensas as nanopartículas para a titulação é realizada para garantir que não se tenha a presença de grupos NH₂ desprotonados, que viriam a gerar erros nos cálculos da quantificação desses grupos.

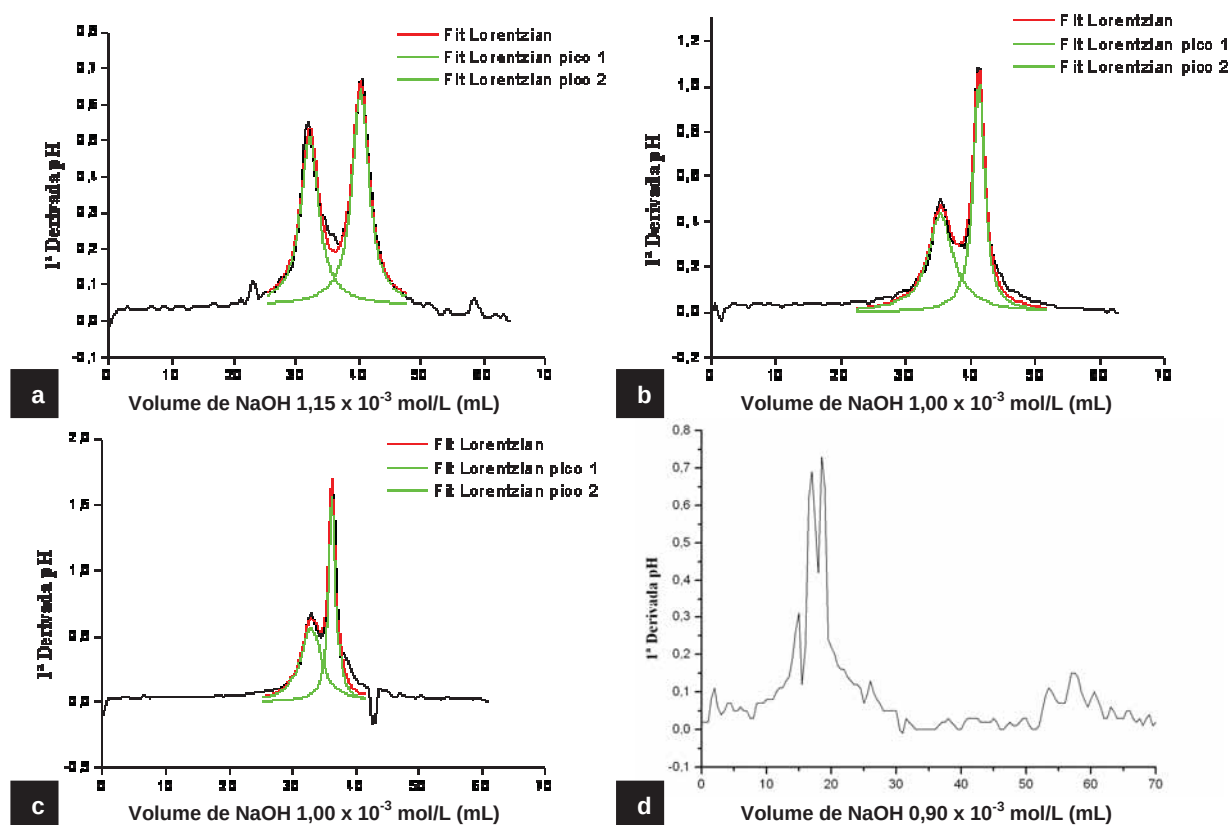


Figura 17 - Gráfico da 1ª Derivada do pH, com aplicação do ajuste de curvas, função Lorentz, para as amostras a) RCS2, b) RSS1, c) RSS2, d) RSS1_SB.

Os dois picos observados nos gráficos da Figura 17 confirmam a presença e dão a posição exata das inflexões vistas nas curvas de titulação da Figura 16. A partir do ajuste das curvas, pode-se determinar então mais precisamente a posição dos picos e efetuar os cálculos para quantificar os grupos amino presentes na amostra. Na Tabela 3, têm-se as posições dos picos bem como a diferença entre eles, que será utilizada no cálculo da quantificação dos grupos NH₂.

Tabela 3. Posição dos picos observados nos gráficos da 1ª derivada do pH x Volume de NaOH, valores gerados pelo ajuste aplicado.

<i>Amostra</i>	<i>1º Pico</i>	<i>2º Pico</i>	<i>2º Pico – 1º Pico</i>
RCS2	32,2 mL	40,3 mL	8,1 mL
RSS1	35,4 mL	41,3 mL	5,8 mL
RSS2	33,0 mL	36,3 mL	3,3 mL
RSS1_SB	17,0 mL	18,5 mL	1,5 mL

As posições desses picos são referentes aos volumes gastos em cada neutralização dos hidrogênios do grupo NH_2 , portanto a diferença entre esses volumes nos dá o volume necessário para a retirada do segundo hidrogênio; com esse volume e a concentração do NaOH pode-se determinar a concentração dos grupos amino como pode ser observado nos cálculos abaixo para a amostra RCS2:

$$M_{\text{NaOH}} = \frac{n_{\text{NaOH}}}{V_{\text{NaOH}}} \rightarrow 115 \times 10^{-3} = \frac{n_{\text{NaOH}}}{8,09 \times 10^{-3}} \rightarrow n_{\text{NaOH}} = 9,30 \times 10^{-6} \text{ mols}$$

Nesse cálculo o número de mols de NaOH corresponde diretamente ao número de mols de NH_2 , logo: $n_{\text{NH}_2} = 9,30 \times 10^{-6}$ mols. Assim pode-se calcular o número de mols de grupos NH_2 por grama de amostra:

$$\begin{array}{ccc} 9,30 \times 10^{-6} \text{ mols} & \frac{16 \times 10^{-3} \text{ g}}{1 \text{ g}} & \\ X \text{ mols} & & \end{array} \quad X = 5,81 \times 10^{-3} \text{ mols/g}$$

Na Tabela 4 estão os valores calculados da concentração desses grupos para cada amostra, após proceder aos cálculos acima representados.

Tabela 4. Concentração dos grupamentos amino presentes nas nanopartículas aminofuncionalizadas.

<i>Amostras</i>	<i>Massa da amostra utilizada (g)</i>	<i>Concentração dos grupos NH_2 (mol/g de amostra)</i>
RCS2	$1,6 \times 10^{-3}$	$5,8 \times 10^{-3}$
RSS1	$7,0 \times 10^{-4}$	$8,3 \times 10^{-3}$
RSS2	$4,0 \times 10^{-4}$	$8,4 \times 10^{-3}$
RSS1_SB	$3,0 \times 10^{-4}$	$4,5 \times 10^{-3}$

A partir dos valores estimados da quantidade de grupos NH_2 por grama de amostra listados na Tabela 4, pode-se observar que todas as amostras apresentam a mesma ordem de grandeza.

5.5 AMOSTRAS UTILIZADAS NAS CONJUGAÇÕES E SUAS CARACTERÍSTICAS

A Tabela abaixo relaciona as amostras de nanopartículas luminescentes $Y_2O_3:Er, Yb$ preparadas, recobertas com sílica aminofuncionalizada, quantificadas em relação à presença de grupamentos amino em sua superfície e conjugadas com diferentes *crosslinkers* à proteína albumina ou streptavidina.

Tabela 5. Características das amostras de nanopartículas luminescentes aminofuncionalizadas $Y_2O_3:Er, Yb$ utilizadas na conjugação a proteína albumina ou streptavidina e diferentes *crosslinkers*.

Código da amostra	Tipo de recobrimento	Massa (mg)	Crosslinker utilizado
RCS2 (1)	Com presença	0,7	Glutaraldeído
RCS2 (A)	surfactante Triton X-100	0,6	EDC
RSS1 (2)		0,9	Glutaraldeído
RSS1 (B)		1,5	Sulfo-GMBS
RSS1 (5)	Sem presença	0,4	EDC
RSS1_SB	surfactante Triton X-100	0,4	
RSS2 (3)		0,8	Sulfo-GMBS
RSS2 (6)		0,6	Glutaraldeído

5.6 MECANISMOS DE REAÇÃO PROPOSTOS PARA A CONJUGAÇÃO ENTRE O LUMINÓFORO AMINOFUNCIONALIZADO E A PROTEÍNA UTILIZANDO OS *CROSSLINKERS* GLUTARALDEÍDO, SULFO-GMBS E EDC

Os mecanismos propostos ⁽⁵²⁾ abaixo representam a reação entre as nanopartículas aminofuncionalizadas e os diferentes *crosslinkers*. Na representação esquemática da reação está indicado o produto principal, que é o conjugado partícula-*crosslinker*-proteína, e o produto(s) secundário(s), os quais, nos processos de lavagem realizados antes da caracterização espectroscópica, são eliminados.

De acordo com a Figura 18, quando glutaraldeído é o *crosslinker* utilizado, pode-se atestar o mecanismo clássico de formação de imina. A amina, após um ataque nucleofílico, liga-se ao grupo carbonila formando um intermediário tetraédrico dipolar. Em seguida, no intermediário formado, há a transferência de próton intermolecular do nitrogênio para o oxigênio produzindo um aminoálcool. Ocorre então a protonação do oxigênio produzindo um bom grupo abandonador seguida de

uma reação de eliminação (E_1), na qual uma molécula de água é perdida com conseqüente produção de um íon imino. Por fim, há a perda de um próton e a produção da imina.

É importante destacar que a formação da imina ocorre mais rapidamente em pH entre 4 e 5. Como o meio em que a reação de conjugação acontece é tamponado e em pH~7,4, a reação é muito lenta. Por isso o protocolo desenvolvido com glutaraldeído promove um tempo de reação inicial de 2 horas entre nanopartículas e o *crosslinker*, que, embora pequeno, devido à estereoquímica, em que os grupos amino estão bastante disponíveis (já que estão bem distribuídos na superfície das partículas) para a reação em relação a uma proteína, é suficiente para a ativação das nanopartículas. Em um segundo momento, para a formação do conjugado final, a reação obedece a cinética imposta pelo pH e se processa muito lentamente, até mesmo pela pouca disponibilidade dos grupos NH_2 na estrutura da proteína. Deste modo um tempo mais elevado é requerido, nesse caso 24 horas em reação, para a formação da imina.

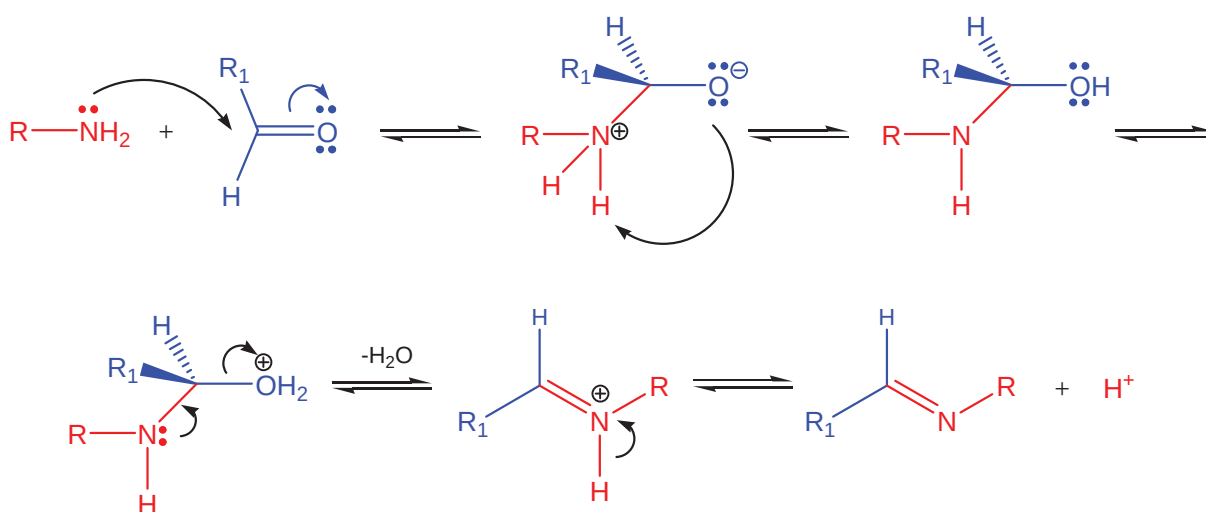


Figura 18 - Mecanismo da etapa de conjugação entre a nanopartícula luminescente aminofuncionalizada, ativada com glutaraldeído, com a proteína albumina.

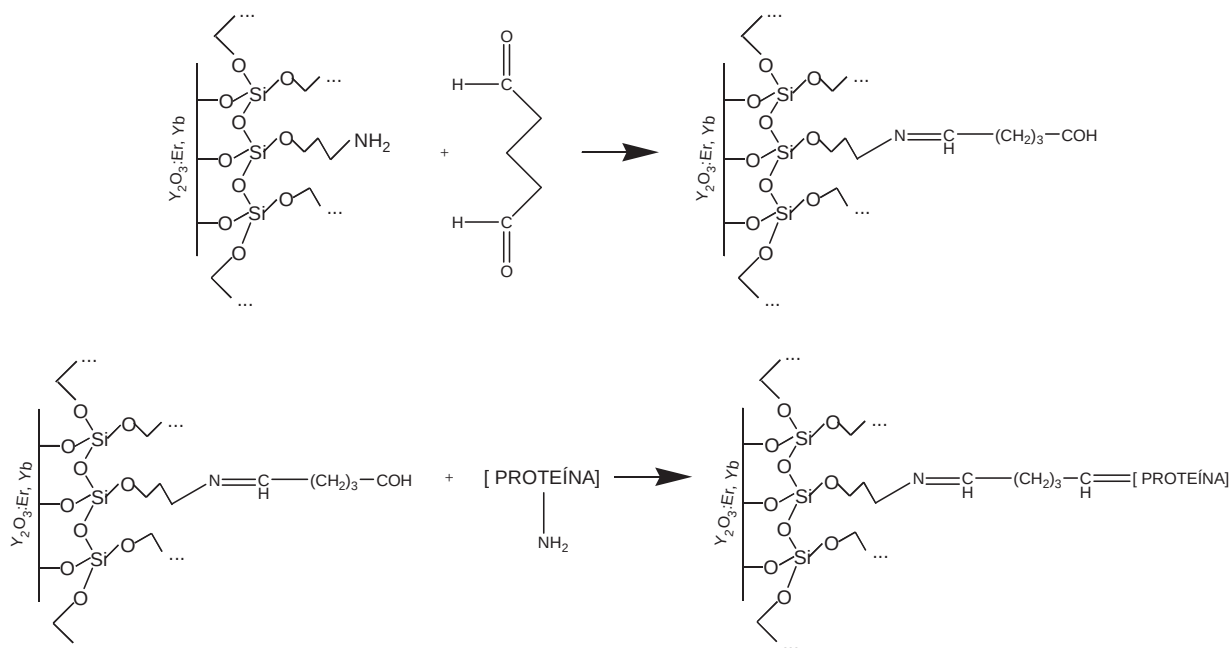


Figura 19 - Representação esquemática da etapa de conjugação entre a nanopartícula luminescente aminofuncionalizada, ativada com glutaraldeído, com a proteína albumina.

Já em relação à Figura 20, na qual está representado o mecanismo proposto quando o *crosslinker* Sulfo-GMBS é aplicado, podemos notar que em um primeiro momento ocorre uma adição nucleofílica da amina a carbonila do grupo éster formando inicialmente um intermediário tetraédrico. Em seguida ocorre uma transferência de próton intramolecular para a formação do grupo de saída álcool. A carbonila é regenerada resultando em uma amida estável. Essa reação que ocorre corresponde a uma substituição nucleofílica de derivado de ácido carboxílico.

A outra região da amida formada sofre uma adição eletrofílica em seu anel insaturado, na qual o enxofre da proteína se liga formando o conjugado final.

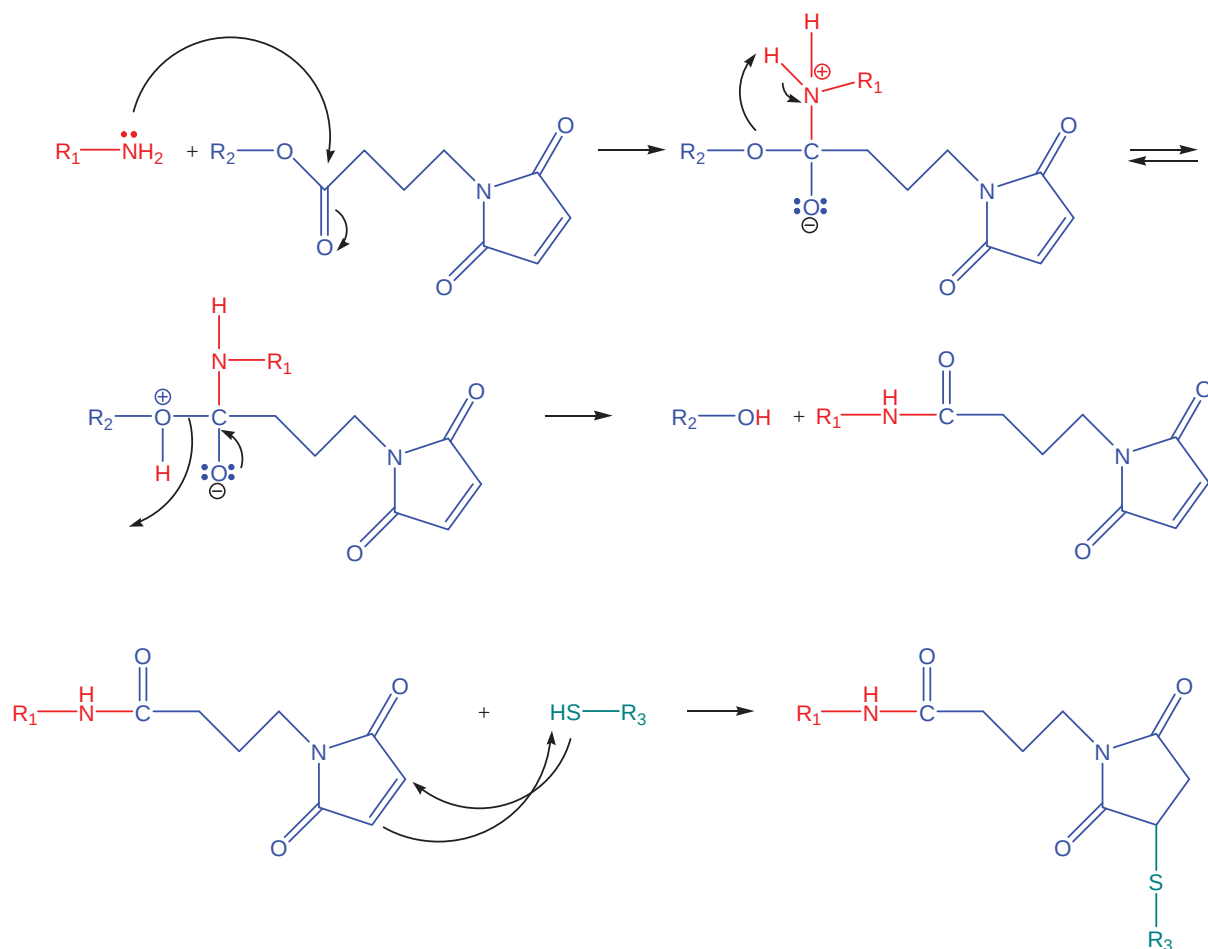


Figura 20 - Mecanismo da etapa de conjugação entre a nanopartícula luminescente aminofuncionalizada, ativada com Sulfo-GMBS, com a proteína albumina.

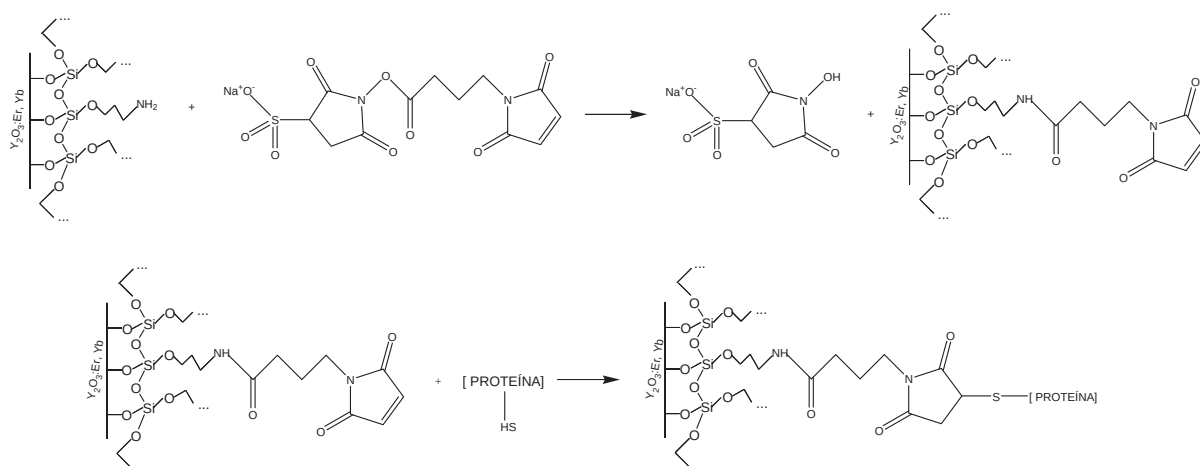


Figura 21 - Representação esquemática da etapa de conjugação entre a nanopartícula luminescente aminofuncionalizada, ativada com Sulfo-GMBS, com a proteína albumina.

Na Figura 22, que trata do caso no qual o crosslinker EDC é o utilizado, pode-se observar que o carbono da carbodiimida sofre um ataque nucleofílico do oxigênio da carbonila do grupo ácido carboxílico formando um intermediário instável. Este

intermediário apresenta um grupo éster o qual é atacado no carbono da carbonila por um nucleófilo presente no meio, no caso o íon cloro. Forma-se na sequência um haleto ácido com a eliminação de um excelente grupo de saída. Em seguida o carbono da carbonila na molécula do haleto ácido sofre uma adição nucleofílica com a eliminação do íon cloreto como grupo abandonador, formando uma amida estável.

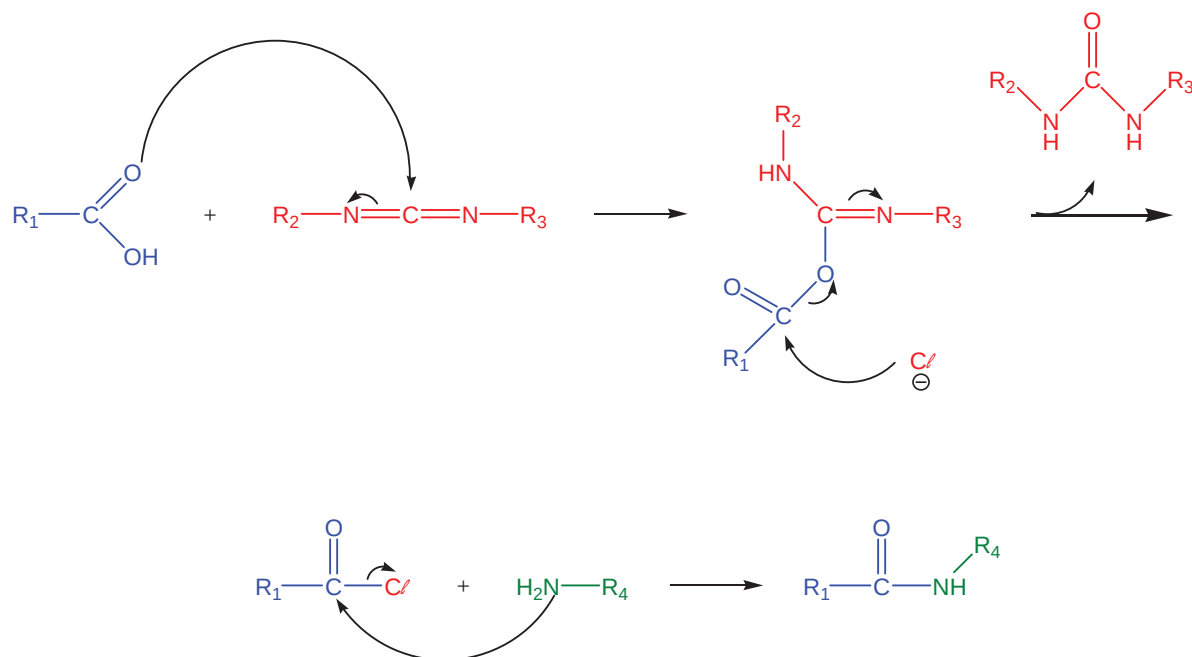


Figura 22 - Mecanismo da etapa de conjugação entre a nanopartícula luminescente aminofuncionalizada ativada com EDC com a proteína albumina.

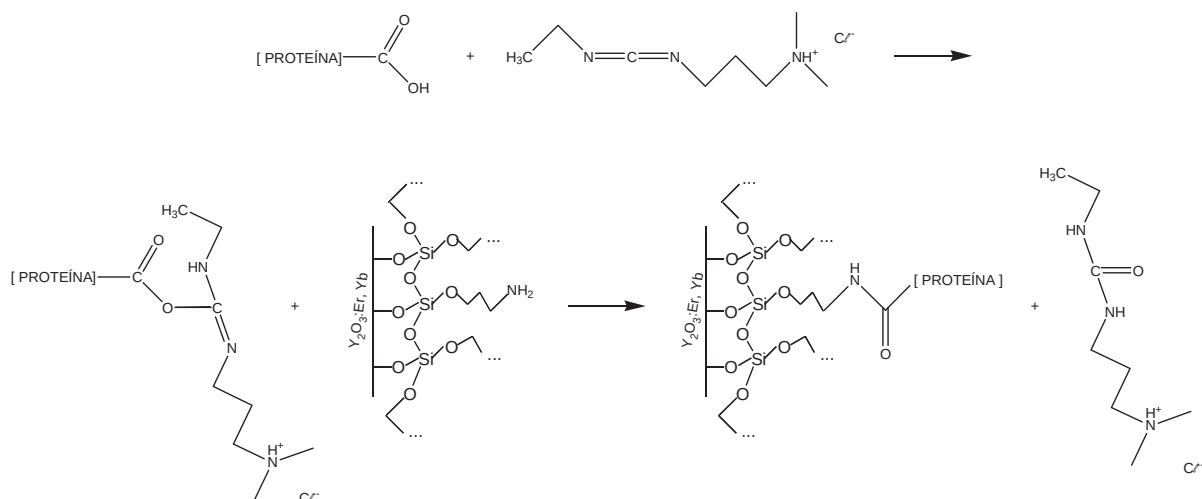


Figura 23 - Representação esquemática da etapa de conjugação entre a nanopartícula luminescente aminofuncionalizada ativada com EDC com a proteína albumina.

5.7 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS RELATIVA AO ENSAIO DE CONJUGAÇÃO COM ALBUMINA DA AMOSTRA $Y_2O_3:Er,Yb$ AMINOFUNCIONALIZADA (CÓDIGOS: RCS2; RSS1; RSS2) UTILIZANDO O *CROSSLINKER* GLUTARALDEÍDO EM COMPARAÇÃO COM OS REAGENTES PUROS

A seguir seguem os espectros obtidos por espectroscopia UV-VIS das amostras conjugadas com o *crosslinker* homobifuncional citado e as diferentes amostras, de acordo com os procedimentos descritos anteriormente.

5.7.1 Amostra código RCS2

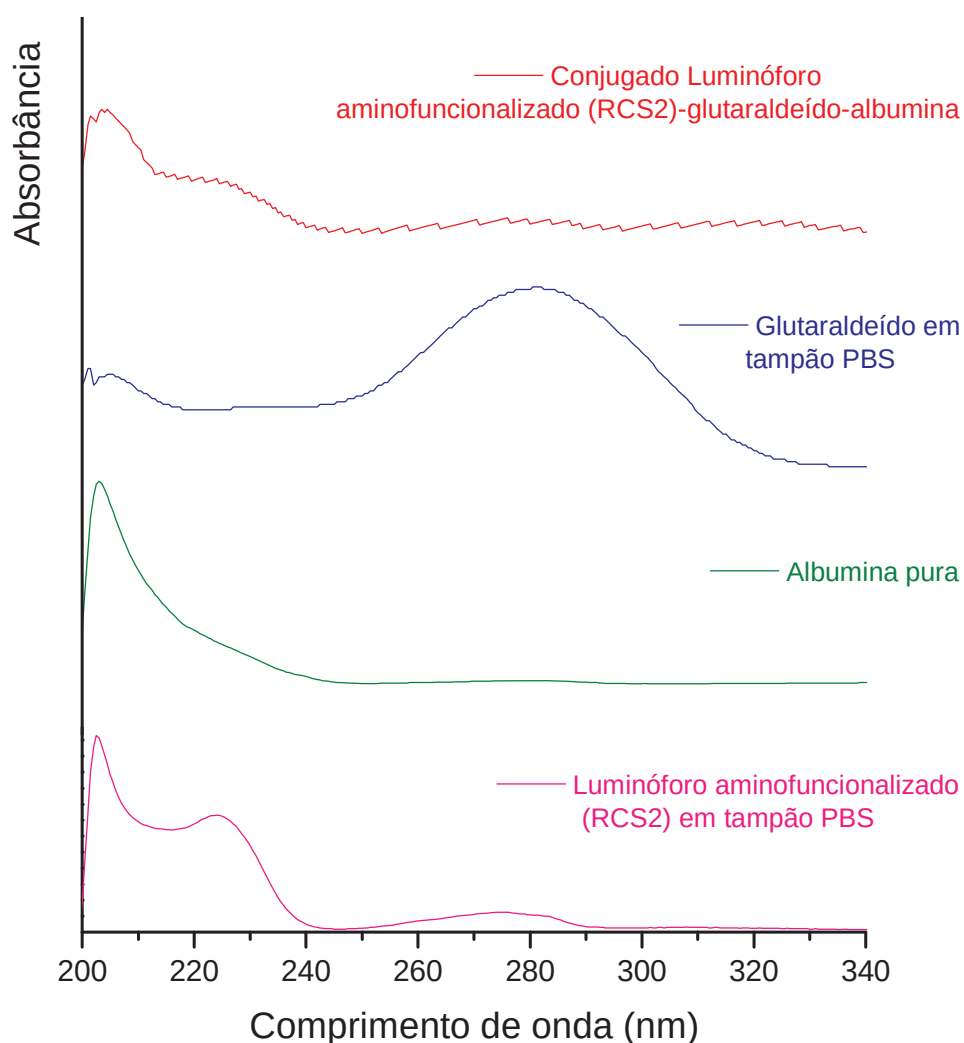


Figura 24 - Espectros de absorção no UV-VIS na região de 200 a 340 nm das nanopartículas aminofuncionalizadas (RCS2) em tampão PBS, albumina pura, glutaraldeído puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RCS2)-glutaraldeído-albumina.

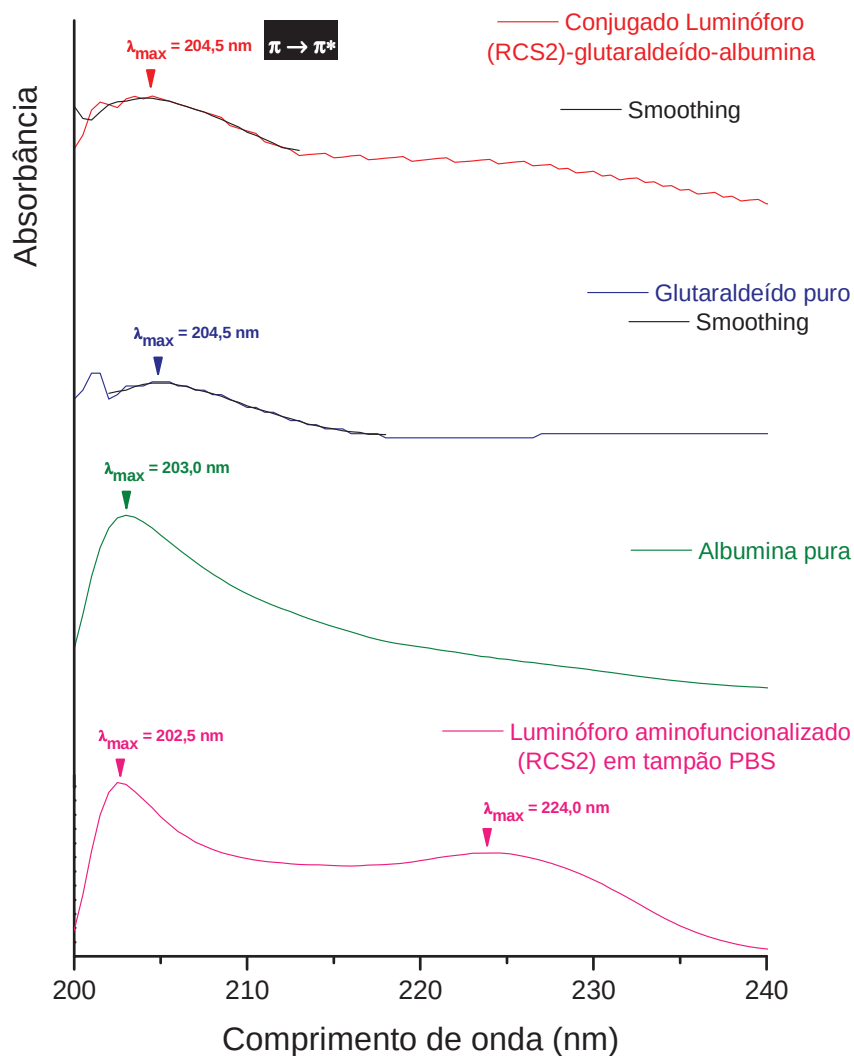


Figura 25 - Espectros de absorção no UV-VIS das nanopartículas (RCS2) em tampão PBS, albumina pura, glutaraldeído puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RCS2)-glutaraldeído-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 200 a 240 nm.

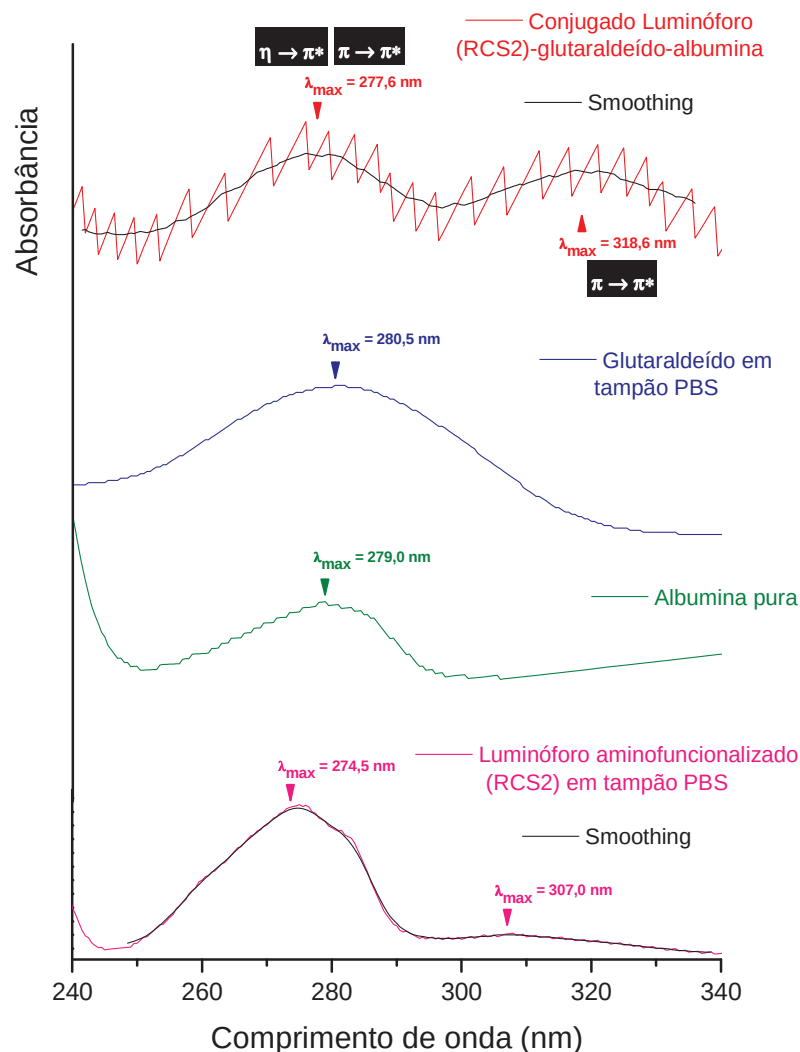


Figura 26 - Espectros de absorção no UV-VIS das nanopartículas (RCS2) em tampão PBS, albumina pura, glutaraldeído puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RCS2)-glutaraldeído-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 240 a 340 nm.

Tabela 6. Dados de máximos de absorção obtidos por espectroscopia UV-VIS para diferentes amostras e a relação de deslocamento entre bandas de uma mesma região apresentadas pelo sistema conjugado (RCS2/Glutaraldeído).

Sistema	Bandas (λ_{nm})	$\Delta\lambda$ (nm)	Deslocamento
Luminóforo aminofuncionalizado (RCS2) em tampão PBS	202,5	2,0	Para o vermelho
	224,0	19,5	Para o azul
	274,5	3,0	Para o vermelho
	307,0	11,6	Para o vermelho
Albumina pura	203,0	1,5	Para o vermelho
	279,0	1,5	Para o azul
Glutaraldeído puro	204,5	0,0	Não deslocou
	280,5	3,0	Para o azul
Sistema conjugado Luminóforo aminofuncionalizado (RCS2)-glutaraldeído-albumina	204,5	*****	*****
	277,5	*****	*****
	318,6	*****	*****

Uma primeira observação a ser pautada é o perfil de curva da amostra RCS2 preparada com a adição do surfactante Triton X-100, diferente das outras amostras

conjugadas, como poderá ser visto a seguir. O uso desse reagente pode influenciar no deslocamento das bandas, além do que algum resíduo do mesmo pode estar agregado na amostra analisada, gerando bandas que não aparecem nas outras amostras onde o surfactante não foi utilizado (224 e 274,5 nm). Na Figura 27, pode-se observar a estrutura do surfactante utilizado na funcionalização das nanopartículas.

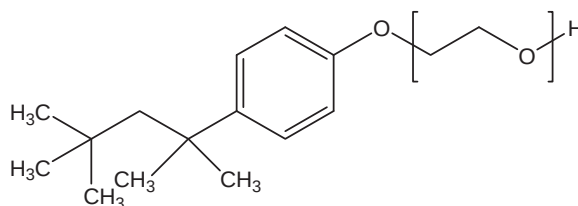


Figura 27 - Estrutura do surfactante Triton X-100, utilizado como variação no processo de recobrimento das nanopartículas luminescentes.

Ao analisar o sistema conjugado na região de 200 a 340 nm, nota-se que ocorreram deslocamentos das bandas dos reagentes puros em relação ao sistema conjugado.

Tais deslocamentos são mais pronunciados para o azul e se devem às transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$. O deslocamento citado significa que a banda é deslocada para um comprimento de onda menor, de maior energia, em relação às bandas que a deram origem. São transições que ocorrem na faixa de $200 < \lambda < 700$ nm, portanto coerente com os dados experimentais. Esse deslocamento hipsocrômico acontece devido à maior solvatação do par de elétrons n (não ligantes) e que abaixa a energia do orbital n . Vale ressaltar que o estado excitado π^* não é afetado. Desta forma, como se observou no mecanismo proposto, era de se esperar que estes deslocamentos ocorressem, já que ao se formar a ligação entre o nitrogênio e o carbono, há um par de elétrons não ligantes no átomo de nitrogênio que propiciam os deslocamentos exibidos nas curvas.

Fazendo uma analogia deste comportamento, sugere-se que a natureza da absorção observada no caso da albumina pura e conjugada seria advinda de uma transição do tipo $n \rightarrow \pi^*$.

Com relação à albumina bovina, na sua composição apresenta uma seqüência de resíduos de aminoácidos, formando peptídeos, Figura 28a, com um grupo NH_2 terminal originário do glutamato (E). Nas Figuras 28b e 28c pode-se observar a distribuição dos grupos funcionais na sua estrutura como um todo.

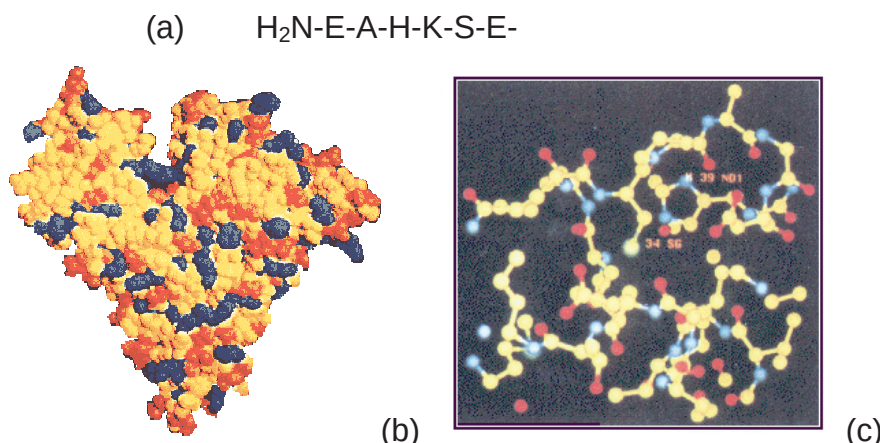


Figura 28 - (a) Sequência de peptídeos da proteína albumina; (b) Modelo preenchimento espacial da molécula de albumina bovina com resíduos básicos coloridos em azul, resíduos ácidos em vermelho e neutros em amarelo (visão frontal). (c) Modelo estereoquímico bola-bastão da estrutura da albumina na região ao redor do resíduo Cisteína-34 (Cys-34), onde vermelho é O, Amarelo, C, Azul, N, Verde, S; ⁽³¹⁾

O glutamato é um dos aminoácidos que apresenta grupos R com carga negativa de rede em pH 7,0, possuindo um segundo grupo carboxílico, Figura 29 ⁽⁵³⁾. Também estão presentes nesta sequência de aminoácidos a histidina e a arginina, possuindo esta última um grupo amino a mais o qual deve contribuir com mais um par de elétrons não ligantes para a absorção no UV observada nos espectros da Figura 25 e 26.

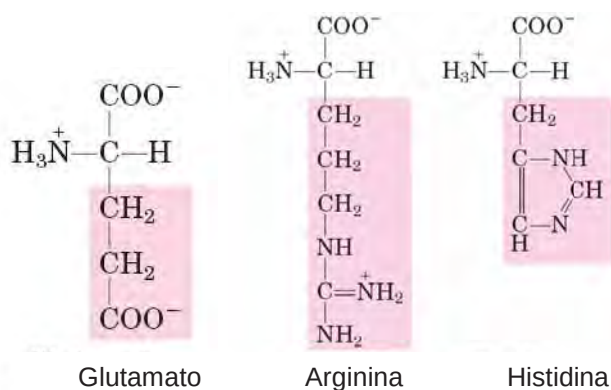


Figura 29 - Representação de aminoácidos presentes na proteína albumina (reproduzido de ⁽⁴³⁾).

Assim, no sistema estudado onde há a conjugação luminóforo aminofuncionalizado (RCS2)-glutaraldeído-albumina, Figuras 25 e 26, esta ligação é feita através dos grupos NH_2 terminais da proteína e o aldeído livre do glutaraldeído, formando uma base de Schiff, gerando mais uma insaturação. Esta ligação pode estar favorecendo um abaixamento em energia de orbitais do tipo n o que justificaria o deslocamento para o azul (energia maior) da banda de absorção atribuída à albumina observada nos espectros das partículas conjugadas, Figuras 25 e 26.

Outro ponto importante a ser elucidado é a banda em 204,5 nm não deslocada referente ao glutaraldeído puro, indicando pequena contribuição na ligação estabelecida, já que os deslocamentos são bastante evidentes nos outros casos.

Nota-se, ainda, que há uma banda deslocada para o vermelho, em 318,6 nm no sistema conjugado em relação à partícula pura que tem uma banda de baixa intensidade em 307 nm, e que pode ser atribuído a transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. O deslocamento para o vermelho, onde o deslocamento acontece para um comprimento de onda maior, de menor energia, também se manifesta preferencialmente em transições que ocorrem na faixa de $200 < \lambda < 700$ nm. Esse deslocamento batocrômico é ocasionado por forças de polarização que tendem a abaixar os níveis de energia de ambos estados, excitado e não excitado. Este efeito é maior para o estado excitado, e assim a diferença de energia entre os estados excitado π^* e não excitado π é ligeiramente reduzida.

Para um melhor entendimento dos deslocamentos de bandas pode-se observar a Figura 30, onde as possíveis transições eletrônicas são mostradas.

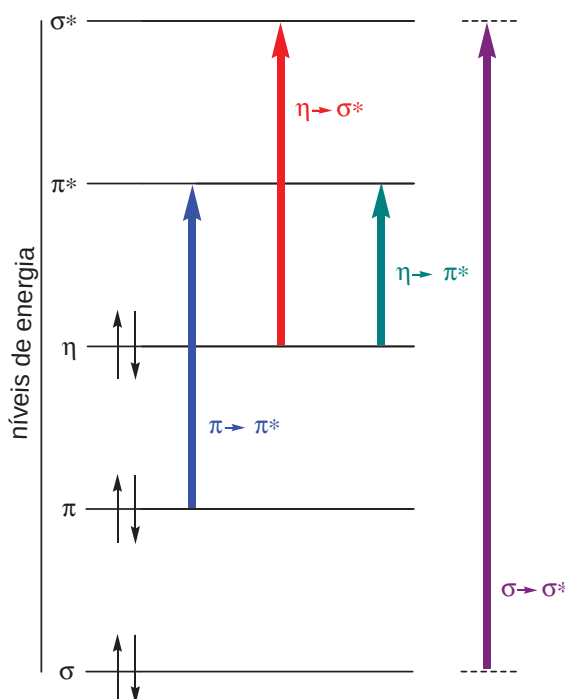


Figura 30 - Transições eletrônicas possíveis para elétrons π , σ e n .

5.7.2 Amostra código RSS1

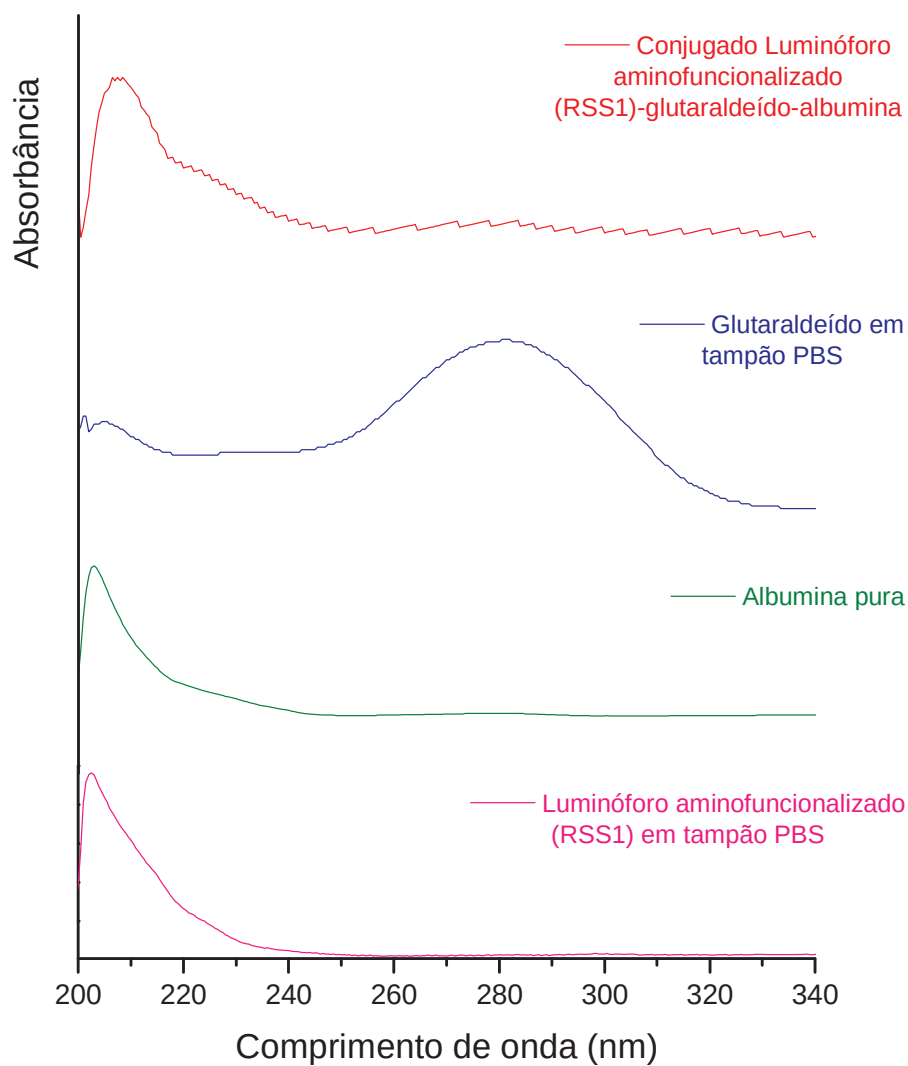


Figura 31 - Espectros de absorção no UV-VIS na região de 200 a 340 nm das nanopartículas aminofuncionalizadas (RSS1) em tampão PBS, albumina pura, glutaraldeído puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado-glutaraldeído-albumina.

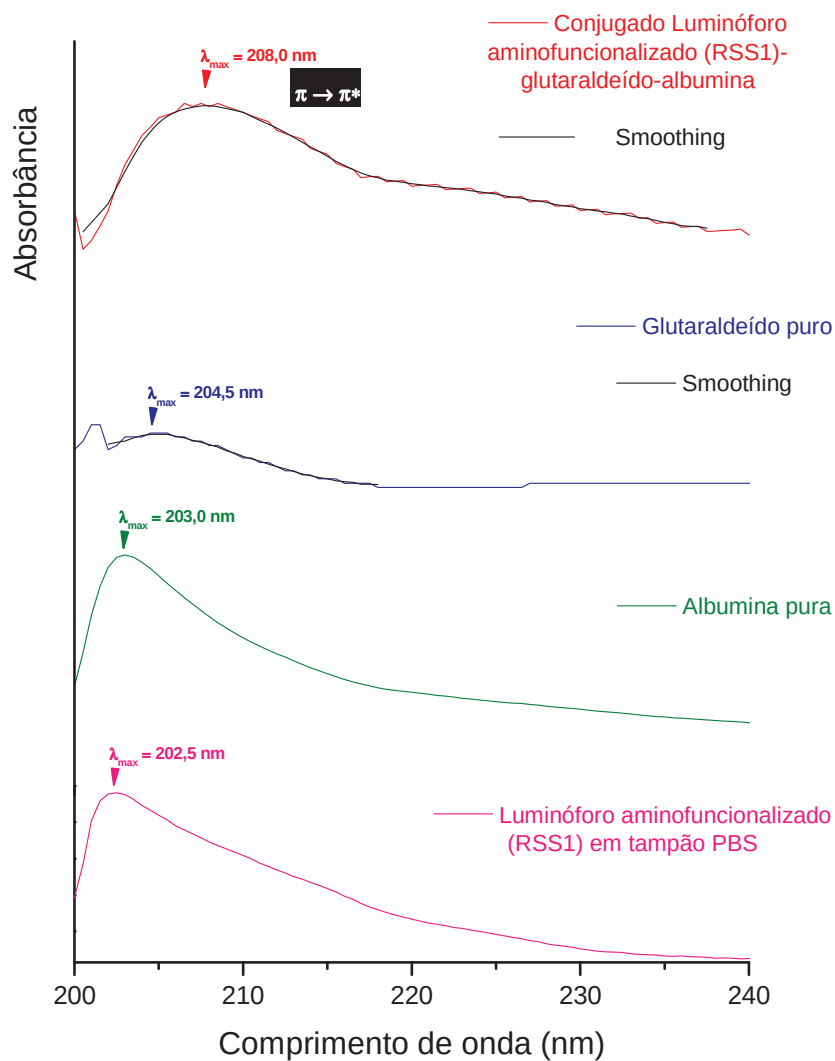


Figura 32 - Espectros de absorção no UV-VIS das nanopartículas aminofuncionalizadas (RSS1) em tampão PBS, albumina pura, glutaraldeído puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS1)-glutaraldeído-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 200 a 240 nm.

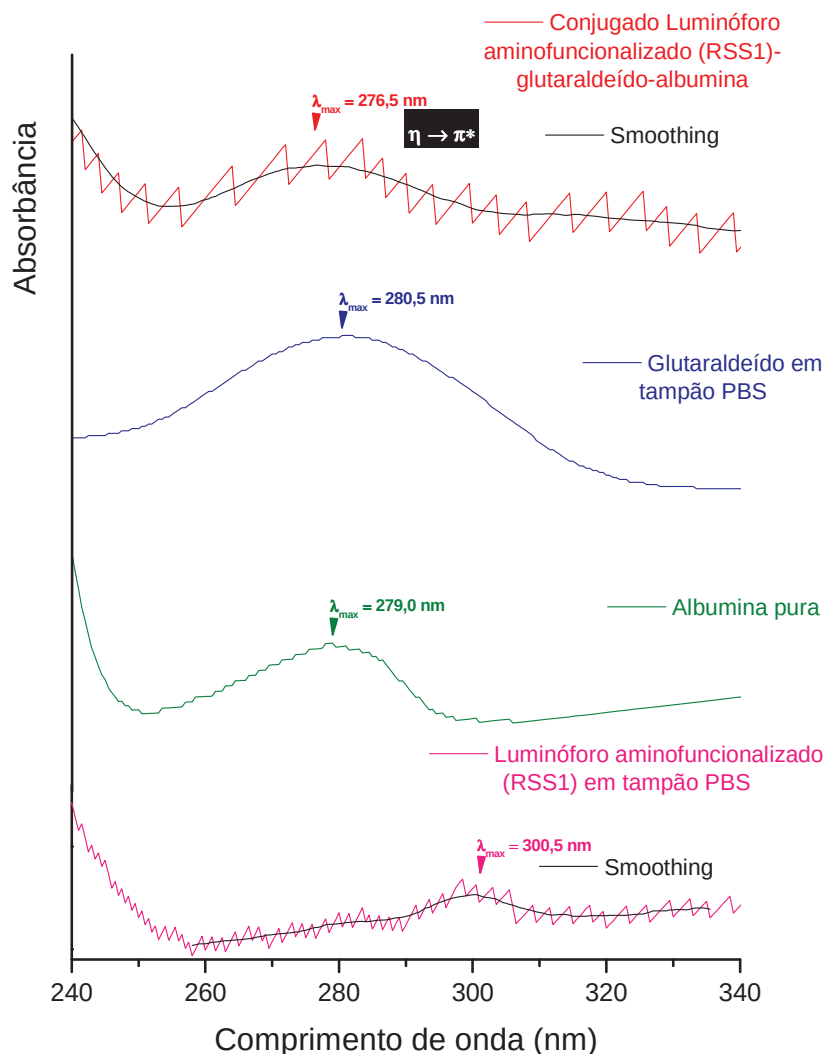


Figura 33 - Espectros de absorção no UV-VIS das nanopartículas aminofuncionalizadas (RSS1) em tampão PBS, albumina pura, glutaraldeído puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS1)-glutaraldeído-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 240 a 340 nm.

Tabela 7. Dados de máximos de absorção obtidos por espectroscopia UV-VIS para diferentes amostras e a relação de deslocamento entre bandas de uma mesma região apresentadas pelo sistema conjugado (RSS1/Glutaraldeído).

Sistema	Bandas (λ_{nm})	$\Delta\lambda$ (nm)	Deslocamento
Luminóforo aminofuncionalizado (RSS1) em tampão PBS	202,5	5,5	Para o vermelho
	300,5	24,0	Para o azul
Albumina pura	203,0	5,0	Para o vermelho
	279,0	2,5	Para o azul
Glutaraldeído puro	204,5	3,5	Para o vermelho
	280,5	4,0	Para o azul
Sistema conjugado Luminóforo aminofuncionalizado (RSS1)-glutaraldeído-albumina	208,0	*****	*****
	276,5	*****	*****

A amostra RSS1, conforme se observam nas Figuras 32 e 33, não apresenta as bandas detectadas para a amostra RCS2, atribuídas à presença do surfactante.

No entanto, para esta amostra RSS1, ao contrário da anterior, são observados deslocamentos para o vermelho com relação aos máximos das bandas dos reagentes puros na região compreendida entre 200 e 240 nm e os deslocamentos para o azul somente na região compreendida entre 240 e 340 nm. Isso pode ser um indicativo, comparativamente, da influência que se estabeleceu pelo surfactante Triton X-100 na amostra RCS2 discutida anteriormente.

Os deslocamentos para o azul observados na Figura 33, já foram bastante discutidos e elucidados anteriormente quando se analisou as transições eletrônicas atribuídas aos espectros representados nas Figuras 25 e 26. Mas neste caso é interessante notar que para cada transição eletrônica $n \rightarrow \pi^*$ ocorrida no sistema conjugado, há um deslocamento para o vermelho atribuído ao mesmo espectro na banda observada na região entre 200 e 240 nm. Como o sistema conjugado final é uma molécula grande e complexa, é natural que as transições para o vermelho surjam já que há uma grande quantidade de grupos auxocromos ligados aos grupos cromóforos.

5.7.3 Amostra código RSS2

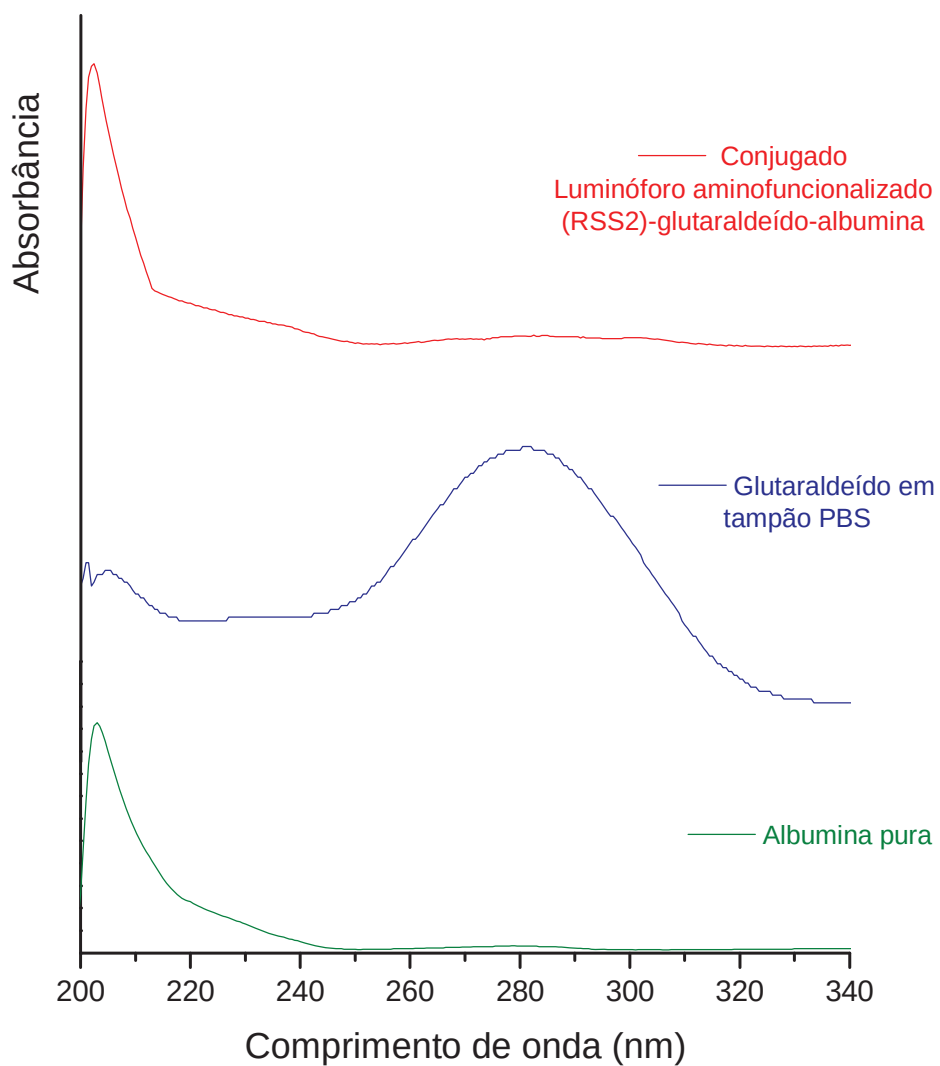


Figura 34 - Espectros de absorção no UV-VIS na região de 200 a 340 nm das nanopartículas aminofuncionalizadas (RSS2) em tampão PBS, albumina pura, glutaraldeído puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado-glutaraldeído-albumina.

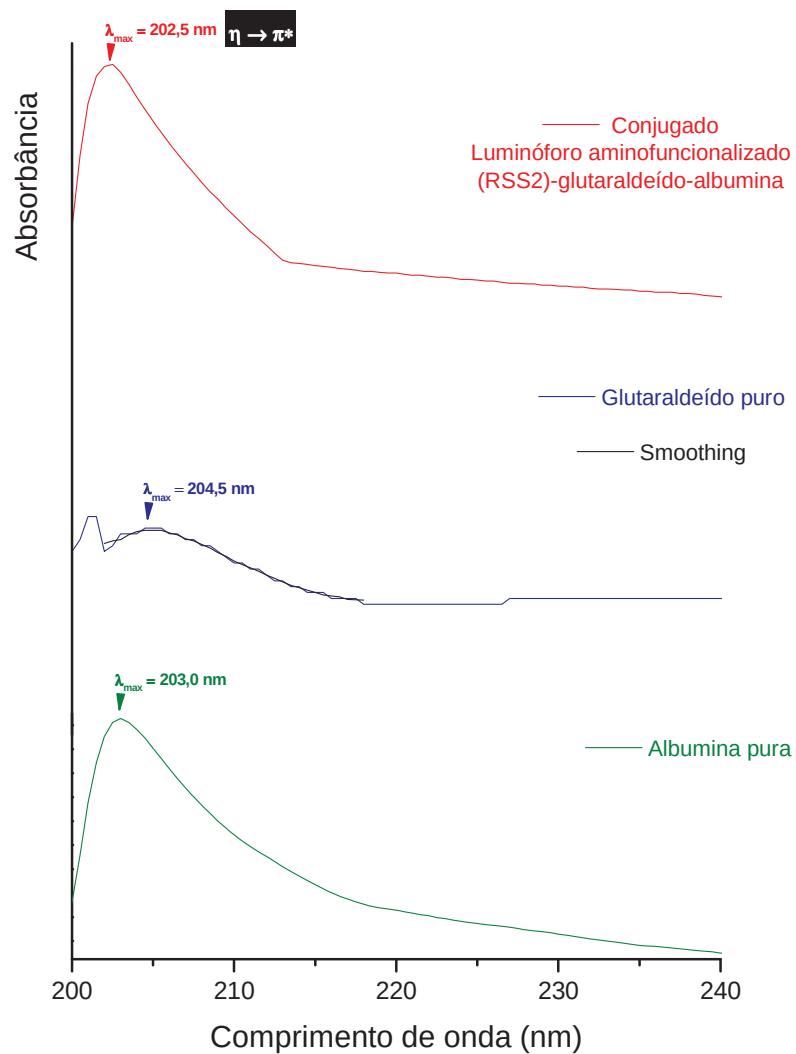


Figura 35 - Espectros de absorção no UV-VIS da albumina pura, glutaraldeído puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS2)-glutaraldeído-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 200 a 240 nm.

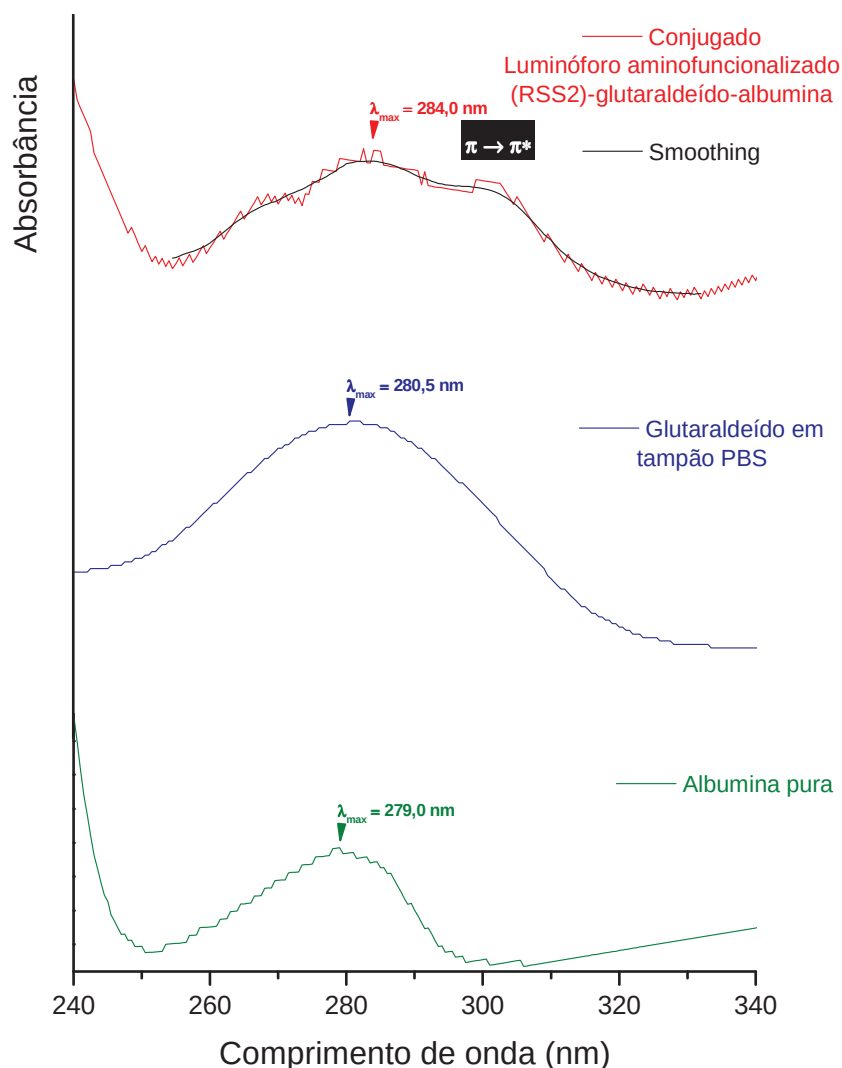


Figura 36 - Espectros de absorção no UV-VIS da albumina pura, glutaraldeído puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS2)-glutaraldeído-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 240 a 340 nm.

Tabela 8. Dados de máximos de absorção obtidos por espectroscopia UV-VIS para diferentes amostras e a relação de deslocamento entre bandas de uma mesma região apresentadas pelo sistema conjugado(RSS2/Glutaraldeído).

Sistema	Bandas (λ_{nm})	$\Delta\lambda$ (nm)	Deslocamento
Albumina pura	203,0	0,5	Para o azul
	279,0	5,0	Para o vermelho
Glutaraldeído puro	204,5	2,0	Para o azul
	280,5	3,5	Para o vermelho
Sistema conjugado Luminóforo aminofuncionalizado (RSS2)-glutaraldeído-albumina	202,5	*****	*****
	284,0	*****	*****

Observa-se que nas Figuras 35 e 36, os deslocamentos de bandas detectados nas Figuras 25, 26, 32 e 33 também aparecem. É válido destacar que esta amostra RSS2 assim como a RSS1, não apresenta surfactante e em relação a

esta última, para a qual foi utilizada uma quantidade menor de nanopartículas aminofuncionalizadas.

As Figuras 35 e 36 apresentam uma inversão nos deslocamentos de bandas em relação às Figuras 32 e 33, onde os deslocamentos para o azul são observados na região compreendida entre 200 a 240 nm e para o vermelho entre 240 a 340 nm. Tal inversão pode ter ocorrido devido à menor quantidade de grupos amino na superfície das nanopartículas formando as bases de Schiff, já que esta amostra apresenta menor massa de luminóforo. Ainda assim, os deslocamentos são bem evidentes, implicando em efetiva conjugação.

5.8 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS RELATIVA AO ENSAIO DE CONJUGAÇÃO COM ALBUMINA DA AMOSTRA $Y_2O_3:Er,Yb$ AMINOFUNCIONALIZADA (CÓDIGOS: RCS2; RSS1; RSS2) UTILIZANDO O *CROSSLINKER* SULFO-GMBS EM COMPARAÇÃO COM OS REAGENTES PUROS

5.8.1 Amostra código RSS1

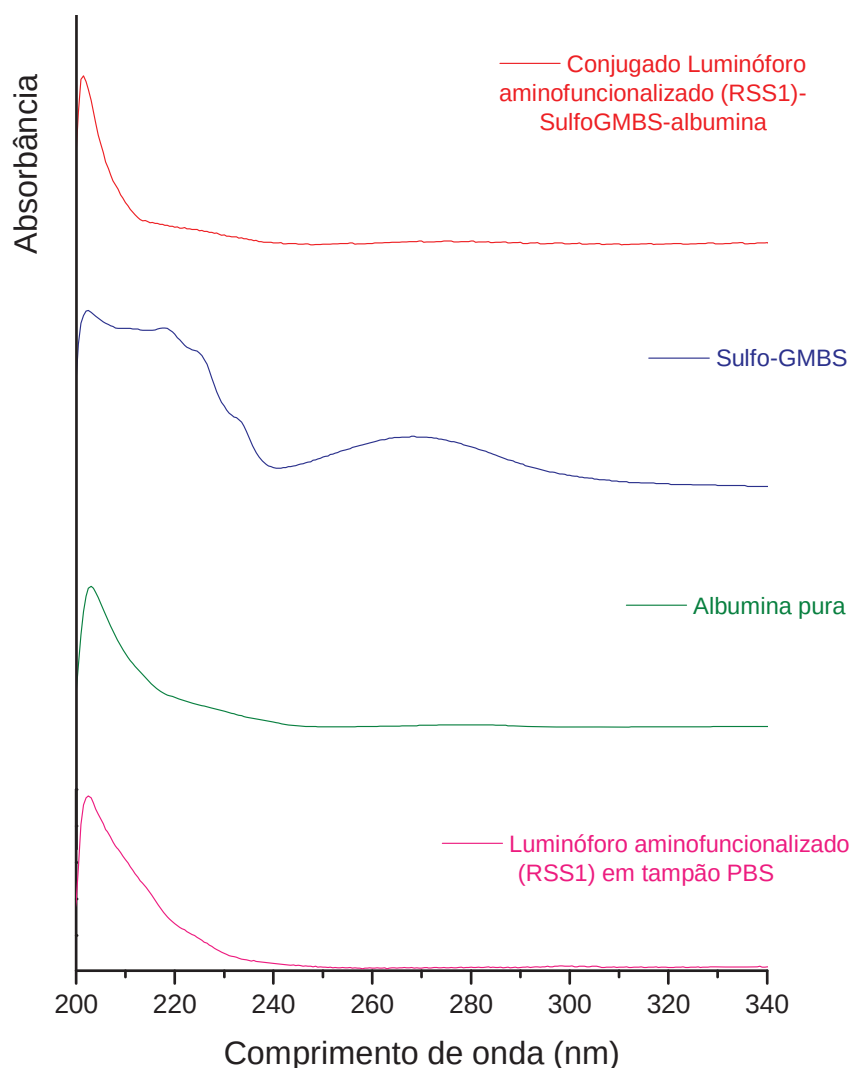


Figura 37 - Espectros de absorção no UV-VIS na região de 200 a 340 nm das nanopartículas aminofuncionalizadas (RSS1) em tampão PBS, albumina pura, Sulfo-GMBS puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado- SulfoGMBS-albumina.

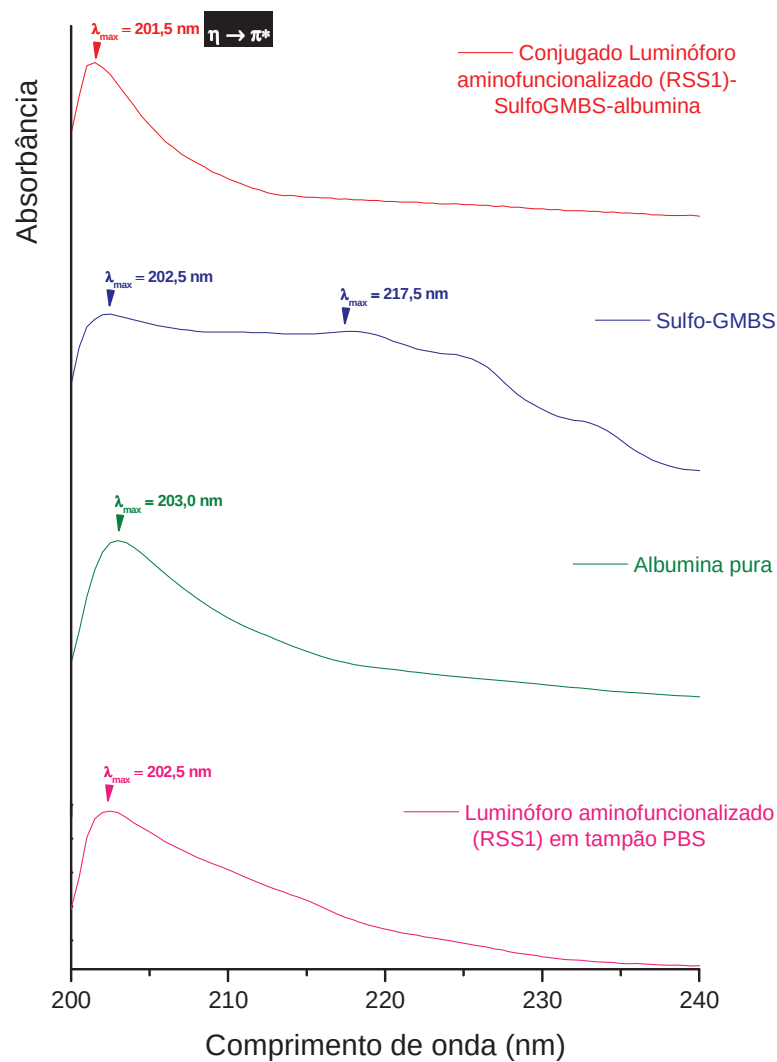


Figura 38 - Espectros de absorção no UV-VIS das nanopartículas aminofuncionalizadas (RSS1) em tampão PBS, albumina pura, Sulfo-GMBS puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS1)-SulfoGMBS-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 200 a 240 nm.

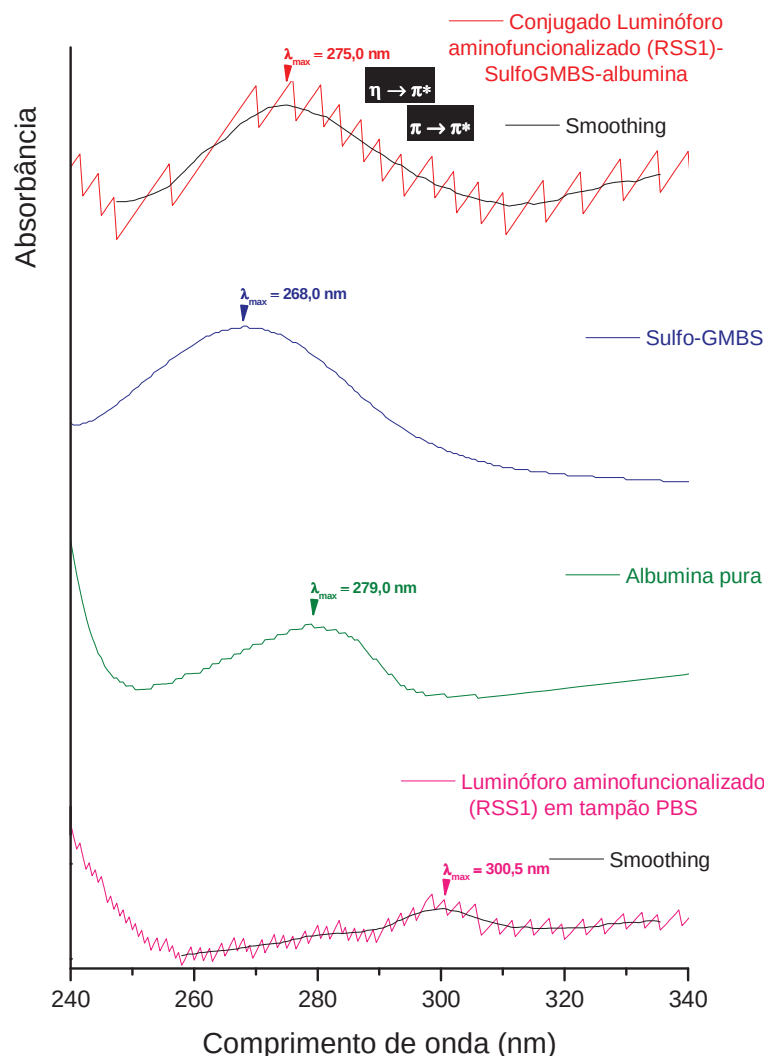


Figura 39 - Espectros de absorção no UV-VIS das nanopartículas aminofuncionalizadas (RSS1) em tampão PBS, albumina pura, Sulfo-GMBS puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS1)-SulfoGMBS-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 240 a 340 nm.

Tabela 9. Dados de máximos de absorção obtidos por espectroscopia UV-VIS para diferentes amostras e a relação de deslocamento entre bandas de uma mesma região apresentadas pelo sistema conjugado (RSS1/Sulfo-GMBS).

Sistema	Bandas (λ_{nm})	$\Delta\lambda$ (nm)	Deslocamento
Luminóforo aminofuncionalizado (RSS1) em tampão PBS	202,5	1,5	Para o azul
	300,5	25	Para o azul
Albumina pura	203,0	2,0	Para o azul
	279,0	3,5	Para o azul
Sulfo-GMBS puro	202,5	1,5	Para o azul
	217,5	16,5	Para o azul
	268,0	7,50	Para o vermelho
Sistema conjugado Luminóforo aminofuncionalizado (RSS1)-SulfoGMBS-albumina	201,0	*****	*****
	275,5	*****	*****

As mesmas transições observadas quando a amostra é conjugada com o *crosslinker* homobifuncional glutaraldeído, também comparecem para este tipo de

reagente heretobifuncional que se liga primeiramente ao grupamento amino da partícula e posteriormente ao grupamento sulfidril da proteína. Nesse caso é coerente correlacionar que os deslocamentos para menor comprimento de onda estejam ocorrendo na ligação tanto com o grupamento amino da nanopartícula, bem como com o sulfidril da albumina, pois ambos apresentam pares de elétrons não ligantes proporcionando transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$. Este fato já foi claramente discutido no item 5.7.1 deste trabalho no que se refere à formação de insaturações que contribuem de forma efetiva para que este tipo de transição ocorra.

5.8.2 Amostra código RSS2

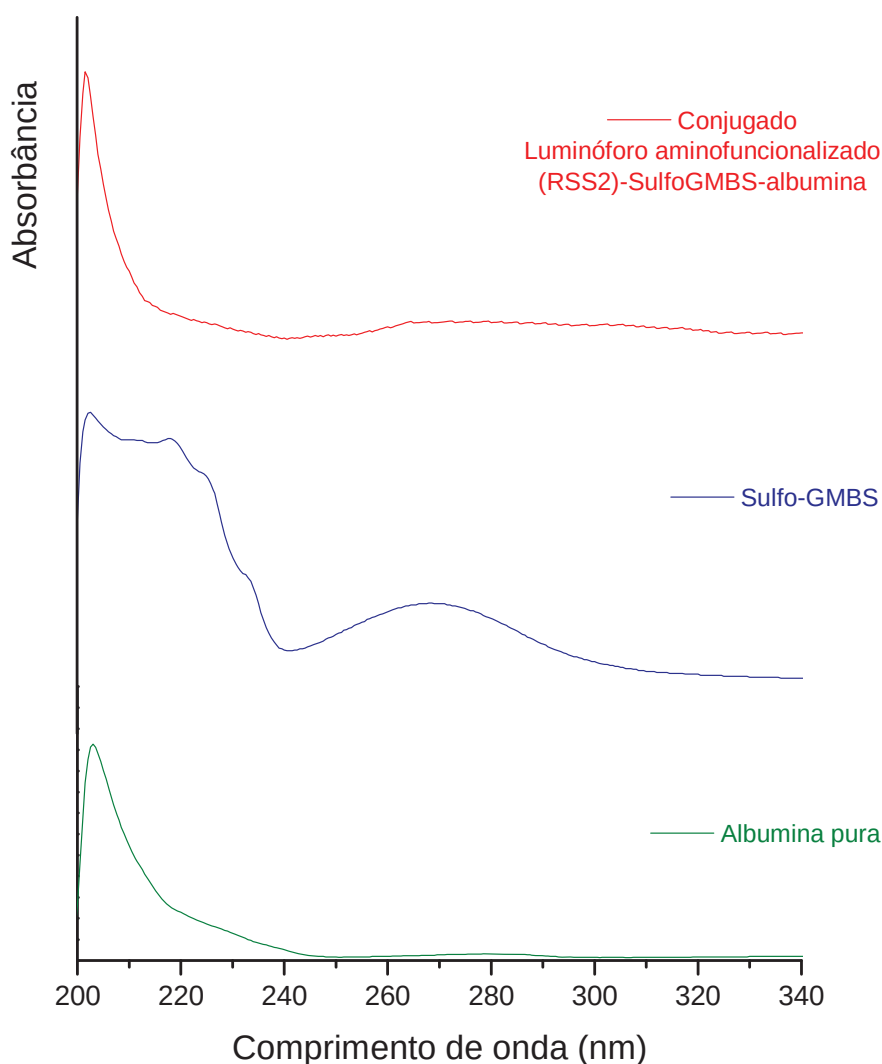


Figura 40 - Espectros de absorção no UV-VIS na região de 200 a 340 nm das nanopartículas aminofuncionalizadas (RSS2) em tampão PBS, albumina pura, Sulfo-GMBS puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado-SulfoGMBS-albumina.

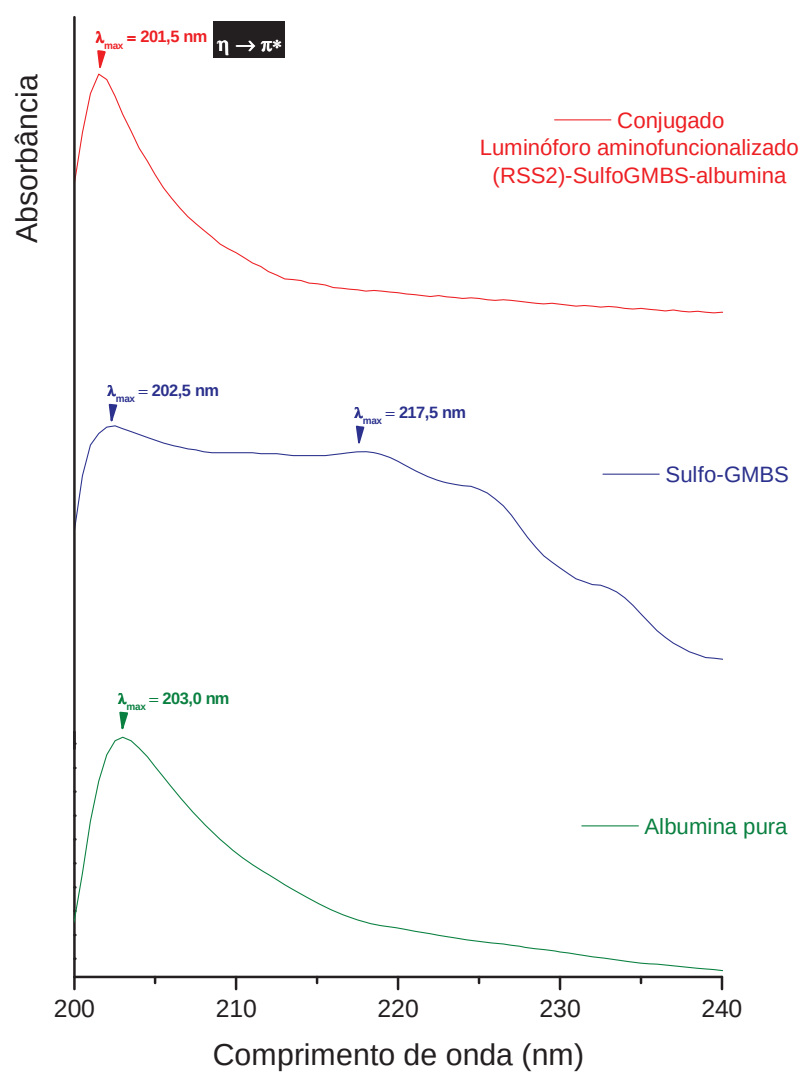


Figura 41 - Espectros de absorção no UV-VIS da albumina pura, Sulfo-GMBS puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS2)-SulfoGMBS-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 200 a 240 nm.

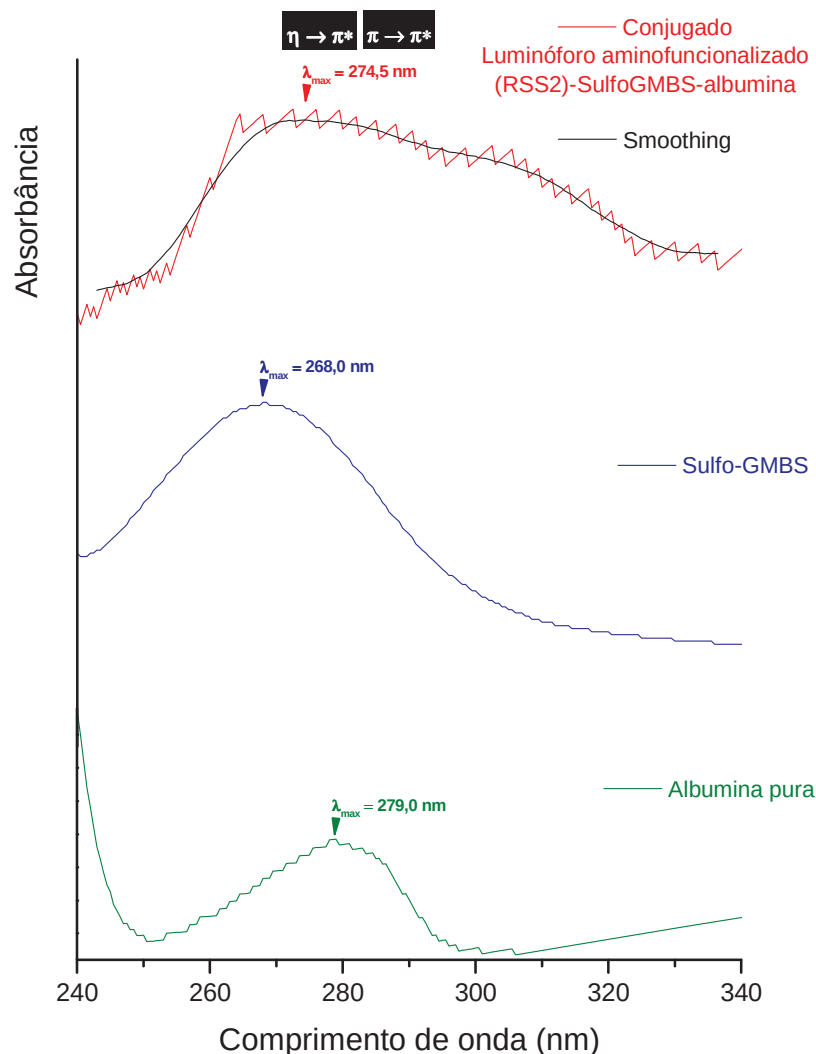


Figura 42 - Espectros de absorção no UV-VIS da albumina pura, Sulfo-GMBS puro, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS2)-SulfoGMBS-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 240 a 340 nm.

Tabela 10. Dados de máximos de absorção obtidos por espectroscopia UV-VIS para diferentes amostras e a relação de deslocamento entre bandas de uma mesma região apresentadas pelo sistema conjugado (RSS2/Sulfo-GMBS).

Sistema	Bandas (λ_{nm})	$\Delta\lambda$ (nm)	Deslocamento
Albumina pura	203,0	1,5	Para o azul
	279,0	4,5	Para o azul
	202,5	1,0	Para o azul
Sulfo-GMBS puro	217,5	16,0	Para azul
	268,0	6,5	Para o vermelho
Sistema conjugado Luminóforo aminofuncionalizado (RSS2)-SulfoGMBS-albumina	201,5	*****	*****
	274,5	*****	*****

Novamente, pelos espectros apresentados nas Figuras 41 e 42, pode-se observar a predominância de transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$.

5.9 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS RELATIVA AO ENSAIO DE CONJUGAÇÃO COM ALBUMINA DA AMOSTRA $Y_2O_3:Er,Yb$ AMINOFUNCIONALIZADA (CÓDIGOS: RCS2; RSS1) UTILIZANDO O *CROSSLINKER* EDC EM COMPARAÇÃO COM OS REAGENTES PUROS

Abaixo seguem os espectros obtidos por espectroscopia UV-VIS das amostras conjugadas com o *crosslinker* heterobifuncional EDC, de acordo com os procedimentos descritos anteriormente. O uso do EDC é interessante na medida em que este *crosslinker* não faz parte do conjugado final, já que não cumpre papel de “*spacer*” (espaçador) comum aos demais reagentes empregados para esta finalidade, independente da natureza homo ou heterobifuncional, como exposto no mecanismo de reação proposto na Figura 22. Nas Figuras abaixo seguem os espectros e seus deslocamentos de bandas.

5.9.1 Amostra código RCS2

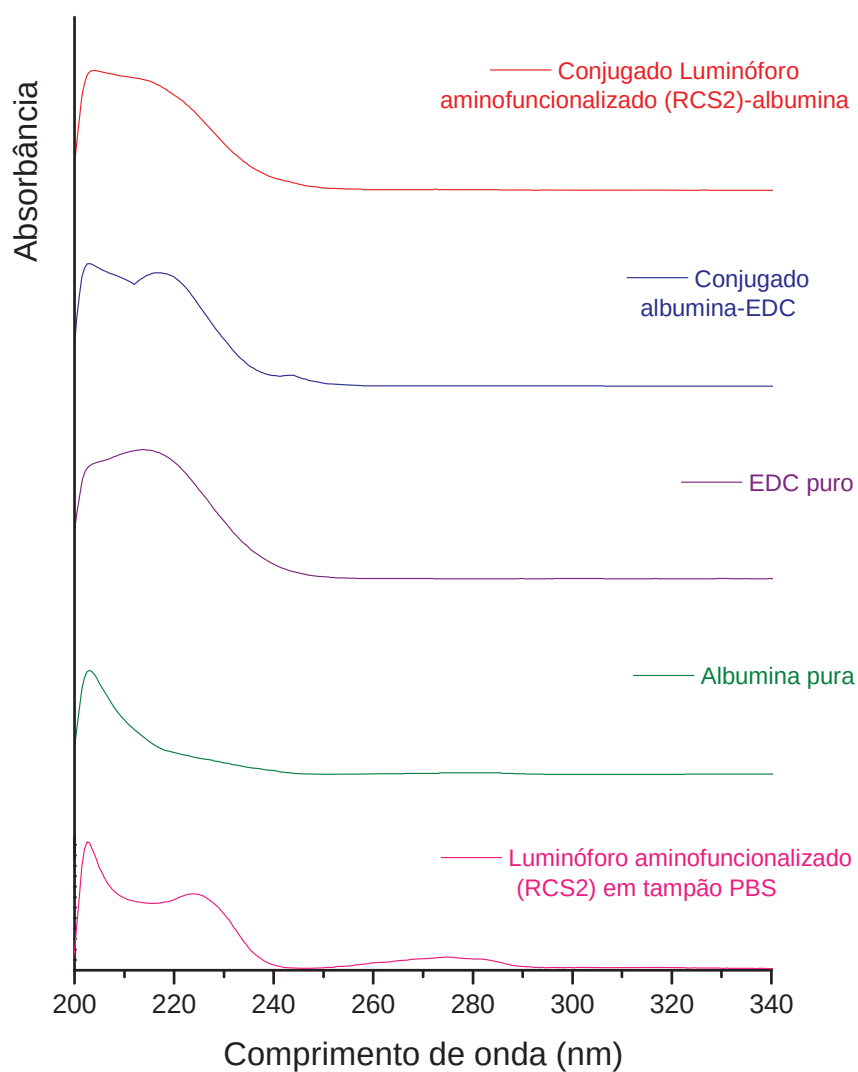


Figura 43 - Espectros de absorção no UV-VIS na região de 200 a 340 nm das nanopartículas aminofuncionalizadas aminofuncionalizada (RCS2) em tampão PBS, albumina pura, EDC puro, sistema conjugado EDC-albumina, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RCS2)-albumina.

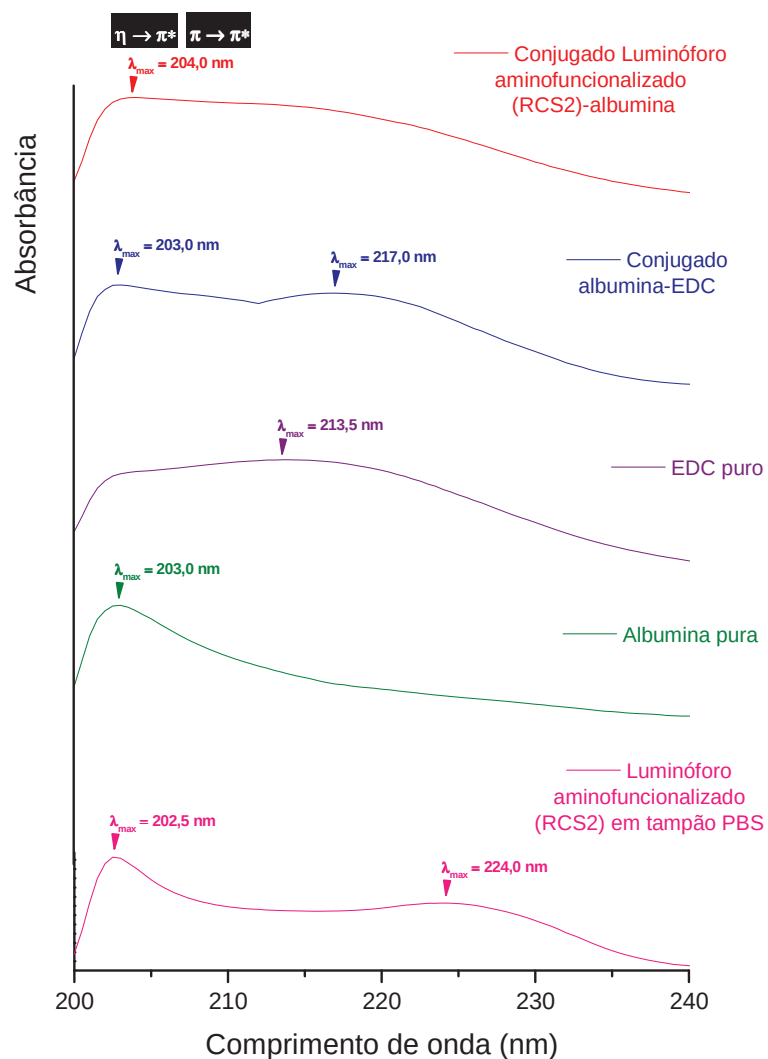


Figura 44 - Espectros de absorção no UV-VIS das nanopartículas aminofuncionalizadas (RCS2) em tampão PBS, albumina pura, EDC puro, sistema conjugado EDC-albumina, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RCS2)-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 200 a 240 nm.

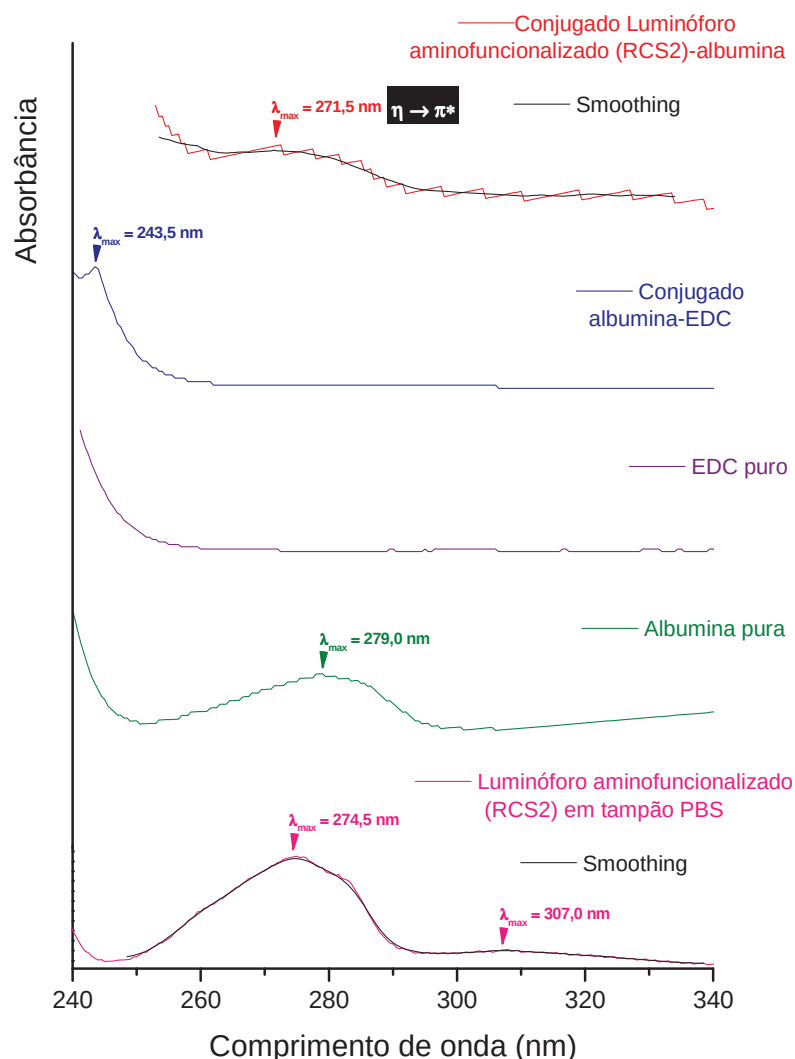


Figura 45 - Espectros de absorção no UV-VIS das nanopartículas aminofuncionalizadas (RCS2) em tampão PBS, albumina pura, EDC puro, sistema conjugado EDC-albumina, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RCS2)-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 240 a 340 nm.

Tabela 11. Dados de máximos de absorção obtidos por espectroscopia UV-VIS para diferentes amostras e a relação de deslocamento entre bandas de uma mesma região apresentadas pelo sistema conjugado (RCS2/EDC).

Sistema	Bandas (λ_{nm})	$\Delta\lambda$ (nm)	Deslocamento
Luminóforo aminofuncionalizado (RCS2) em tampão PBS	202,5	1,5	Para o vermelho
	224,0	20,0	Para o azul
	274,5	3,0	Para o azul
	307,0	35,5	Para o azul
Albumina pura	203,0	1,0	Para o vermelho
	279,0	7,5	Para o azul
EDC puro	213,5	*****	*****
Sistema conjugado albumina-EDC	203,0	*****	*****
	217,0	*****	*****
Sistema conjugado Luminóforo aminofuncionalizado (RCS2)-albumina	204,0	*****	*****
	271,5	*****	*****

Observa-se que nas Figuras 44 e 45 há deslocamentos de bandas do sistema conjugado final em relação aos reagentes puros tanto para o vermelho, quanto para o azul; ressaltando a predominância para o azul. Neste caso é importante frisar que o EDC não faz parte do conjugado final, já que é um *crosslinker* que possui o papel semelhante, mas com função diferente, a um catalisador, proporcionando a ligação direta entre o luminóforo e a proteína.

Antes de realizar qualquer tipo de consideração, deve-se chamar a atenção para a presença de surfactante Triton X-100, utilizado na preparação da nanopartícula aminofuncionalizada empregada, que também influenciou na conjugação aqui exposta.

Observando a região entre 200 e 240 nm há a predominância de transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, deslocando as bandas dos reagentes puros para comprimentos de onda maior. Já na região compreendida de 240 a 340 nm aparecem apenas deslocamentos para o azul, transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$. Vale ressaltar o mecanismo proposto na Figura 22, onde na ligação entre o luminóforo e a albumina não há a formação de insaturações, havendo a contribuição dos grupos cromóforos advindos da proteína para o deslocamento para azul com uma banda de baixa intensidade. Ainda assim, nas Figuras 47 e 48, a ser analisada em seguida, nota-se que há apenas deslocamentos para comprimento de onda menor, pois não há, neste caso, a influência do surfactante, o que pode ser um indício que justifique que os deslocamentos para o vermelho compareçam.

5.9.2 Amostra código RSS1

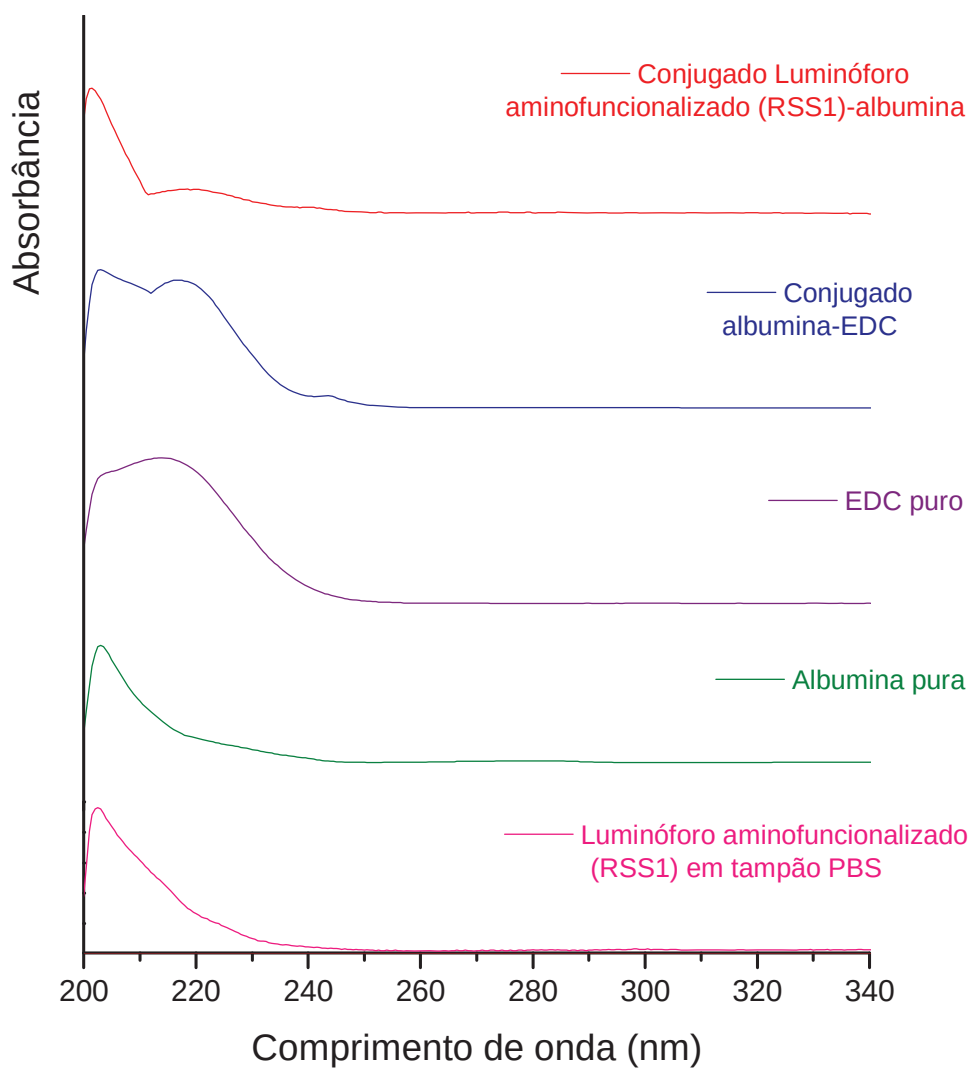


Figura 46 - Espectros de absorção no UV-VIS na região de 200 a 340 nm das nanopartículas aminofuncionalizadas (RSS1) em tampão PBS, albumina pura, EDC puro, sistema conjugado EDC-albumina, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS1)-albumina.

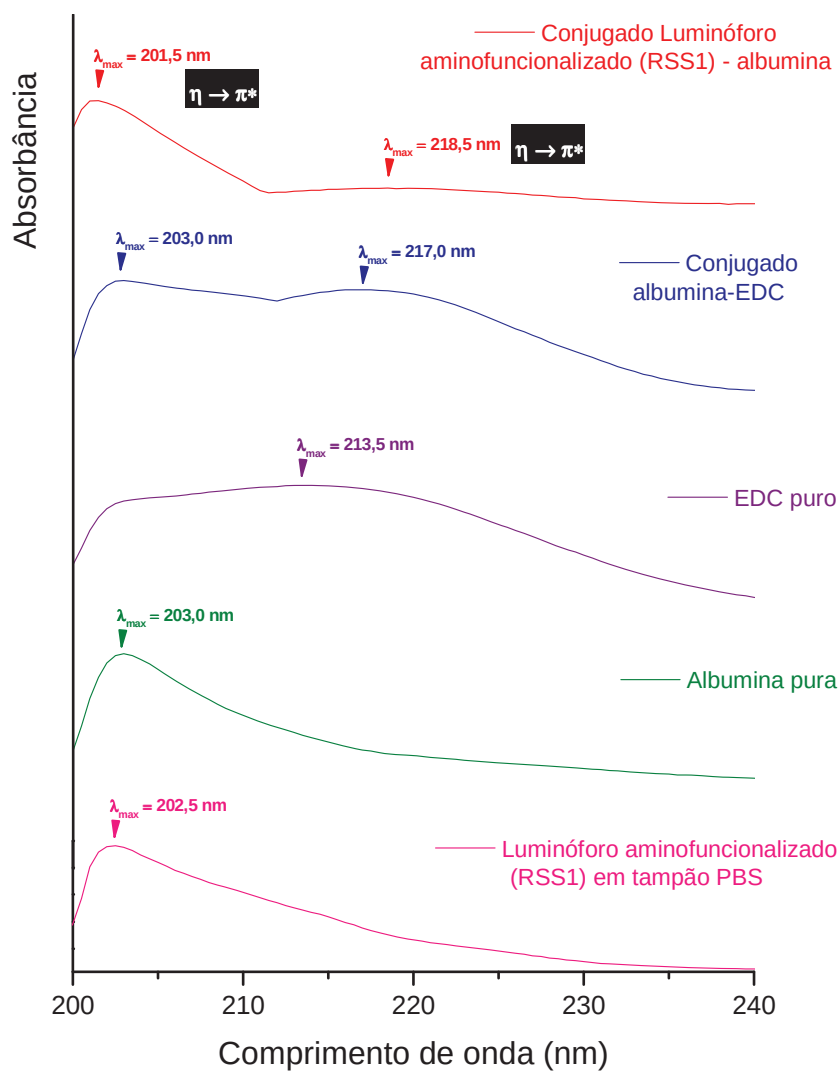


Figura 47 - Espectros de absorção no UV-VIS das nanopartículas aminofuncionalizadas (RSS1) em tampão PBS, albumina pura, EDC puro, sistema conjugado EDC-albumina, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS1)-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 200 a 240 nm.

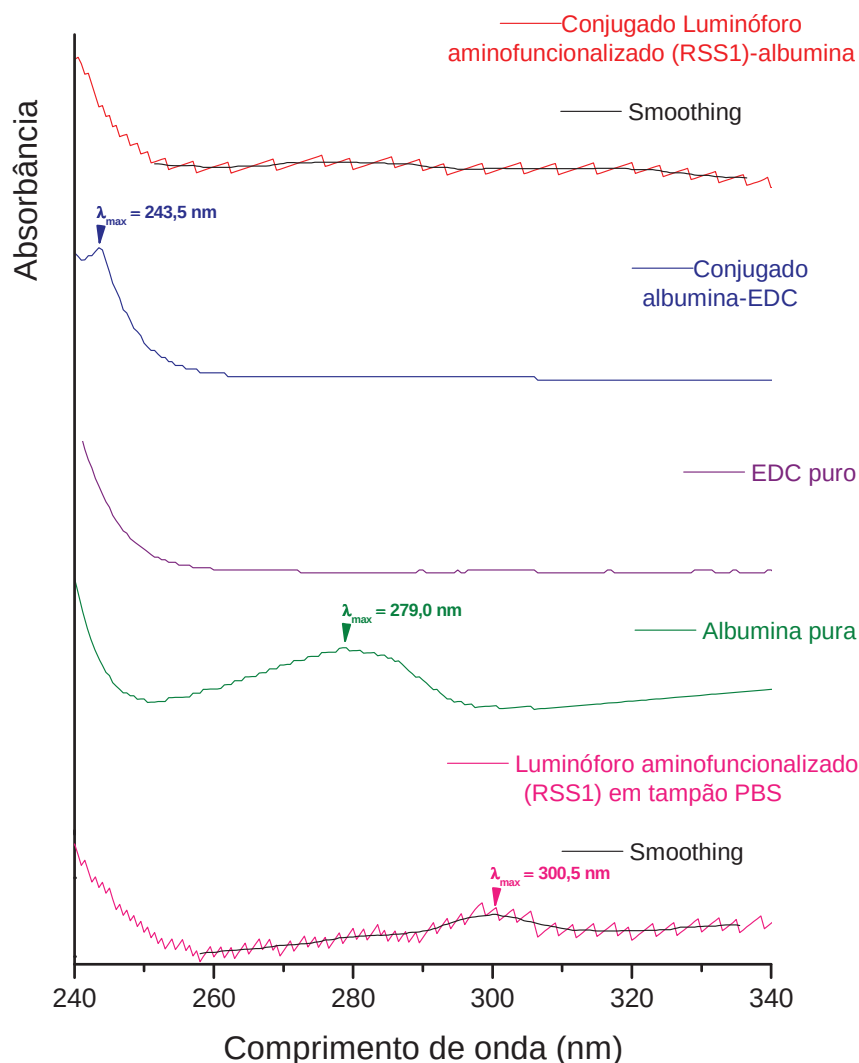


Figura 48 - Espectros de absorção no UV-VIS das nanopartículas aminofuncionalizadas (RSS1) em tampão PBS, albumina pura, EDC puro, sistema conjugado EDC-albumina, sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS1)-albumina. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 240 a 340 nm.

Tabela 12. Dados de máximos de absorção obtidos por espectroscopia UV-VIS para diferentes amostras e a relação de deslocamento entre bandas de uma mesma região apresentadas pelo sistema conjugado (RSS1/EDC).

Sistema	Bandas (λ_{nm})	$\Delta\lambda$ (nm)	Deslocamento
Luminóforo aminofuncionalizado (RSS1) em tampão PBS	202,5	1,0	Para o azul
	300,5	82,0	Para o azul
Albumina pura	203,0	1,5	Para o azul
	279,0	60,5	Para o azul
EDC puro	202,5	*****	*****
	217,5	*****	*****
	268,0	*****	*****
Sistema conjugado EDC-albumina	203,0	*****	*****
	217,0	*****	*****
	243,5	*****	*****
Sistema conjugado Luminóforo aminofuncionalizado (RSS1)-albumina	201,5	*****	*****
	218,5	*****	*****

Sem a influência do surfactante, observam-se apenas deslocamentos para o azul. Mesmo a ligação entre a nanopartícula e a proteína não provendo insaturação a não ser aquela do grupo carbonila, fica evidente a grande contribuição dos grupos cromóforos da albumina para o deslocamento de comprimentos de onda para uma região de menor energia.

5.10 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS DO SISTEMA CONJUGADO $Y_2O_3:Er,Yb$ AMINOFUNCIONALIZADO-STREPTAVIDINA-BIOTINA VIA EDC EM COMPARAÇÃO COM OS REAGENTES PUROS

Escolheu-se, após análise dos dados obtidos com diferentes tipos de partículas, utilizar amostras de $Y_2O_3:Er,Yb$ preparada utilizando sorbitol como agente polimerizante e cujo recobrimento fosse realizado sem o uso de surfactante.

Em relação ao *crosslinker*, foi selecionado o EDC, já que apresentou resultados satisfatórios e boas vantagens em comparação aos outros *crosslinkers* testados, principalmente em relação ao tempo de reação requerido para a conjugação.

5.10.1 Amostra código RSS1_SB

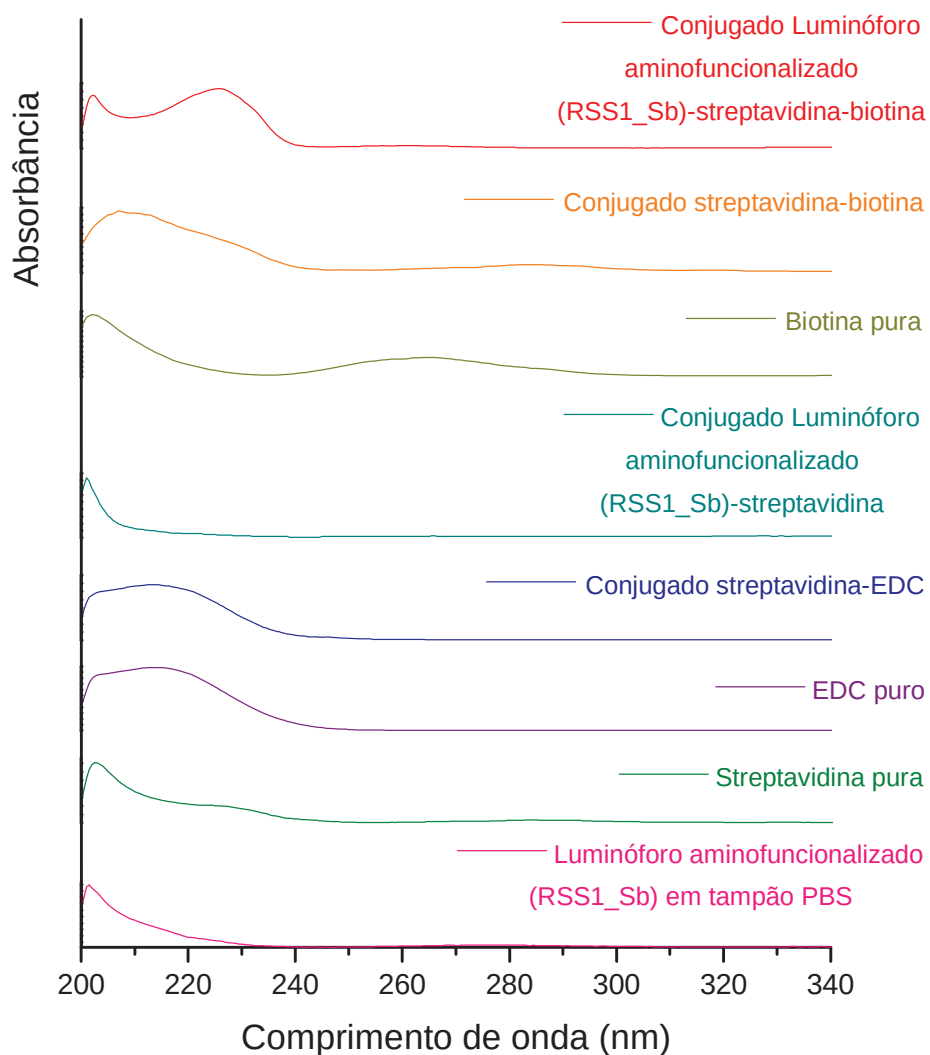


Figura 49 - Espectros de absorção no UV-VIS na região de 200 a 340 nm comparando o sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS1_SB)-streptavidina-biotina com os reagentes puros e sistema conjugados intermediários.

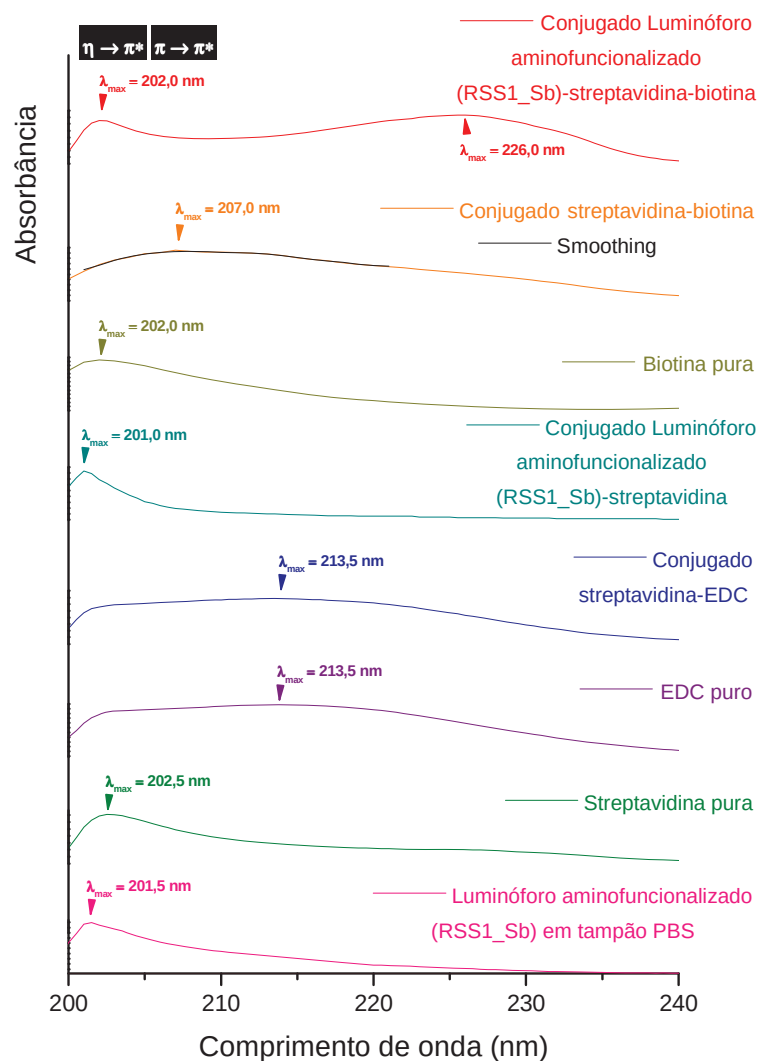


Figura 50 - Espectros de absorção no UV-VIS do sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS1_SB)-streptavidina-biotina com os reagentes puros e sistema conjugados intermediários. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 200 a 240 nm.

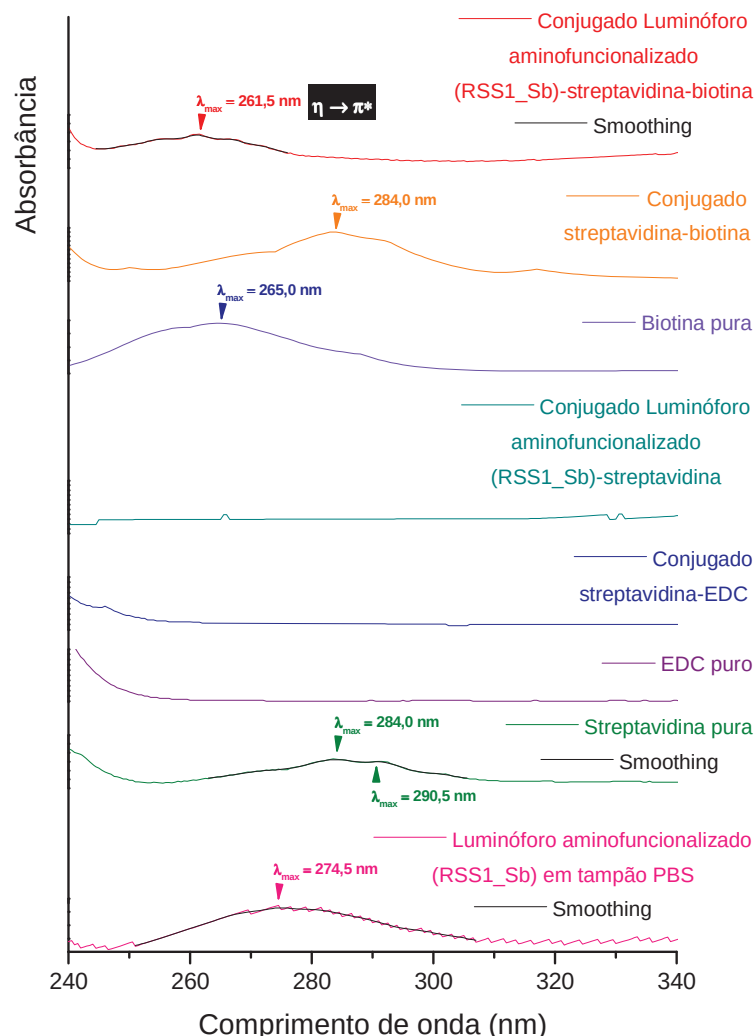


Figura 51- Espectros de absorção no UV-VIS do sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS1_SB)-streptavidina-biotina com os reagentes puros e sistema conjugados intermediários. Em destaque as bandas de maior intensidade na região de 240 a 340 nm.

Tabela 13. Dados de máximos de absorção obtidos por espectroscopia UV-VIS para diferentes amostras e a relação de deslocamento entre bandas de uma mesma região apresentadas pelo sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS1_SB)-streptavidina-biotina.

Sistema	Bandas (λ_{nm})	$\Delta\lambda$ (nm)	Deslocamento
Luminóforo aminofuncionalizado (RSS1_SB) em tampão PBS	201,5	0,5	Para o vermelho
	274,5	12,5	Para o azul
Streptavidina pura	202,5	0,5	Para o azul
	284,0	58,0	Para o azul
	290,5	29,0	Para o azul
EDC puro	213,5	*****	*****
Conjugado streptavidina-EDC	213,5	*****	*****
Conjugado Luminóforo aminofuncionalizado (RSS1_SB)-streptavidina	201,0	1,0	Para o vermelho
Biotina pura	202,0	0,0	Não deslocou
	265,0	3,5	Para o azul
Conjugado streptavidina-biotina	207,0	5,0	Para o azul
	284,0	22,5	Para o azul
Conjugado Luminóforo aminofuncionalizado (RSS1_SB)-streptavidina-biotina	202,0	*****	*****
	226,0	*****	*****
	261,5	*****	*****

Como pode ser observado nas Figuras 50 e 51, há predominância de deslocamentos para o azul. Mesmo com a ligação com a biotina, há uma grande contribuição dos elétrons não ligantes do oxigênio da carbonila e do nitrogênio que proporcionam deslocamentos para um comprimento de onda menor, embora deslocamentos para o vermelho ainda compareçam.

Vale então destacar que realmente a conjugação é efetiva e pode ser aplicada em protocolos de imunoenaios.

5.11 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE LUMINESCÊNCIA DO SISTEMA CONJUGADO $Y_2O_3:Er,Yb$ AMINOFUNCIONALIZADO-STREPTAVIDINA-BIOTINA VIA EDC

O sistema conjugado final luminóforo aminofuncionalizado-streptavidina-biotina foi obtido em suspensão. Para análise por espectroscopia de Luminescência foi feito um filme *cast* dessa suspensão. Filmes *cast* são filmes finos fabricados a partir da deposição de gotas da solução ou suspensão do material de interesse sobre um substrato (de quartzo ou de vidro). No caso deste trabalho, foram realizadas 12 deposições em uma placa de sílica fundida, sendo que entre uma e outra esperou-se a secagem ao ar para realização da próxima. Para efeito de comparação o mesmo tipo de filme foi obtido para a solução de streptavidina pura utilizada nas conjugações. Em seguida foram obtidos espectros de emissão fixando-se a excitação em 377 nm, ou seja, no comprimento de onda de excitação no UV relativo à transição $^4I_{15/2} \rightarrow ^4G_{11/2}$, característica do érbio(III) comparando-se o filme do sistema conjugado com o filme da streptavidina pura (que possui maior contribuição no sistema) e o luminóforo YOErYb-SB puro, sem conjugação, Figura 52.

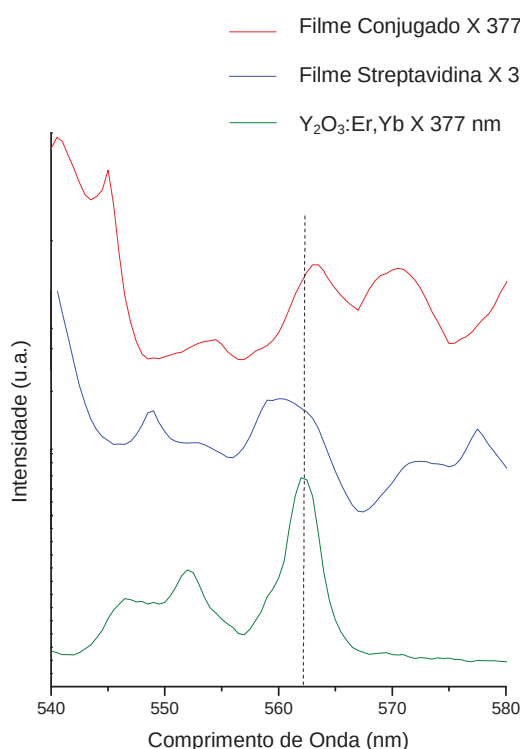


Figura 52 - Espectros de emissão a temperatura ambiente dos filmes *cast* do conjugado final e da Streptavidina pura (fenda de excitação 6 nm, fenda de emissão 15 nm), assim como do luminóforo na forma de pó YOErYb-SB (fenda de excitação e de emissão 2,5 nm), fixando-se comprimento de onda de excitação em 377 nm.

Devido à quantidade de reagentes utilizada nos processos de conjugação ser muito pequena, no sistema final obviamente o número de centros emissores é bem reduzido. Desta forma, para aquisição dos espectros dos filmes foi necessário utilizar abertura máxima da fenda de excitação para viabilizar a detecção de sinal. Na Figura 52 verifica-se que o luminóforo puro apresenta as transições relativas ao íon Er^{3+} no verde $^2\text{H}_{11/2}$, $^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$, com máximo por volta de 563 nm. No filme da streptavidina não se observa máximo nesta posição, sendo que no conjugado é detectado uma banda ligeiramente deslocada em relação ao luminóforo. Como no conjugado final há a presença da streptavidina ligada ao luminóforo, e esta apresenta um sinal largo na mesma região, pode estar havendo uma sobreposição e, portanto, interferência da proteína na medida. Não é esperado que a ligação entre a proteína e o luminóforo leve a deslocamentos das transições do íon Er(III) visto que a conjugação é efetivada via grupos NH_2 na superfície recoberta do óxido de ítrio. Obviamente uma medida sob excitação no IV próximo seria mais adequada para a aquisição do sinal do luminóforo, já que eliminaria a autofluorescência do sistema biológico. Porém esta análise não foi possível ser realizada até o momento devido a problemas de ordem experimental. Mesmo assim, pode-se considerar que o sinal observado é um indicativo de que o material produzido pode ser aplicado como marcador. No entanto, deve-se ressaltar que um estudo mais aprofundado sobre o aumento da concentração de luminóforo na conjugação para resultar em um conjugado com mais centros emissores seria uma perspectiva do trabalho, já que foi realizado com sucesso o estabelecimento do melhor protocolo de conjugação luminóforo-proteína.

5.12 MICROSCOPIA ÓPTICA DO SISTEMA CONJUGADO $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er,Yb}$ AMINOFUNCIONALIZADO-STREPTAVIDINA-BIOTINA VIA EDC

Foram obtidas imagens de microscopia óptica da superfície dos filmes *cast* do sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado-streptavidina-biotina e da streptavidina pura os quais haviam sido analisados por Espectroscopia de Luminescência. As imagens foram obtidas em duas condições de aumento: em 200 vezes e em 1000 vezes, como pode ser observado nas Figuras 53 e 54.



Figura 53 - Microscopia óptica do filme de streptavidina pura, a) aumentado em 200 vezes, b) aumentado em 1000 vezes.



Figura 54 - Microscopia óptica do filme do sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado-streptavidina-biotina, a) aumentado em 200 vezes, b) aumentado em 1000 vezes.

Pode-se notar na Figura 53 que na superfície do filme de streptavidina, a qual havia sido dissolvida em tampão PPS, é possível observar cristais maiores, provavelmente devido aos sais presentes no tampão fosfato, depositados sobre uma estrutura em forma de canais, que pode ser relativa à proteína. No entanto a distribuição destas estruturas não é homogênea. Já na Figura 54, onde se tem a superfície do filme do conjugado, lembrando que o mesmo também estava suspenso em tampão PPS, é possível observar certa organização na distribuição das estruturas. Esta organização no perfil de distribuição do material pode ser um indicativo da formação de um sistema complexo e que se auto-organiza. Tal sistema pode ser atribuído a efetiva conjugação entre as nanopartículas aminofuncionalizadas e as moléculas biológicas streptavidina e biotina.

5.13 ANÁLISE POR MICROSCOPIA RAMAN DO SISTEMA CONJUGADO $\text{Y}_2\text{O}_3\text{:Er, Yb}$ AMINOFUNCIONALIZADO-STREPTAVIDINA-BIOTINA VIA EDC

Os filmes da streptavidina e sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado-streptavidina-biotina também foram analisados por Microscopia Raman. Para auxiliar na interpretação dos resultados, também foi produzido um filme cast de uma amostra de uma solução concentrada de biotina nas mesmas condições descritas no item 3.8. Na Figura 55 têm-se as imagens dos campos analisados por espalhamento Raman, de cada filme, e na Figura 56, os espectros Raman relativos a cada superfície analisada.

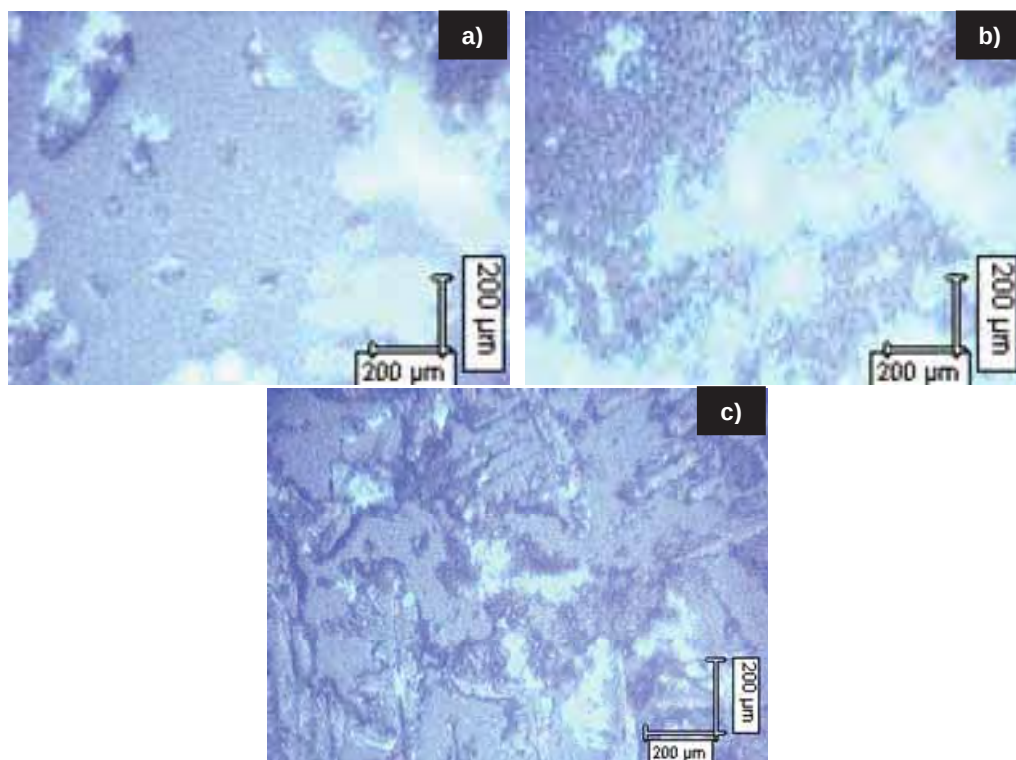


Figura 55 - Imagens dos campos analisados por espalhamento Raman, obtidas a partir do Microscópio óptico acoplado ao equipamento, dos filmes a) biotina pura, b) streptavidina pura, c) conjugado luminóforo aminofuncionalizado-streptavidina-biotina.

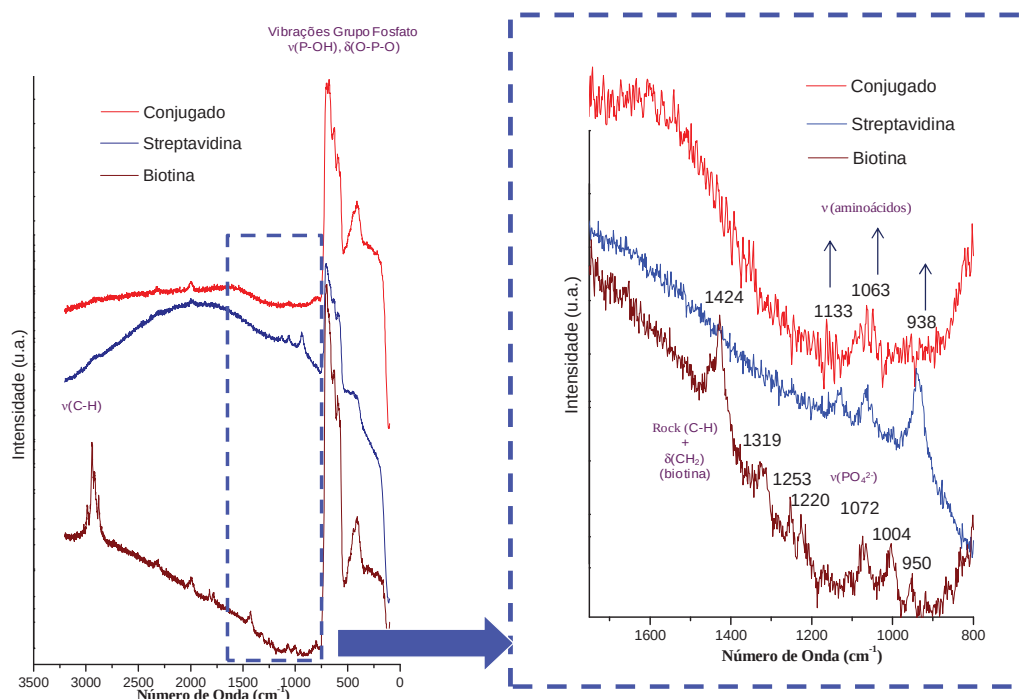


Figura 56 - Espectros Raman da biotina pura, streptavidina pura e sistema conjugado luminóforo aminofuncionalizado-streptavidina-biotina. Todos em tampão PBS.

A partir da comparação do perfil e posição em número de onda das espécies detectadas nos espectros Raman registrados para a superfície dos três filmes cast produzidos, Figura 56, com atribuições de espectros Raman dos sais Na_2HPO_4 e K_2HPO_4 disponíveis na literatura ^(54, 55), é possível confirmar a grande interferência do tampão PBS utilizado como meio em todos os casos. Na região em torno de 0 a 750 cm^{-1} são observadas bandas que se repetem em todos os espectros e que podem ser atribuídas a estiramentos do grupo fosfato, e, portanto, relativas à presença do tampão PBS. Essas bandas podem estar encobrindo possíveis vibrações Y-O relativas ao luminóforo e as quais se manifestariam na mesma região.

De acordo com estudo realizado de espectroscopia Raman do complexo conjugado biotina-avidina também reportado na literatura ⁽⁵⁶⁾, na região entre 1800 a 3500 cm^{-1} , ocorrem estiramentos C-H atribuídos à biotina, mas que também aparecem menos pronunciados na streptavidina e sistema conjugado. Por outro lado, na região entre 750 a 1800 cm^{-1} , a qual está ampliada na Figura 56 para facilitar a visualização, ocorrem máximos de banda atribuídos aos diferentes aminoácidos presentes na estrutura da streptavidina que também se repetem no sistema conjugado, indicando a presença da proteína no conjugado e conseqüentemente efetiva conjugação. Já quando se observa as bandas referentes

à biotina, há uma grande interferência do tampão PBS que dificulta uma análise mais apurada.

Assim, vale ressaltar que para a utilização da espectroscopia Raman como técnica de caracterização, é importante minimizar a influência do tampão PBS para uma efetiva análise. No trabalho utilizado como referência para atribuição das bandas da avidina e biotina ⁽⁵⁶⁾ os autores fizeram a dissolução da avidina e biotina em água e portanto, não tiveram o problema de interferência de tampão.

6 CONCLUSÕES

Foram utilizados dois tipos de nanopartículas aminofuncionalizadas diferentes, nas quais se diferenciam pelo emprego ou não do surfactante Triton X-100 na etapa de suas respectivas funcionalizações. Desta forma, pelos dados e discussões apresentados anteriormente, o melhor luminóforo a ser empregado é aquele preparado na ausência de surfactante na funcionalização de suas nanopartículas. Ainda em relação ao luminóforo, ressalta-se que a nanopartícula escolhida para conjugar com a proteína e posteriormente com a biotina (sistema de auto-reconhecimento) foi a aquela obtida pelo método Pechini, onde se utilizou como agente polimerizante o sorbitol, resultando em partículas relativamente mais luminescentes.

Em relação aos *crosslinkers*, independente de qual foi utilizado, todos cumprem de maneira efetiva o papel de ligar o luminóforo à proteína indicando que realmente a conjugação ocorre em todos os casos. Entretanto, um deles merece destaque especial pelo bom desempenho nos ensaios experimentais realizados e várias vantagens de seu emprego: o EDC.

O glutaraldeído, de natureza homobifuncional, mostrou-se bastante eficaz já que se liga especificamente apenas a grupos NH_2 , abundantes tanto na superfície da nanopartícula aminofuncionalizada, quanto na proteína. Contudo, apresenta os problemas já mencionados neste trabalho, Item Introdução, a respeito da possibilidade do processo resultar em autoconjugação, ligação cruzada intramolecular e/ou polimerização que podem ser minimizados com as lavagens realizadas durante a conjugação. Quando os espectros obtidos na região do UV-VIS são analisados, relativos à conjugação, fica claro que os deslocamentos são maiores do que quando utilizado o Sulfo-GMBS e o EDC, mas também é necessário frisar que este reagente é intensamente empregado em protocolos de conjugação por seu baixo custo, fácil manipulação e estocagem, baixa toxicidade e por ser adquirido com facilidade. A sua grande desvantagem é o tempo de reação, cerca de 26 horas à baixa temperatura, além das sucessivas lavagens requeridas.

O outro reagente utilizado, o *crosslinker* Sulfo-GMBS, apresentou resultados bons, mas é um reagente de custo bastante elevado, exige uma manipulação mais cuidadosa já que é comprado na forma sólida e também estocado a baixa

temperatura. Outra desvantagem é a demora para ser adquirido após a compra, além do que tem o mesmo tempo de reação do glutaraldeído.

Já o EDC, de natureza heterobifuncional, apresentou resultados também satisfatórios, sendo promissor para os mesmos fins da aplicação em relação ao glutaraldeído e ao Sulfo-GMBS. Sua principal vantagem é o tempo de reação, já que enquanto a conjugação com glutaraldeído e Sulfo-GMBS tem mais de 24 horas de duração e uma etapa de lavagem a mais, com EDC o tempo é de cerca de 4 horas à temperatura ambiente e menos etapas de lavagem. As desvantagens são que o reagente é um pouco mais caro do que o glutaraldeído, porém com custo menor do que Sulfo-GMBS, mas exige estocagem à baixa temperatura.

As análises realizadas por Espectroscopia Raman não foram conclusivas, visto a grande interferência provida pelo tampão PBS presente no meio, embora tenha sido possível obter indícios da presença da proteína no conjugado final, corroborando com os dados de UV-VIS.

Portanto, o protocolo desenvolvido nesse trabalho mostrou-se promissor para ser aplicado em imunoenaios utilizando como agente de ligação cruzada, *crosslinker*, o EDC. Embora a luminescência das nanopartículas devam ainda ser objeto de estudo e aperfeiçoamento.

7 PERSPECTIVAS

O protocolo desenvolvido neste trabalho vem a aperfeiçoar aqueles já existentes uma vez que diminui bastante o tempo de reação e contribui para motivação de novos estudos, principalmente no que tange a utilização do *crosslinker* EDC como um reagente em potencial para emprego em ensaios biológicos.

Vale frisar que a metodologia desenvolvida é reprodutível e pode ser aplicada em uma gama de outros sistemas, principalmente imunoenaios do tipo Elisa. Embora se tenha obtido resultados muitos bons em relação à conjugação, foco desse trabalho, a melhoria na eficiência da luminescência das nanopartículas é requerida, podendo ser apenas questão de encontrar uma quantidade ótima de nanopartículas a serem conjugadas a fim de atingir uma resposta de emissão de luminescência mais satisfatória.

Para que a caracterização complementar utilizando as técnicas Raman e FTIR seja viável, um estudo visando a minimização da interferência do tampão no meio deverá ser realizado.

Outros projetos já estão em andamento no grupo de pesquisa no sentido de desenvolver marcadores já funcionalizados mais eficientes, com os quais poderão ser testados os protocolos de conjugação propostos neste presente trabalho.

8 REFERÊNCIAS

- ¹ NIYAMA, E. et al. Filmes delgados luminescentes obtidos a partir de hidroxicarbonatos de ítrio ativados por európio ou térbio. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 183-187, 2004.
- ² ISSLER, S. L.; TORARDI, C. C. Solid state chemistry and luminescence of X-ray phosphors. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 229, n. 1, p. 54-65, 1995.
- ³ WIETHAUS, Guilherme. **Síntese e caracterização de novas iminas com aplicação em óptica não-linear**. 2010. 163f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- ⁴ BLASSE, G.; GRABMAIER, B. C. **Luminescent Materials**. Springer-Verlag: Berlin, v. 231. 1994.
- ⁵ EILERS, H. Effect of particle/grain size on the optical properties of $\text{Y}_2\text{O}_3\text{:Er, Yb}$. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 474, p. 569-572, 2009.
- ⁶ HYPPÄNEN, I. et al. The effect of Y^{3+} co-doping on the persistent up-conversion luminescence of the $\text{ZrO}_2\text{:Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ nanomaterials. **Journal of Luminescence**, v. 129, p. 1739-1743, 2009.
- ⁷ RONDA, C. R.; JÜSTEL, T.; NIKOL, J. Rare earth phosphors: fundamentals and applications. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 669, p. 275-277, 1998.
- ⁸ BEVERLOO, H. B.; VANSCHADEWIJK, A.; TANKE, H. J. Inorganic phosphors as new luminescent labels for immunocytochemistry and time-resolved microscopy. **Cytometry**, v. 11, p. 784-792, 1990.
- ⁹ BEVERLOO, H. B. et al. Preparation and microscopic visualization of multicolor luminescent immunophosphors. **Cytometry**, v. 13, p. 561-670, 1992.
- ¹⁰ MARTINS, T. S.; ISOLANI, P. C. Terras raras: aplicações industriais e biológicas. **Química Nova**, v. 28, n.1, p. 111-117, 2005.
- ¹¹ ZARLING, D. A. et al. Up-Converting Reporters for Biological and Other Assays Using Laser Excitation Techniques, US Patent, p. 5, 674-698, 1997.
- ¹² WARSINKE, A.; BERKERT, A.; SCHELLER, F. W. Electrochemical immunoassays. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 366, p. 622-634, 2000.
- ¹³ ZIJLMANS, H. J. M. A. et al. Detection of cell and tissue surface antigens using up-converting phosphors: a new reporter technology. **Analytical Biochemistry**, v. 267, p. 30-36, 1999.
- ¹⁴ HAMPL, J. et al. Up converting phosphor reporters in immunochromatographic assays. **Analytical Biochemistry**, v. 288, p. 176-187, 2001.

- 15 Disponível em: <<http://www.piercenet.com/Products/Browse.cfm?fldID=CE4D6C5C9904C46E01232683>>. Acesso em: 26 mai. 2007.
- 16 WONG, S. S. **Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking**. Flórida: CRC Press, Inc. 1993.
- 17 HUN, X.; ZHANG, Z. A novel sensitive staphylococcal enterotoxin C₁ fluoroimmunoassay based on functionalized fluorescent core-shell nanoparticle labels. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1623-1629, 2007.
- 18 HUN, X.; ZHANG, Z. Functionalized fluorescent core-shell nanoparticles used as a fluorescent labels in fluoroimmunoassay for IL-6. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 2743-2748, 2007.
- 19 TANG, J. et al. Preliminary studies of application of eggshell membrane as immobilization platform in sandwich immunoassay. **Sensors and Actuators B**, v. 140, p. 200-205, 2009.
- 20 TANG, D-Q. et al. Amplification of the antigen-antibody interaction from quartz crystal microbalance immunosensors via back-filling immobilization of nanogold on biorecognition surface. **Journal of Immunological Methods**, v. 316, p. 144-152, 2006.
- 21 RUDENKO, N. V. et al. Barnase-barstar high affinity interaction phenomenon as the base for the heterogenous bioluminescence pseudorabies virus' immunoassay. **Journal of Biochemical Biophysical Methods**, v. 70, p. 605-611, 2007.
- 22 ROUTH, V. H.; HELKE, C. J. A novel technique for producing antibody-coated microprobes using a thiol-terminal silane and a heterobifunctional crosslinker. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 71, p. 163-168. 1997.
- 23 CHATRATHI, M. P.; WANG, J.; COLLINS, G. E. Sandwich electrochemical immunoassay for the detection of Staphylococcal enterotoxin B based on immobilized thiolated antibodies. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 2932-2938, 2007.
- 24 WEI, B. et al. Development of an antisense RNA delivery system using conjugates of the MS2 bacteriophage capsids and HIV-1 TAT cell penetrating peptide. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 63, p. 313-318, 2009.
- 25 NARA, S. et al. Use of biotin-streptavidin system for developing a viable, sensitive and specific antigen heterologous assay for hapten. **Talanta**, v. 77, p. 210-216, 2008.
- 26 Disponível em: <<http://www.piercenet.com>>. Acesso em: 30 ago. 2008.
- 27 DIAMANDIS, E. P.; CHRISTOPOULOS, T. K. The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. **Clinical Chemistry**, v. 37, p. 625-636, 1991.

-
- ²⁸ TAN, L. P.; YAO, S. Q. Intein-mediated, in vitro and in vivo protein modifications with small molecules. **Protein and Peptide Letters**, v. 12, p. 769-775, 2005.
- ²⁹ Encyclopédia Britannica online. Disponível em: <<http://www.britannica.com/eb/article?eu=119724&hook=593825-593825.hook>>. Acesso em 23 nov. 2006.
- ³⁰ Disponível em: <<http://www.friedli.com/research/PhD/chapter5a.html>>. Acesso em: 18 fev. 2008.
- ³¹ MAIA, L. J. Q.; et al. Er:YAB nanoparticles and vitreous thin films by the polymeric precursor method. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, p. 1251-1262, 2008.
- ³² FILHO, P. C. S.; SERRA, O. A. Tripolyphosphate as precursor for Repo4: Eu³⁺ (Re = Y,La,Gd) by a polymeric method. **Journal of Fluorescence**, v. 18, p. 329-337, 2008.
- ³³ MAIA, L. J. Q.; et al. Structural studies in the BaO–B₂O₃–TiO₂ system by XAS and ¹¹B-NMR. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 178, p. 1452-1463, 2005.
- ³⁴ CAMACHO, S. A.; LARANJA, M. L.; ALVINO, K. L.; PIRES, A. M. In: XV Encontro de Química da Região Sul - Química e a interdisciplinaridade. **Resumos**. Ponta Grossa: SBQ-Regional SUL/UEPG, 2007. p. QI-044.
- ³⁵ ASHTARI, P. et al. An efficient method for recovery of target ssDNA based on amino-modified silica-coated magnetic nanoparticles. **Talanta**, v. 67, p. 548-554, 2005.
- ³⁶ LIU, S.; ZHANG, Z.; HAN, M.; Gram-scale synthesis and biofunctionalization of silica-coated silver nanoparticles for fast colorimetric DNA detection. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 2595-2600, 2005.
- ³⁷ KOSTER, H. A.; JONGH, H. H. J. Spectrophotometric tool for the determination of the total carboxylate content in proteins; molar extinction coefficient of the enol ester from Woodward's Reagent K Reacted with protein carboxylates. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 2512-2516, 2003.
- ³⁸ GELAMOS, J. P. et al. Up-converter nanophosphor Y₂O₂S:Er,Yb aminofunctionalized containing or not spherical silica conjugated with BSA. **Journal of Luminescence**, v. 129, p. 1726-1730, 2009.
- ³⁹ GREEN, D. L. et al. Size, volume fraction, and nucleation of Stöber silica nanoparticles. **Journal Colloid Interface Science**, v. 266, p. 346-358, 2003.
- ⁴⁰ NOZAWA, K.; et al.; Smart control of monodisperse Stöber Silica Particles: effect of reactant addition rate on growth process. **Langmuir**, v. 21, p. 1516-1523, 2005.

-
- ⁴¹ COSTA, C. A. R. et al. Size effects on the microchemistry and plasticity of Stöber Silica Particles: a study using EFTEM, FESEM, and AFM-SEPM microscopies. **Langmuir**, v. 17, p. 189-194, 2001.
- ⁴² MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.
- ⁴³ SHARMA, Y. K. et al. Spectral studies of erbium doped soda lime silicate glasses in visible and near infrared regions **Optical Materials**, v. 29, p. 598-604, 2007.
- ⁴⁴ PIRES, A. M.; SERRA, O. A.; DAVOLOS, M. R. Yttrium oxysulfide nanosized spherical particles doped with Yb and Er or Yb and Tm: efficient materials for up-converting phosphor technology field. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 374, p.181-184, 2004.
- ⁴⁵ PIRES, A. M.; et al. Er, Yb Doped Yttrium Based Nanosized Phosphors: Particle Size, "Host Lattice" and Doping Ion Concentration Effects on Upconversion Efficiency. **Journal of Fluorescence**, v.16, p. 461-468, 2006.
- ⁴⁶ GUO, H.; QUIAO, Y. M. Preparation, characterization, and strong upconversion of monodisperse $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$ microspheres. **Optical Materials**, v. 31, p. 583-589, 2009.
- ⁴⁷ EILERS, H. Effect of particle/grain size on the optical properties of $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}, \text{Yb}$. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 474, p. 569-572, 2009.
- ⁴⁸ GAO, F.; WU, G.; ZHOU, H.; BAO, D. Strong upconversion luminescence properties of Yb^{3+} and Er^{3+} codoped $\text{Bi}_4\text{Ti}_3\text{O}_{12}$ ferroelectric thin films. **Journal of Applied Physics**, v. 106, 2009.
- ⁴⁹ SUN, C. Y.; et al. Assembly and upconversion luminescence of lanthanide–organic frameworks with mixed acid ligands. **Inorganica Chimica Acta**, v. 362, p. 325-330, 2009.
- ⁵⁰ VETRONE, F.; et al. The active-core/active-shell approach: a strategy to enhance the upconversion luminescence in lanthanide-doped nanoparticles. **Advanced Functional Materials**, v.19, p. 2924-2929, 2009.
- ⁵¹ KLUG, M., SANCHES, et al. Análise das isothermas de adsorção de Cu(II), Cd(II), Ni(II) e Zn(II) pela N-(3,4-dihidroxibenzil) quitosana empregando o método da regressão não linear. **Química Nova**, v. 21, n. 2, p. 410-413, 1998.
- ⁵² SOLOMONS, T. W. Graham; FRYHLE, Craig B.; **Química Orgânica**. 8 ed. v. 2. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos S.A., 2006.
- ⁵³ NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4 ed. W. H. Freeman, 2005.

⁵⁴ GHULE, A; BHONGALE, C. ; CHANG, H. Monitoring dehydration and condensation processes of $\text{Na}_2\text{HPO}_4/12\text{H}_2\text{O}$ using thermo-Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 59, p. 1529-1539, 2003.

⁵⁵ LIU, W. L.; et al. Spectroscopic manifestation for the isotopic substitution in potassium dihydrogen phosphate. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 430, p. 226-231, 2007.

⁵⁶ FAGNANO, C.; FINI, G.; TORREGGIANI, A. Raman spectroscopic study of the avidin-biotin complex. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 26, n. 11, p. 991-995, 1995.