

Conjugação de Nanopartículas Luminescentes com Sistemas Biológicos

Karla C. Lombardi Alvino¹, Ana Maria Pires¹, Osvaldo Antonio Serra². ¹Depto. Química, Física e Biologia, FCT-UNESP – Presidente Prudente; ² Lab. Terras Raras – Depto. Química – FFCLRP- USP. Área: Exatas.

Nanopartículas luminescentes com conversão ascendente, as quais são capazes de converter radiação de excitação com energia menor e emitir radiação de aproximadamente a metade ou um terço do comprimento da excitação, processo este também conhecido como *up-conversion*, são ótimos conversores de radiação IV em visível.¹ Recentemente, a utilização de compostos luminescentes tem ganho espaço cada vez maior como marcadores em testes diagnósticos do tipo imunensaio na detecção e quantificação de antígenos ou anticorpos utilizados como reagentes específicos.² Os íons de terras raras, em especial, apresentam uma ampla importância em sistemas biológicos, pois além de sua grande relevância como marcadores em imunologia, são bastante aplicados na detecção de funções celulares *in vivo* para elucidação estrutural e função de enzimas e proteínas.³ O teste de imunofluorescência é um dos mais utilizados nos diagnósticos de laboratório para a pesquisa de anticorpos e cada vez mais com anticorpos monoclonais para a pesquisa de microrganismos e seus componentes em espécies clínicas. Baseia-se na capacidade das moléculas de anticorpos se ligarem covalentemente a fluorocromos sem perder a sua reatividade específica com o antígeno.³

A imunofluorescência pode ser de dois tipos, a imunofluorescência direta (IFD) ou imunofluorescência indireta (IFI) ou tipo sanduíche. Na IF direta (IFD) o anticorpo específico contra a proteína viral é marcado com marcador luminescente. Incuba-se esse anticorpo com o material suspeito, lava-se para remover o anticorpo que não se ligou, e observa-se em microscópio de fluorescência.⁴ Na imunofluorescência indireta (IFI) ou tipo sanduíche, incubase inicialmente o material suspeito com o anticorpo específico contra as proteínas do vírus. Esse anticorpo é chamado de anticorpo primário e geralmente é produzido em camundongos, coelhos, cabras ou na espécie de interesse. Após incubação de 1 hora, lava-se para remover o anticorpo que não se ligou ao antígeno. Na sequência, incubase o material por 1 hora adicional com um anticorpo produzido contra o anticorpo primário, que é chamado de anticorpo secundário, o qual é então conjugado ao marcador fluorescente.⁴

Quando o marcador luminescente está na forma de partículas de um material inorgânico, no entanto, para o sucesso do ensaio e conjugação efetiva entre o marcador e o reagente específico deve haver uma funcionalização prévia das partículas. O nano marcador luminescente deve então possuir um grupo funcional capaz de se ligar aos reagentes específicos, pois o princípio básico constitui na imobilização de um dos reagentes na fase sólida, enquanto os demais podem ser ligados a uma enzima de interesse (analito). Um sistema de auto-reconhecimento bastante utilizado para fazer a ligação entre marcador-reagente específico-analito é o do par avidina – biotina. Avidina é uma glicoproteína que combina-se especificamente com biotina, uma vitamina. O peso molecular da avidina, a qual forma um tetrâmero, é 16.200, e sua sequência de aminoácidos é conhecida.⁵

Desta forma, o objetivo deste trabalho é a investigação de protocolos de conjugação entre nano marcadores luminescentes recobertos com sílica funcionalizada ou não e a proteína Streptavidina, que faz parte do sistema de auto-reconhecimento biotina-avidina utilizado em imunoenaios.

Como parte inicial do trabalho investigativo, escolheu-se para testes iniciais o luminóforo $Y_2O_3:Er^{3+}, Yb^{3+}$ (2%, 1%),^{6,7} preparado previamente pela sulfurização de resina precursora obtida pelo método Pechini, com tamanhos de partículas de 10 e 20 nm. Como teste inicial de conjugação utilizou-se o método da adsorção, onde as partículas do luminóforo foram suspensas em DMSO (dimetilsulfóxido), deixadas sob agitação em ultrassom, e depois à suspensão adicionou-se solução salina tamponada. A suspensão foi centrifugada, e o depositado reservado. À este depositado adicionou-se solução de Avidina (no caso, NeutrAvidina), fez-se a resuspensão, e deixou-se incubando sob agitação em frasco fechado. Após este tempo, separou-se as partículas conjugadas por centrifugação, seguida de lavagem com tampão. Estas partículas conjugadas foram utilizadas em ensaios biológicos para diagnóstico, no entanto, não

apresentaram reprodutibilidade nos resultados. Desta forma, comprova-se que a utilização de protocolos de conjugação onde o nano marcador não apresenta uma superfície que promova ligação efetiva com a Streptavidina compromete o sucesso do ensaio biológico.

As partículas foram então recobertas apenas com sílica a partir de tetraetoxissilano (TEOS) adaptando-se método descrito na literatura para sistemas coloidais de prata ⁸. Para tal, 4 mg do nano marcador foram suspensas em 20 mL de água e centrifugadas para separação das partículas maiores das menores. O sedimentado foi separado do sobrenadante, avaliou-se a massa do mesmo para a estimativa de quanto ficou em suspensão. Às partículas suspensas, adicionou-se etanol, ajustou-se pH com hidróxido de amônio, e gotejou-se solução etanólica de TEOS. O sistema foi deixado em repouso por 24 horas e depois separado e lavado com etanol por centrifugação.

Estas partículas recobertas foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscópio de transmissão Philips CM200, e por espectroscopia de luminescência, excitando-se com laser portátil InColaser, 980-1000 nm, no equipamento espectrofluorímetro Fluorolog3 ISA/Jobin-Yvon, fotomultiplicadora Hamamatsu R928P, não refrigerada, operando em 950 volts, adequada para a região de 240 a 820 nm.

Na Figura 1 tem-se as imagens de MET das partículas antes e depois do recobrimento, e pode-se observar facilmente a presença de uma camada de sílica na superfície de um aglomerado de partículas, Figura 1b.

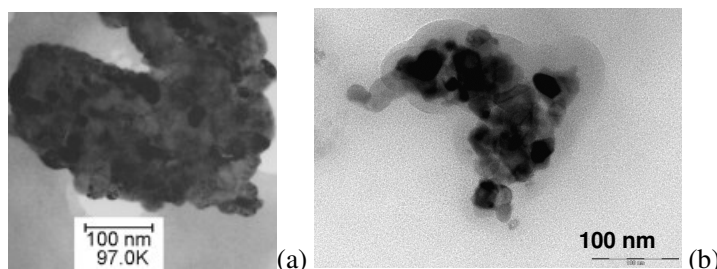


Figura 1- Microscopia eletrônica de transmissão da amostra $Y_2O_2S:Er^{3+}, Yb^{3+}$ (2%, 1%) (a) antes do recobrimento com sílica aminofuncionalizada; (b) após o recobrimento com sílica aminofuncionalizada.

Na Figura 2, estão representados os espectros de emissão destas mesmas amostras antes e depois do recobrimento.

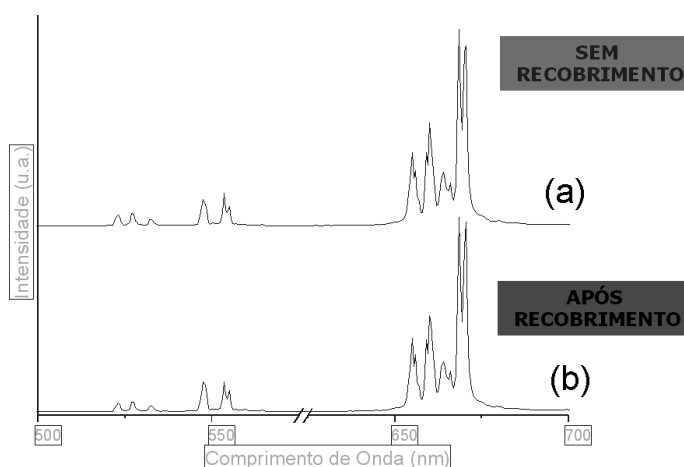


Figura 2- Espectros de emissão obtidos a temperatura ambiente e excitação utilizando laser portátil de 980 nm, 70 mW de potência da amostra de $Y_2O_2S:Er^{3+}, Yb^{3+}$ (2%, 1%) (a) antes do recobrimento com sílica aminofuncionalizada; (b) após o recobrimento com sílica aminofuncionalizada.

Observa-se pela análise da Figura 2 que as características espectroscópicas do nanomarcador não são alteradas após o recobrimento com sílica. Portanto o material é promissor para que seja utilizado em futuros testes de conjugação com Streptavidina. No entanto, para que a conjugação das partículas recobertas seja potencializada, a sílica deve estar aminofuncionalizada, o que significa que deve-se partir de uma mistura de TEOS e, por exemplo, APTMS ((3-Aminopropil)-triethoxisilano), para introduzir grupamentos amino na superfície da partícula. Haverá então a necessidade de caracterização do material recoberto quanto ao número de grupamentos amino disponíveis utilizando o método na ninidrina⁹, e assim avaliar a eficiência de conjugação com a molécula biológica. Após a investigação do quão efetivo será a conjugação da nanopartícula funcionalizada e a molécula biológica de interesse será possível elaborar o protocolo do ensaio biológico na sua totalidade buscando a maior sensibilidade de detecção.

Agradecimentos : FAPESP, CNPq, RENAMI, Pesquisadoras da Fiocruz, Instituto Aggeu Magalhães, UFPE, Recife: Dra. Valéria Pereira, Maria Edileuza Felinto de Brito, e Luiza Reis,

Referências Bibliográficas

¹ BLASSE, G.; GRABMAIER, B. C; *Luminescent Materials*. Springer-Verlag: Berlin, v.231, 1994.

² NIYAMA, E.; DE ALENCAR, A.C.; DA VILA, L. D. ; STUCCHI, E. B. , DAVALOS, M.R. Filmes delgados luminescentes obtidos a partir de hidroxicarbonatos de ítrio ativados por európio ou térbio. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 183-187, 2004.

³ MARTINS, T. S.; ISOLANI, P. C. *Terras raras: Aplicação Industrial e biológicas*, Química Nova, v. 28, n.1, p. 111-117, 2005.

⁴ MARTINS, R. A., As primeiras investigação de Marie Curie Sobre Elementos radioativos. Revista da SBHC, n. 1, p. 29-41, 2003.

⁵ Apresenta informações sobre Up converting. Disponível em: <<http://www.britannica.com/eb/article?eu=119724&hook=593825> - 593825.hook>

⁶ PIRES, A. M.; DAVOLOS, M. R.; MALTA, O. M. L. *Eu³⁺ - O²⁻ associates luminescence in barium and zinc orthosilicate*. J. Luminesc., v. 72-74, 1997.

⁷ PIRES, A. M. *Hidroxicarbonato de gadolínio ativado com Eu³⁺ ou Tb³⁺ como precursor de óxidos, oxissulfetos e silicatos luminescentes*. 2001. Tese (Doutorado em Química)-Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

⁸ ZHANG, S. L.Z., HAN, M., Gram-scale synthesis and biofunctionalization of silica-coated silver nanoparticles for fast colorimetric DNA detection. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 2595, 2005.

⁹ SHAPILOV, O. D.; KAYUMOV, V. G.; KRASHENYUK, A. I. J. Anal. Chem. USSR, v. 38, p. 436, 1983.