

Determinação de IgG_h por meio de um imunoenensaio baseado na anti-agregação de NPAg

*Daniela M. Batistela¹ (PG); Renato S. Freire (PQ)¹; Cassius V. Stevani (PQ)¹

daniela@iq.usp.br; ¹Instituto de Química-USP

Palavras Chave: anticorpos, nanopartículas de prata, imunoenensaio

Introdução

Existe um grande interesse na aplicação de nanopartículas no desenvolvimento de métodos analíticos devido às propriedades singulares desses materiais, por exemplo, a ressonância plasmônica de superfície.

Neste trabalho é apresentado um imunoenensaio para determinação de imunoglobulinas humanas (IgG_h) utilizando nanopartículas de prata (NPAg). Esse ensaio é baseado nos diferentes estágios de estabilidade (agregação) coloidal das NPAg, devido à presença do analito (antígeno). O procedimento de detecção de IgG_h consiste em um mecanismo de anti-agregação, em que a ligação do analito ao anticorpo que reveste as NPAg tem a função de impedir a agregação induzida por sal via a diminuição da estabilidade eletrostática do coloide¹ (Figura 1).

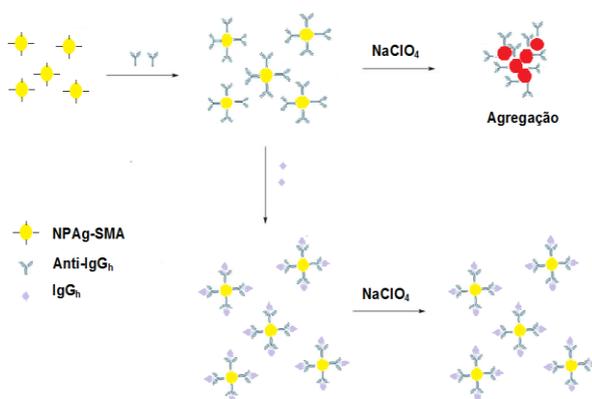


Figura 1 Esquema do imunoenensaio de anti-agregação

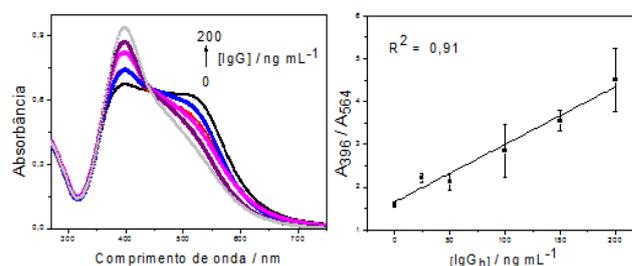
A quantificação do analito pode ser realizada por espectrofotometria UV-Vis, sendo um método rápido, sensível e de baixa complexidade^{1,2}.

Resultados e Discussão

Uma solução coloidal estável de NPAg e de coloração amarela (absorção em 396 nm, A_{396}) foi obtida por meio da redução de AgNO_3 com NaBH_4 . As NPAg foram funcionalizadas com ácido mercaptossuccínico (AMS) e incubadas (18 h; 4°C) com anti-IgG_h para a imobilização do anticorpo por interação eletrostática. Após a conjugação o coloide permaneceu estável. O ensaio consistiu na adição das soluções padrões do antígeno e do sal (NaClO_4) à solução do conjugado NPAg-anti-IgG. Foi

realizada a medida da absorbância após 15 min, tempo necessário para a estabilização da agregação. A agregação é acompanhada do surgimento de um novo pico de absorção em 564 nm (A_{564}). Esse processo é minimizado devido à ligação do antígeno (IgG_h), como pode ser observado na Figura 2.

Após otimização da concentração de anti-IgG_h e de AMS, pH e temperatura, foi obtida a curva analítica por meio da correlação entre os valores de absorbância que indicam as diferentes intensidades de agregação (A_{396}/A_{564}) em função da concentração de IgG_h. Obteve-se uma relação linear quando a concentração de IgG_h variou de 0 a 200 ng mL⁻¹ (Figura 2), e o limite de detecção foi estimado em 20 ng mL⁻¹.



Conclusões

Os resultados comprovam que baixas concentrações de IgG_h podem ser detectadas por meio de um imunoenensaio de anti-agregação utilizando NPAg. Um método relativamente simples e de baixo custo que pode ser adaptado para a detecção de anticorpos com diferentes especificidades.

Agradecimentos

CNPQ, IQ-USP e FAPESP

¹ Yuan Y., Zhang J., Zhang H., Yang X. (2012) *Analyst* 137, 496–501.

² Yuan Y.; Zhang J.; Zhang H.; Yang X. (2011) *Biosens. Bioelectron.* 26, 4245–4248.