

Investigação de Protocolos de Conjugação de Nanopartículas Aminofuncionalizadas com Sistema de Auto-reconhecimento Avidina-biotina Utilizando o Crosslinker EDC

João Paulo Gelamos^{1*} (PG), Marlon Larry Laranja¹ (PQ), Sabrina Alessio Camacho¹ (PQ), Thais Cerqueira² (IC), Ana Maria Pires² (PQ). * joaocz@gmail.com

1Depto. Quím. e Ciên. Amb., IBILCE-UNESP, R. Cristóvão Colombo 2265 – CEP: 15054-000, São J. do Rio Preto-SP.

2 Depto. Fis., Quím., e Biol., FCT-UNESP, R. Roberto Simonsen, 305 – CEP 19060-900-Presidente Prudente-SP.

Palavras Chave: *luminóforo, crosslinker, protocolo.*

Introdução

O luminóforo $Y_2O_3:Er,Yb^1$ obtido pelo método Pechini Modificado apresenta o processo de *up conversion* que, após ser recoberto com sílica aminofuncionalizada^{2,3}, exibe potencial para ser aplicado como marcador na detecção de antígenos ou anticorpos⁴. Para tanto se utilizou o sistema de auto-reconhecimento avidina-biotina, onde se conjuga o marcador com avidina e o antígeno ou anticorpo é biotilado⁵. Contudo um agente de ligação cruzada (crosslinker) é requerido para efetuar a conjugação, sendo cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) vantajoso em comparação aos reagentes mais empregados encontrados na literatura. Neste trabalho foi investigada a conjugação do luminóforo com o sistema avidina-biotina, demonstrando a eficácia para emprego em imunoenaios.

Resultados e Discussão

À solução de streptavidina 1 mg/mL adicionou-se solução do *crosslinker* EDC, ligeiramente em excesso, deixando o sistema em reação por 2 h à temperatura ambiente. Paralelamente, uma massa conhecida do luminóforo funcionalizado (RSS1_SB) foi suspensa em 1 mL de tampão PBS 0,01 mol/L em ultra-som e adicionada ao conjugado EDC-streptavidina, permanecendo em reação por 2 h à temperatura ambiente. Seguiu-se a etapa de lavagem por centrifugação, 3 vezes com tampão PBS 0,01 mol/L, para eliminar excesso do *crosslinker*. Em seguida adicionou-se uma solução de biotina 10 mg/mL em tampão borato de sódio. O sistema foi deixado em reação à temperatura ambiente por 1,5 h, sendo em seguida transferido para um saco de diálise. O conjugado luminóforo-aminofuncionalizado-streptavidina-biotina foi dialisado por 24 h *over night* em tampão PBS a 17 °C sob agitação. Todas as etapas foram monitoradas por espectroscopia no UV-VIS para avaliação da eficiência do método, Fig. 1. Nesta Figura observam-se deslocamentos de bandas predominantemente para o azul devido a transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$ dos reagentes puros em relação ao sistema conjugado final, embora deslocamentos

para o vermelho apareçam também, os quais são devido a transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$.

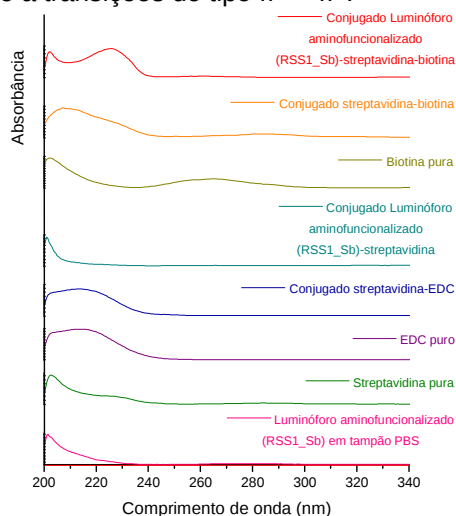


Fig. 1 - Espectros UV-VIS do conjugado luminóforo aminofuncionalizado (RSS1_SB)-streptavidina-biotina, reagentes puros e sistemas conjugados intermediários.

Conclusões

Os deslocamentos para o azul observados são consideráveis, pois há uma grande contribuição dos elétrons não ligantes do oxigênio da carbonila e do nitrogênio presentes nas moléculas biológicas. Deve-se destacar também o reduzido tempo de reação do sistema (~27 h), comparado a protocolos onde outros tipos de *crosslinkers* são empregados. Assim, estes deslocamentos após conjugação indicam que o EDC é adequado ao protocolo desenvolvido e, portanto pode ser aplicado em imunoenaios envolvendo nanomarcadores aminofuncionalizados.

Agradecimentos

Lab. de Carboidratos, FCT-UNESP, FAPESP, CNPq e CAPES.

¹ Pires, A.M.; Heer, S.; Güdel, H.U.; Serra, O.A.; *Journ. of Appl. Phys.* **2005**, 98, 1-7.

² Feng, J. et al. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 5282-5286.

³ Blasse, G.; Grabmaier, B. C; *Lumin. Mater.* **1994**, 231.

⁴ Pires, A. M.; Serra, O. A.; Davolos, M. R. J. *Alloys Compd.* **2004**, 374, 181.

⁵ Ashtari, P.; He, X.; Wang, K.; Gong, *Talanta.* **2005**, 67, 548.