

Determinação de ATP por meio de um ensaio colorimétrico baseado na agregação de nanopartículas de ouro e na interação aptâmero-alvo.

Daniela M. Batistela (PG), Cassius V. Stevani (PQ), Renato S. Freire* (PQ)

rsfreire@iq.usp.br, Instituto de Química da Universidade de São Paulo

Palavras Chave: nanopartículas de ouro (NPAu), aptâmeros, adenosina trifosfato (ATP)

Abstract

Determination of ATP by means of a colorimetric assay based on the aggregation NPAu and aptamer- target interaction.

In this work, anti-aptamer ATP was used to develop a colorimetric method for the determination of ATP based on stabilization of gold nanoparticles provided by strands of DNA.

Introdução

Aptâmeros (fitas simples de DNAs e RNAs) apresentam elevada afinidade e seletividade por seus alvos. Essas biomoléculas são pequenas e versáteis, propriedades que destacam o grande potencial para aplicações (bio) analíticas.

Moléculas de ssDNA (fita simples) são capazes de conferir estabilidade a um colóide de NPAu, devido à interação de grupos contendo nitrogênio. No presente trabalho, foi utilizado um aptâmero específico para ATP com nucleotídeos adicionados à sequência 3 terminal, que é capaz de formar uma hibridização intramolecular com 5 terminal¹. Na ausência do analito uma estrutura rígida é formada, havendo a diminuição da exposição de grupos responsáveis pela estabilidade das NPAu. No entanto, ao ligar-se à ATP ocorre uma alteração estrutural e as sequências terminais ficam disponíveis para estabilizar as NPAu (Figura 1).

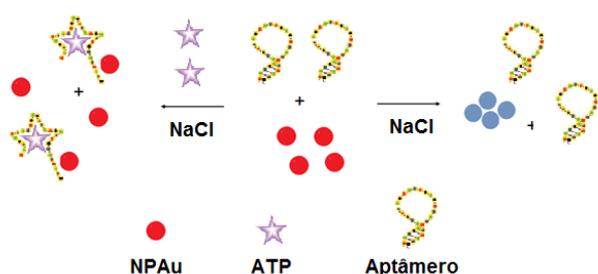


Figura 1. Esquema do ensaio proposto para determinação de ATP, baseado na agregação de NPAu e no uso de aptâmero anti-ATP.

Resultados e Discussão

Para o desenvolvimento do ensaio, foi preparada uma suspensão coloidal estável de NPAu (coloração vermelha; extinção máxima, $E_{\text{máx}}$, em 525 nm), a partir da redução de HAuCl_4 por citrato². Na Figura 2 é apresentada a micrografia das NPAu.

O ensaio consistiu nas seguintes etapas: incubação do aptâmero com diferentes soluções padrões de ATP (10 min; 25 °C), adição do colóide de NPAu (3 min), diluição com água deionizada e adição de uma

solução salina tamponada. Após 2 minutos, foram obtidos os espectros de extinção. No espectro UV-Vis do sistema coloidal contendo NPAu dispersas apenas uma banda é observada ($E_{\text{máx}} \approx 525$ nm). A agregação das NPAu pode ser avaliada por meio do surgimento de uma nova banda localizada em aproximadamente 665 nm.

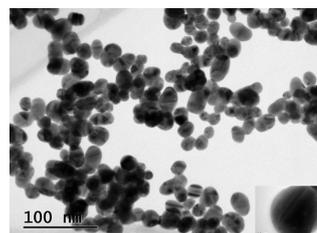


Figura 2. Micrografias das NPAu. Imagens obtidas por MET

A razão (A_{525}/A_{665}) foi utilizada para avaliar a agregação das NPAu. Na presença de ATP, a banda localizada em maiores comprimentos de onda foi atenuada (Figura 3a). Obteve-se uma relação linear quando a concentração de ATP variou de 10 a 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 3b).

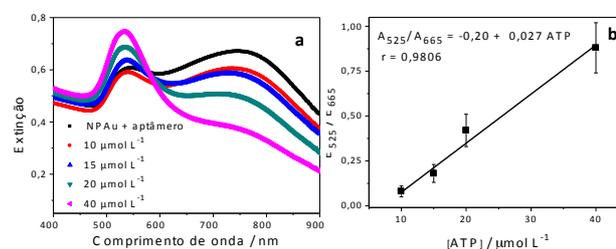


Figura 3. Espectros UV-Vis do sistema coloidal de NPAu contendo aptâmero e diferentes concentrações de ATP (a). Correlação entre A_{525}/A_{665} e a concentração de ATP (b).

Conclusões

Os resultados indicam que por meio do método proposto é possível detectar baixas concentrações de ATP. Em princípio, o método pode ser empregado para detecção de qualquer molécula que possua um aptâmero específico, podendo apresentar elevada versatilidade. Além de apresentar outras características positivas, como seletividade e sensibilidade.

Agradecimentos

CNPQ, IQ-USP e FAPESP

¹ Tan, Y. et al. *Analyst* v. 137, p. 2309-2312, 2012.

² Liu, J. et al. *Scientific Reports* v. 4, p. 1-6, 2014.