

MATERIAL SUPLEMENTAR

Roteiro Experimental

ATIVIDADE PRÁTICA: FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOBASTÕES DE OURO PARA DETECÇÃO DE ALVOS BIOLÓGICOS

Objetivos:

1. Modificar quimicamente a superfície de nanobastões de ouro com o reagente polietilenoimina (PEI), explorando conceitos de química tais como teorias de ligação metálica, estrutura atômica, reações de oxidação-redução e espectroscopia.
2. Acoplar imunoglobulinas IgG aos nanobastões modificados para a construção de biosensores, analisando conceitos bioquímicos como interações antígeno-anticorpos e conformação de moléculas.
3. Comprovar experimentalmente a interação biosensor-alvo através da observação do deslocamento da banda de absorção plasmônica e análise do potencial zeta.

1. Fundamentação teórica:

As nanopartículas de ouro (AuNPs) representam uma classe de nanomateriais de grande potencial tecnológico, possuindo propriedades ópticas, magnéticas e estruturais interessantes para aplicações químicas e biológicas: processos catalíticos, terapia fototérmica, direcionamento de drogas, biosensores, entre outras.

A característica mais peculiar das AuNPs é a ressonância plasmônica de superfície (SPR - do inglês *surface plasmon resonance*), que se caracteriza pela oscilação coletiva dos elétrons de condução das partículas metálicas desencadeada pela exposição à luz, e que pode ser detectada por espectroscopia. Nanoesferas de ouro possuem uma banda de SPR na região do espectro visível, em torno de 520nm, enquanto os nanobastões exibem duas bandas, já que a oscilação coletiva dos elétrons pode ocorrer em dois sentidos, dependendo da polarização da luz incidente. Assim, existe uma banda de absorção no comprimento de onda semelhante ao das nanoesferas (denominada banda transversal) e uma banda longitudinal (>600nm) como resultado da

absorção induzida pelo eixo longo dos nanobastões, a qual varia de acordo com sua relação de aspecto (comprimento/largura).

As AuNPs podem ser sintetizadas em diversos tamanhos e formatos, tais como nanoesferas, nanobastões, nanogaiolas, nanoestrelas e nanoconchas. Para aplicações de biosensoriamento os nanobastões de ouro são particularmente interessantes devido às duas bandas de absorção plasmônica: a banda longitudinal sofre deslocamento a cada ligação efetiva que ocorre na superfície dos nanobastões. Dessa forma, essa propriedade pode ser explorada para detecção de alvos à partir de moléculas/biomoléculas acopladas aos nanobastões.

Os nanobastões de ouro são frequentemente sintetizados pelo método mediado por sementes, no qual os nanobastões são preparados à partir da adição de nanoesferas recobertas por citrato (sementes), à uma solução contendo HAuCl_2 em elevadas concentrações, resultante da redução de HAuCl_4 por ácido ascórbico na presença do surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e íons de prata.

Para que as nanopartículas de ouro apresentem aplicabilidade após a síntese, o CTAB deve ser removido ou substituído antes das etapas de funcionalização química com ligantes e/ou moléculas de interesse, tais como polietileno glicol (PEG), oligonucleotídeos, peptídeos, polímeros ou sílica inorgânica. Moléculas bi-funcionais são amplamente empregadas para esse fim, e geralmente possuem grupos de ácido carboxílico que atuam como ligantes químicos para bioconjugação através de acoplamento mediado por carbodiimida via amina primária.

Todos os eventos de funcionalização podem ser facilmente monitorados através da ressonância plasmônica de superfície, já que a ligação de biomoléculas na superfície das nanopartículas altera o ambiente circundante e afeta a densidade de cargas dos elétrons ali presentes, o que acarreta em deslocamento da banda de absorção longitudinal. Essa característica favorece o uso de nanobastões de ouro como sensores para diversas moléculas-alvo, sendo de grande interesse na atualidade sua aplicação para biosensoriamento, também conhecido por nanoSPR. Os sensores são obtidos pela ligação de biomoléculas (como anticorpos) à superfície dos nanobastões, processo conhecido como funcionalização. A posterior interação da biomolécula com o alvo conclui a detecção, resultando em um deslocamento observável da banda longitudinal. Desse modo, esses sensores podem ser empregados em ensaios de detecção de variados marcadores biológicos para inúmeras condições fisiopatológicas, com fácil análise do

resultado final, por meio da verificação do deslocamento da banda de absorção plasmônica longitudinal em espectrofotômetro.

2. Materiais e reagentes:

2.1. Síntese de nanobastões de ouro

- Erlenmeyer de 1000 mL
- Agitador magnético
- Microcentrífuga
- Micropipetas (volumes de 100 μ L e 1000 μ L)
- Luvas e jaleco
- H_{Au}Cl₄
- CTAB
- Solução resfriada de NaBH₄
- AgNO₃
- Ácido ascórbico
- Água ultrapura deionizada

2.2. Funcionalização de nanobastões de ouro

- Microtubos de 1,5 mL
- Suporte (estante) para microtubos
- Micropipetas (volumes de 100 μ L e 1000 μ L)
- Microcentrífuga
- Banho ultrassônico
- Espectrofotômetro e/ou Zetasizer
- Luvas e jaleco
- Solução de nanobastões de ouro
- Polietilenoimina 50% m/v em água
- Par anticorpo-antígeno (ex.: kit para ELISA com IL-6 humana BD OptEIA™)
- Tampão fosfato salino (PBS 1x)
- Cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida P.A. (EDAC)
- N-hidroxisuccinimida 98% (NHS)
- Albumina sérica bovina com pureza mínima de 98%

3. Atividades discentes:

- Realização de pesquisa bibliográfica para familiarização com o tema
- Execução dos experimentos no laboratório
- Discussão dos resultados
- Elaboração de relatórios

4. Procedimento experimental:

4.1. Síntese de nanobastões de ouro

4.2. Funcionalização dos nanobastões de ouro

As nanopartículas de ouro serão sintetizadas pelo método mediado por semente.^{11,34} O método consiste na produção de sementes e em seu posterior crescimento direcionado em forma de bastões.

▪ Preparo das sementes:

1. Misture 2,25 mL de HAuCl_4 (5 mmol L^{-1}), 1,25 mL de CTAB ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) e 0,9 mL de solução resfriada de NaBH_4 (1 mmol L^{-1}) em erlenmeyer de 1000 mL sob agitação contínua em agitador magnético.
2. Deixe sob agitação até que a solução resultante tenha uma coloração marrom-amarelada. A reação pode durar de 2 a 15 minutos.

▪ Preparo da solução de crescimento:

1. Para obter a solução de crescimento, misture 5 mL de solução HAuCl_4 (1 mmol L^{-1}) com 5 mL de CTAB ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) e AgNO_3 (4 mmol L^{-1}).
2. Adicione 0,07 mL de ácido ascórbico ($0,0788 \text{ mol L}^{-1}$) durante agitação vagarosa. Nessa etapa o ácido ascórbico age como agente redutor e altera a cor da solução de amarelo intenso para transparente.

3. Por fim, adicione 0,012 mL da solução semente à essa solução de crescimento recém-preparada para iniciar o crescimento dos nanobastões. A cor da solução deverá se alterar gradualmente entre os primeiros 15-20 min, até se estabilizar em tom arroxeadado.
4. Purifique os nanobastões retirando o excesso de CTAB por centrifugação:
 - 4.A. Centrifugue a 5.600 g por 15 min, descartando o sobrenadante e ressuspensando o pellet formado em água ultrapura deionizada.
 - 4.B. Centrifugue novamente a 5.600 g por 15 min, descartando o sobrenadante e ressuspensando o pellet formado em água ultrapura deionizada.
5. Armazene a solução de nanobastões de ouro a 4 °C até o momento do uso.

4.2. Funcionalização de nanobastões de ouro

Para permitir o acoplamento dos anticorpos é necessário modificar quimicamente a superfície dos nanobastões de ouro. Para essa finalidade o reagente escolhido foi a polietilenoimina (PEI). Esse reagente é capaz de mediar a ligação covalente nanobastão-anticorpo devido aos vários grupos amina reativos.³⁵

- Funcionalização dos nanobastões de ouro com PEI
 1. Separe 250 µL da solução de nanobastões de ouro em microtubo e centrifugue-a a 4000 g por 10 min. Obs.: Caso o sobrenadante ainda possua coloração arroxeadada, aumente o tempo da etapa de centrifugação.
 2. Descarte o sobrenadante e ressuspensa o pellet em 250 µL de PEI (0,3% em água ultra pura).
 3. Incube o tubo a temperatura ambiente em banho ultrassônico por 30 min, para desestabilização do CTAB presente na superfície das nanopartículas e acoplamento do PEI.
- Preparo da solução contendo anticorpos
 1. Adicione 18,7 µL EDAC/NHS (0,4 mol L⁻¹ / 0,1 mol L⁻¹), 0,4 µg mL⁻¹ dos anticorpos anti-IL-6 e tampão fosfato salino (PBS 1X, pH 7,4, NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ em água ultra pura) para um volume final de 250 µL
 2. Em seguida incube por 30 min a 4 °C.

- Funcionalização dos nanobastões de ouro com anticorpos
 1. Transcorridos os 30 min de incubação com o reagente PEI, centrifugue novamente a solução contendo nanobastões e PEI a 4000 g por 10 min e ressuspenda o pellet em 250 μL de anticorpos anti-IL-6 ($0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$) previamente preparados como descrito acima.
 2. A reação de acoplamento dos nanobastões funcionalizados ao PEI com os anticorpos deve ser realizada por 60 min à temperatura ambiente em banho ultrassônico.
 3. Ao final deste tempo centrifugue novamente a 4000 g por 10 min e ressuspenda o pellet em 100 μL de uma solução de BSA em PBS ($62 \mu\text{g mL}^{-1}$ de BSA), para realizar o bloqueio de possíveis regiões livres remanescentes na superfície dos nanobastões de ouro.
 4. Incube por 30 min à temperatura ambiente em banho ultrassônico.
 5. Transcorridos os 30 min centrifugue a solução a 4000 g por 10 min e ressuspenda o pellet em 100 μL de uma solução do antígeno específico IL-6 em PBS (contendo 100pg mL^{-1} do antígeno).

Obs.: O tempo e velocidade de rotação da microcentrífuga deverão ser adaptados caso o sobrenadante não fique transparente, ou caso o sedimento de nanobastões formado aglutine no fundo do microtubo. As etapas de centrifugação são cruciais para o correto funcionamento da prática.

6. Após cada adição (do reagente PEI, do anticorpo e finalmente após interação com o antígeno) as soluções devem ser submetidas à varredura por espectroscopia na região UV-Vis-NIR (400 a 1100 nm) para verificação do deslocamento da banda de absorção plasmônica longitudinal. Esse deslocamento comprovará cada interação.

4.3. Instrumentação

Os espectros de absorção plasmônica das soluções coloidais deverão ser obtidos em um espectrofotômetro que realize varreduras espectrais no intervalo de 400 a 1100 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

Obs.: As amostras poderão também ser analisadas por leitura de potencial zeta, com o qual é possível aferir estabilidade e comprovar a ligação de moléculas nas nanopartículas, através da modificação da sua carga superficial quando dessa interação.

Para estas leituras, 10 μL de amostra ressuspenida em PBS deverão ser diluídos em 1,5 mL de água ultra pura e então, aplicados em cubetas específicas e submetidos ao Zetasizer. Além disso, os dados resultantes da leitura em espectrofotômetro UV-Vis-NIR podem ser normalizados utilizando *software* similares ao PeakFit V.4 e os gráficos gerados em programas similares ao GraphPad Prism[®] e/ou Origin.

Após aferimento do potencial zeta e/ou varredura espectral, anote os valores encontrados e calcule os deslocamentos obtidos, avaliando se ocorreu ligação específica da molécula alvo.

Tabela 1S. Deslocamentos da banda de absorção plasmônica longitudinal obtidos após interação de reagentes e ligantes à superfície dos nanobastões de ouro e medidas da intensidade do potencial zeta.

	Pico máximo da banda de absorção plasmônica longitudinal (nm)	Deslocamento (nm)	Intensidade em mV (Potencial Zeta)
Solução de nanobastões de ouro		X	
Nanobastões conjugados ao PEI			
Nanobastões conjugados ao PEI e ao Anticorpo			
Nanobastões conjugados ao PEI, Anticorpo e BSA			
Após interação com o alvo			

3. Perguntas conceituais para elaboração do relatório:

- 1) Quais são os efeitos físico-químicos responsáveis respectivamente pela origem e variedade de cores das nanopartículas de ouro em função do seu tamanho?
- 2) Considerando a estrutura de um anticorpo (Figura 1S-A) e sua interação com um antígeno explique o motivo da escolha do reagente polietilenoimina (PEI – Figura 1S-B). Você sugere algum outro reagente para realizar o acoplamento do anticorpo? Justifique sua escolha.

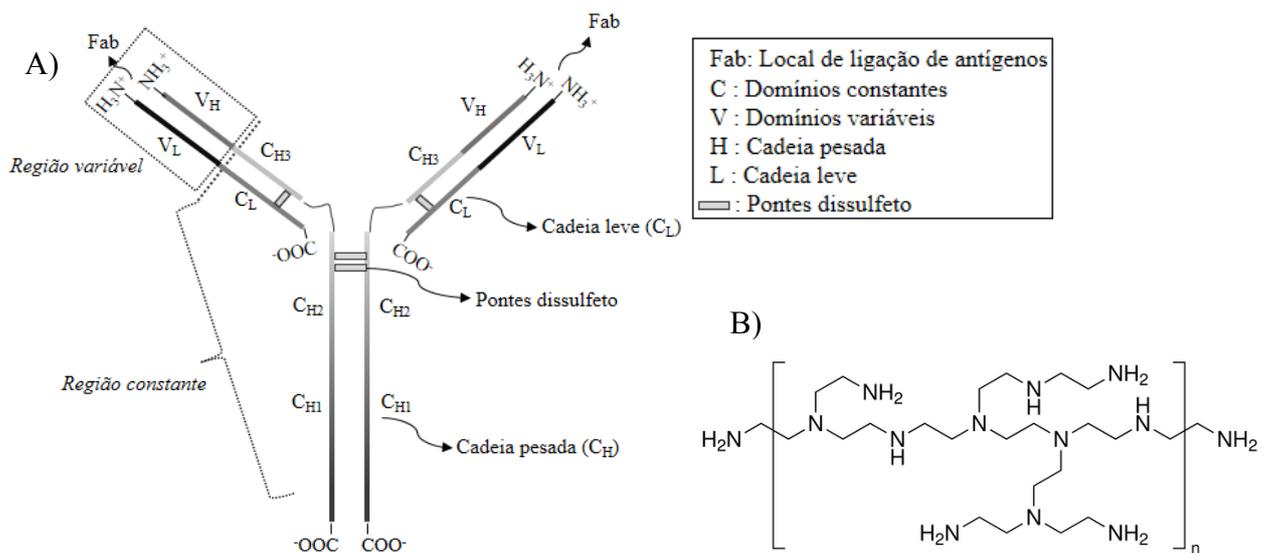


Figura 1S. A: Estrutura tridimensional básica de um anticorpo. Cada cadeia pesada (H) e leve (L) possui uma região variável (V) e uma região constante (C). As duas cadeias pesadas são unidas entre si e entre uma cadeia leve por pontes dissulfeto. A porção C-terminal contendo grupos carboxila está localizada na região constante das cadeias pesadas e a porção N-terminal contendo grupos amina situa-se na região variável que engloba ambas as cadeias leves e pesadas. **B:** Estrutura química da polietilenoimina (PEI)

- 3) Como o CTAB mantém a síntese controlada em forma de bastões?
- 4) Quais os principais tipos de reações envolvidas no acoplamento mediado por carbodiimida via amina primária?

REFERÊNCIAS

- Daniel, M.-C.; Astruc, D.; *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293.
 Huang, X.; Neretina, S.; El-Sayed, M. A.; *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 4880.
 Huang, X.; El-Sayed, M. A.; *J. Adv. Res.* **2010**, *1*, 13.

Hulteen, J. C.; Treichel, D. A.; Smith, M. T.; Duval, M. L.; Jensen, T. R.; Van Duyne, R. P. J.; *Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 3854.

Hwang, S.-Y.; Tao, A. R.; *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 233.

Jensen, T. R.; Malinsky, M. D.; Haynes, C. L.; VanDuyne, R. P. J.; *Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 10549.

Nikoobakht, B.; El-sayed, M. A.; *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 1957.

Pissuwan, D.; Valenzuela, S.; Cortie, M. B.; *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **2008**, *25*, 93.

Tiwari, P.; Vig, K.; Dennis, V.; Singh, S.; *Nanomaterials* **2011**, *1*, 31.

Vigderman, L.; Khanal, B. P.; Zubarev, E. R.; *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 4811.

Wilson, R.; *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 2028.

Yang, D.-P.; Cui, D.-X.; *Chem. Asian J.* **2008**, *3*, 2010.