UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

RAQUEL MARIANO DE ALMEIDA

Estudo espectroscópico de anticorpos empregando-se superfícies SERS-ativas visando o desenvolvimento de imunossensores

Versão corrigida da Tese

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

26/02/2016

RAQUEL MARIANO DE ALMEIDA

Estudo espectroscópico de anticorpos empregando-se superfícies SERS-ativas visando o desenvolvimento de imunossensores

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutora em Química

Orientador: Prof. Dr. Renato Sanches Freire

Co-orientador: Prof. Dr. Cassius Vinicius Stevani

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Almeida, Raquel Mariano de
A447e Estudo espectroscópico de anticorpos empregando-se superfícies SERS-ativas visando o desenvolvimento de imunossensores / Raquel Mariano de Almeida. -- São Paulo, 2016.
162p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Freire, Renato Sanches
Co-orientador: Stevani, Cassius Vinicius

1. SERS 2. Nanopartículas 3 Anticorpos I. T. II. Freire, Renato Sanches, orientador. III. Stevani, Cassius Vinicius, co-orientador.

543.08584 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

"Estudo espectroscópico de anticarpos empregando-se superfícies SERS-ativas visando o desenvilvimento de imunossensores"

RAQUEL MARIANO DE ALMEIDA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências no Programa de Química.

Aprovado(a) por:

_____
Prof. Dr. Renato Sanches Freire
(Orientador e Presidente)

_____
Prof. Dr. Jorge Cesar Masini
IQ - USP

_____
Profa. Dra. Paola Corio
IQ - USP

_____
Prof. Dr. Giancarlo Esposito de Souza Brito
IF-USP

_____
Prof. Dr. Jean Claudio Santos Costa
UFPI

SÃO PAULO
15 de abril de 2016

A Deus que traçou o meu caminho,

aos meus pais que me ensinaram este caminho,

e ao Paulo Andres que está comigo nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus porque, embora a caminhada nesta vida não seja tão fácil, Ele esteve comigo em todos os momentos: bons, medianos e ruins. Sempre me indicou a melhor direção e/ou pessoas que pudessem tornar o meu fardo mais leve e suave. Em sua grande sabedoria, escreveu certo e por linhas certas, mas na minha ignorância humana, li o texto errado e, por vezes, pensei que Ele não estava comigo. Mas, sendo Ele onisciente, onipresente e onipotente estava, está e sempre estará comigo.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Renato S. Freire que além da orientação na vida Acadêmica, sempre me ouviu e deu-me conselhos diversos... Presenciou dias de alegria e tristeza. Também, acompanhou os desafios que me conduziram à vida profissional na qual estou inserida, dando-me total apoio nessa etapa. Quando necessário podou-me, mas também permitiu que eu “voasse” no tempo oportuno.

Aos meus colegas e amigos do Grupo de Pesquisa em Química Verde e Ambiental (GPQVA), com destaque àqueles que também foram orientados pelo Prof. Dr. Renato, a saber: Andressa, Daniela, Mariana, Larissa, Thiago, Carolina, Luciana e Aline. Pois, passamos muitos momentos juntos em seminários de grupo, discussões sobre ciência e outros assuntos, nos mais diversos lugares: laboratório, sala de informática, copa, “bandejão” e até em lugares mais descontraídos como nas festas de encerramento do ano e de defesas/qualificações.

Ao Prof. Dr. Cassius V. Stevani pela co-orientação e espaço cedido no Laboratório de Bioluminescência de Fungos (LBF), mas também porque proporcionou contato com pesquisadores na área de bioquímica e correlatas.

Ao Dr. Jean C. S. Costa (ex-aluno) e Evandro do Laboratório de Espectroscopia Molecular (LEM) pelas análises, tempo e, principalmente, paciência dispensados comigo. Também, à Profa. Dra. Paola Corio por acreditar neste trabalho de pesquisa desde o seu início.

Aos técnicos Geórgia, Beatriz (foi praticamente uma mãe), Max (IB-USP), Alceu e Alfredo porque estiveram sempre presentes e prontos para ajudar. À sra. Tereza (auxiliar de serviços gerais) que, enquanto trabalhou em nosso laboratório, sempre teve grande zelo por nosso espaço de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Giancarlo E. S. Brito (IF-USP) que me apresentou a técnica *dipping coated* e colocou a “mão na massa” para me ensinar. Também, ao Prof. Dr. Lúcio Angnes que fez o mesmo, mas mostrando-me o potencial da eletroquímica em “CDtrodos”.

Ao Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader do Laboratório de Quimiluminescência Orgânica por ceder a sala do fluorímetro. Também, ao Prof. Roberto M. Torresi do Laboratório de Materiais Eletroativos por indicar o aluno Dr. Vitor L. Martins (ex-aluno) para me ajudar com alguns experimentos e a este por ter aceitado a indicação.

À Dra. Chrislaine O. Soares por me emprestar os materiais necessários e ensinar a montagem de géis para eletroforese. Também, à técnica Dra. Edlaine Linares do Laboratório de Bioquímica de Oxidantes e Radicais e EPR por compartilhar seu conhecimento sobre fluorímetro de placa.

À Dra. Emanuelle B. Gaspar (Embrapa), Prof. Dr. Nilton Lincopan (ICB-USP) e Prof. Dr. Ernani Pinto (FCF-USP) pelas orientações sobre imobilização de biomoléculas sobre superfícies. E, também, à aluna Grasielle do Laboratório de Micologia (FCF-USP) pelo ensinamento desta técnica na prática.

Aos professores de disciplina de monitoria: Prof. Dr. Lúcio Angnes (já foi citado, mas merece mais um agradecimento), Prof. Dr. Jivaldo R. Matos, Prof. Dr. Thiago R. L. C. Paixão, Profa. Dra. Cassiana S. Nomura e Prof. Dr. João P. S. Farah. Foi um enorme prazer ensinar os alunos da graduação sob suas supervisões. Agradeço pela oportunidade e confiança, pois aprimorei meus conhecimentos e didática com excelentes docentes.

Aos amigos de monitorias: Aline, Renata, Luís e Lígia. Aos técnicos de monitoria: Simone, Armando, Natanael e Daniel.

Às técnicas do Centro Avançado de Tecnologias em Genômica (CATG), Cláudia e Dra. Layla F. Martins pelo ensino, parceria e conversas.

Aos funcionários do IQ-USP de diversos setores administrativos que me atenderam e orientaram-me em muitos trâmites burocráticos. Ao sr. Paulo e Brivaldo (este me conhece desde pequena...) porque sei que sempre torceram pela minha caminhada.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Química Analítica Instrumental (meninos do Bloco 12) que sempre me trataram com muito carinho.

Ao Rodrigo Heyder e Tatiana que foram mais do que colegas de grupo, foram amigos que me proporcionaram momentos de descontração.

Ao tio Marcos Silva que em 2006 disse as palavras certas para que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais que sempre me incentivaram a estudar. Pois, hoje sou uma pessoa independente e com grandes sonhos para o futuro por causa de vocês.

À minha família e amigos porque entenderam que pesquisa é, sim, uma forma de trabalho!

Ao Paulo Andres que além de ser meu melhor amigo, é o meu amor. Saiba que a tua presença e compreensão foram fundamentais (P.S. Eu te amo).

À FAPESP e CAPES pelas bolsas concedidas.

À FAPESP, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

A vida está cheia de desafios que, se aproveitados de forma criativa, transformam-se em oportunidades.

Maxwell Maltz

RESUMO

Almeida, R. M. **Estudo espectroscópico de anticorpos empregando-se superfícies SERS-ativas visando o desenvolvimento de imunossensores**. 2016. 158 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Este estudo empregou anticorpos que podem ser peças chaves no eventual desenvolvimento de imunossensores, devido as suas características de seletividade e consequente determinação de espécies de interesse em análises clínicas, ambiental, saúde publica, entre outros. Para isto, foram feitos estudos de espectros Raman e SERS de anticorpos inteiros e/ou fragmentados (IgG humana, anti-IgG humana (H+L) e anti-IgG humana (Fab_2)). Com isto, foram conhecidos os principais modos vibracionais destas biomoléculas que são úteis para a proposta de se construir imunossensores. Ambas as técnicas fornecem informações a respeito da estrutura secundária de proteínas. Quando há a imobilização dessas biomoléculas sobre superfícies SERS-ativas, é possível determinar a sua orientação. Considerando-se que na técnica SERS existe a possibilidade de se detectar uma molécula, por meio de *hot spots*, é importante que as imunoglobulinas estejam sem impurezas como, por exemplo, a albumina e transferrina no caso de anticorpos provenientes do soro humano. Assim, foram feitos experimentos de purificação dos anticorpos por meio de colunas de afinidade contendo proteína A, G ou uma mistura de A e G imobilizadas e, também, separação baseada no ponto isoelétrico. Testou-se a capacidade de ligação (quimissorção) de IgG humana ou de seus fragmentos F(ab)' sobre superfícies de ouro por meio da técnica QCM-D. Para o estudo de superfícies SERS-ativas foram sintetizadas nanopartículas de ouro (NP-Au), com a aquisição de espectros de extinção no UV-Vis e obtenção de imagens MEV para caracterizá-las. Também, foram feitas variações no preparo de nanocubos de ouro (NC-Au) para obtenção de nanobastões de ouro (NB-Au), tendo-se em vista que estruturas com pontas favorecem a intensificação do sinal Raman em superfícies SERS-ativas. Por fim, considerando-se a existência de diversas ligações S–S, principalmente na região denominada dobradiça, no espectro SERS de IgGh diluída e do fragmento F(ab)' constatou-se o surgimento de uma banda característica de C–S em 679 cm^{-1}. Por isso, foi feita uma proposta da possível orientação desses anticorpos não fragmentados para que assumissem uma orientação sobre as superfícies SERS-ativas com características semelhantes às dos fragmentos F(ab)'.

Palavras-chave: espectroscopia Raman, SERS, nanopartículas de ouro (NP-Au), anticorpos, fragmentos F(ab)'.

ABSTRACT

Almeida, R. M. **Spectroscopic Study of antibodies employing SERS-active surfaces for the development of immunosensors**. 2016. 158 p. PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

This study used antibodies that can be key elements in the possible development of immunosensors, due to its selectivity and the consequent determination of species of interest in clinical analysis, environmental, public health, among others. For this, Raman and SERS spectra studies were made of whole and/or fragmented antibodies (human IgG, anti-human IgG (H + L) and anti-human IgG (Fab_2)). With this, it were known the main vibrational modes of these biomolecules, useful for the proposal to assemble immunosensors. Both techniques provide information on the secondary structure of proteins. When these biomolecules are immobilized on SERS-active surfaces, it is possible to determine their orientation. Considering that, in the SERS technique, it is possible to detect a molecule through hot spots, it is important that the immunoglobulins are free of impurities, such as albumin and transferrin in the case of antibodies from human serum. Thus, purification experiments of antibodies were made via affinity columns containing protein A, G or a mixture of A and G immobilized and also separation based on isoelectric point. It was tested the binding capacity (chemisorption) of human IgG or its F(ab)' on gold surfaces by means of QCM-D technique. For the study of SERS-active surfaces of gold nanoparticles were synthesized (Au-NP), with the acquisition of extinction spectra in the UV-Vis and obtaining SEM images to characterize them. Also, changes were made in the preparation of nanocubes gold (Au-NC) to obtain gold nanorods (Au-NR), having in view that ends with structures favor the enhancement of Raman signal on SERS-active surfaces. Finally, considering the existence of various S-S links, particularly in the region called hinge, in the SERS spectrum of diluted hIgG and F(ab)', it was found the display of a characteristic band C-S 679 cm-1. Therefore, a proposal was made about the possible direction of these non-fragmented antibodies to assume an orientation on the SERS-active surfaces with similar characteristics to the F(ab)'.

Keywords: Raman spectroscopy, SERS, gold nanoparticles (Au-NP), F(ab)' fragments.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	Letra grega que representa um tipo de cadeia pesada ou polarizabilidade de uma molécula
α_{ij}	Tensor de polarizabilidade do momento de transição mn
Ab-Ag	Interação anticorpo-antígeno
Anti-IgGh (Fab_2)	Anticorpo anti-IgG humana com reconhecimento específico pela porção H+L da imunoglobulina
Anti-IgGh (H+L)	Anticorpo anti-IgG humana com reconhecimento específico pela porção H+L da imunoglobulina
Arg	Aminoácido arginina
Asn	Aminoácido asparagina
Asp	Ácido aspártico ou aspartato
BB	*Binding Buffer* (Tampão de ligação)
BSA	*Bovine serum albumin* (Albumina de soro bovino)
C	Sequência de aminoácidos constantes em uma cadeia polipeptídica, isto é, invariável
C_H	Região com sequência de aminoácidos constante, de alta massa molecular
C_L	Região com sequência de aminoácidos constante, de baixa massa molecular
CTAB	*Cetyltrimethylammonium bromide* (Brometo de hexadeciltrimetilamônio)
Cys	Aminoácido cisteína
δ	Letra grega que representa um tipo de cadeia pesada ou deformação
DNA	*Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
ε	Letra grega que representa um tipo de cadeia pesada
E	Campo elétrico
EB	*Elution Buffer* (Tampão de eluição)

EDTA	*Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay* (Imunoensaio enzimático)
F ou f	Forte e fraca, respectivamente (referente à intensidade de uma banda)
F(ab)'	Fragmento que contém o paratopo, sendo obtido por meio da clivagem do anticorpo pela protease papaína (duas unidades por anticorpo)
$F(ab)_2$'	Fragmento que contém o paratopo, sendo obtido por meio da clivagem do anticorpo pela protease pepsina (uma unidade por anticorpo)
Fc	Fragmento cristalizável, sendo obtido por meio da clivagem do anticorpo pela protease papaína
γ	Letra grega que representa um tipo de cadeia pesada
GC	Grupo controle
Gln	Aminoácido glutamina
Glu	Ácido glutâmico ou glutamato
Gly-HCl	Aminoácido glicina com HCl
G01	Grupo submetido à ação de papaína 0,1 mg mL^{-1}
G002	Grupo submetido à ação de papaína 0,02 mg mL^{-1}
H	Cadeia pesada
His	Aminoácido histidina
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgGh	Imunoglobulina G humana
IgG_1	Subclasse de imunoglobulina G do tipo 1

IgG_2	Subclasse de imunoglobulina G do tipo 2
IgG_3	Subclasse de imunoglobulina G do tipo 3
IgG_4	Subclasse de imunoglobulina G do tipo 4
IgM	Imunoglobulina M
I_{mn}	Intensidade de um modo vibracional referente à transição mn
IPG	*Immobilized pH Gradient* (Gradiente de pH)
IQ-USP	Instituto de Química da Universidade de São Paulo
I_0	Intensidade da radiação incidente
κ	Letra grega que representa um tipo cadeia leve
K_0	Constante de associação/afinidade
λ	Letra grega que representa um tipo cadeia leve
L	Cadeia leve
LEI	Detector de elétron secundário do tipo "*lower detector*"
Leu	Aminoácido leucina
Lys	Aminoácido lisina
μ	Letra grega que representa um tipo de cadeia pesada
m	Média (referente à intensidade de uma banda)
MALDI-TOF-TOF	*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight-Time-Of-Flight* (Técnica de ionização branda utilizada em espectrometria de massa para biomoléculas ou moléculas orgânicas grandes)
Met	Aminoácido metionina
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF ou mf	Muito forte e muito fraca, respectivamente (referente à intensidade de uma banda)
MW	*Molecular weight* (massa molecular)
MWCO	*Molecular weight cut-off* (massa molecular de corte)

ν	Frequência da radiação espalhada ou estiramento
NB-Au	Nanobastões de ouro
NC-Au	Nanocubos de ouro
NP-Au	Nanopartículas de ouro
OG12PR01	Método para separação de proteínas correspondente a 12 poços
OG24PR01	Método para separação de proteínas correspondente a 24 poços
p ou P	Momento de dipolo induzido
PBS	*Phosphate Buffered Saline* (Tampão fosfato salino)
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Aminoácido fenilalanina
pI	Ponto isoelétrico
QCM	*Quartz Crystal Microbalance* (Microbalança de cristal de quartzo)
QCM-D	*Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring* (Microbalança de cristal de quartzo com dissipação de energia)
SD	*Standard deviation* (Desvio padrão)
SDS-PAGE	*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio)
SEI	Detector de elétron secundário do tipo "*upper detector*"
SERS	*Surface-Enhanced Raman Spectroscopy* (Espectroscopia Raman intensificada pela superfície)
SpA	Proteína A de Estafilococos (SpA)
SPR	*Surface Plasmon Resonance* (ressonância de plasma de superfície)
TEMED	Catalisador N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamino
Tris-HCl	Base Tris(hidroxilamina)aminometano com ácido HCl

Trp	Aminoácido triptofano
Tyr	Aminoácido tirosina
UV-Vis	Região do espectro eletromagnético compreendida na faixa do ultravioleta ao visível
V	Sequência de aminoácidos que variam em uma cadeia polipeptídica
Val	Aminoácido valina
V_H	Região com sequência de aminoácidos que variam, de alta massa molecular
V_L	Região com sequência de aminoácidos que variam, de baixa massa molecular
vs	*Versus*
Y	Letra utilizada para ilustrar o formato de um anticorpo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Componentes de um biossensor. a) interação do analito com o elemento biológico para reconhecimento: imobilização do anticorpo específico por seu respectivo antígeno (roxo). Outros elementos biológicos para reconhecimento incluem enzimas, lectinas, receptores e células microbianas. b) Transdução do sinal: converte a interação da molécula e analito em um sinal quantificável. c) Leitura ou display: apresenta o sinal específico gerado pela interação com o analito de interesse. Amarelo: analito não específico.....25

Figura 2 – Representação esquemática das diferentes regiões de um anticorpo....29

Figura 3 – Ilustração das estruturas das imunoglobulinas (A, D, E, G e M).....30

Figura 4 – Esquema ilustrando a constituição de cada subclasse de IgGh.....33

Figura 5 – Esquema contendo três maneiras de fragmentar IgG.....36

Figura 6 – Estrutura bilobada da enzima papaína com ilustração dos domínios L (C-terminal) e R (N-terminal), bem como do sítio catalítico na reentrância dos domínios.....37

Figura 7 – Mecanismo de catálise utilizado por cisteíno protease.....38

Figura 8 – Mecanismo de inativação de uma cisteíno protease.....39

Figura 9 – Representação de uma nanopartícula exposta um campo elétrico (a), tem seus elétrons deslocados conforme tracejado (b-c). A polarização das cargas na superfície aplica uma força restauradora nos elétrons.....41

Figura 10 – Ilustração de métodos de preparação de nanopartículas metálicas.....42

Figura 11 – Ilustração de etapas de reações que resultam em NP metálicas com diferentes formas. Após a formação de núcleos (pequenos *clusters*), os *seeds* tornam-se cristais únicos, geminados ou múltiplos geminados. Falhas no empilhamento geram placas. As colorações verde, amarelo e roxo representam as faces (100), (111) e (110), respectivamente. O parâmetro R é definido como a razão entre a taxa de crescimento ao longo das direções (100) e (111). Os planos são delineados com linhas rosas.....43

Figura 12 – Ilustração da excitação plasmônica superficial local de nanopartícula esférica pela radiação eletromagnética incidente.....46

Figura 13 – Contornos externos da intensificação do campo elétrico (E) para monômeros com diferentes formas. (a) e (b) estão os contornos externos da intensificação do campo elétrico para prisma triangular polarizado ao longo de dois eixos de simetria primário, (c) e (d) estão os contornos externos da intensificação do

campo elétrico para um bastão e esferoidal polarizado ao longo de seus eixos longitudinais. As setas mostram onde estão os campos elétricos máximos.....47

Figura 14 – Esqueleto de um peptídeo de proteína apresentando os ângulos diedros phi (φ) e psi (ψ).....50

Figura 15– Esquema do preparo do chip para análise. a) adição de gel corante; b) pressão exercida para entrada da solução nos canais do chip; c) adição de gel corante; d) adição de solução descorante; e) adição das amostras; f) adição de solução de padrão de massa molecular.....67

Figura 16 – Intensidade em função de m/z para a amostra contendo IgGh. Inserção corresponde à SDS-PAGE.....78

Figura 17 – Intensidade em função de m/z para a amostra contendo anti-IgGh (H+L). Inserção corresponde à SDS-PAGE.....79

Figura 18 – Intensidade em função de m/z para a amostra contendo anti-IgGh Fab_2. Inserção corresponde à SDS-PAGE.....79

Figura 19 – SDS-PAGE de proteínas presentes em tampão de ligação (BB) e tampão de eluição (EB) eluídas de uma coluna contendo proteína A imobilizada para purificação de IgGh.....83

Figura 20 – SDS-PAGE de proteínas presentes em tampão de ligação (BB) e tampão de eluição (EB) eluídas de uma coluna contendo proteína G imobilizada para purificação de IgGh.....83

Figura 21 – SDS-PAGE de proteínas presentes em tampão de ligação (BB) e tampão de eluição (EB) eluídas de uma coluna contendo uma mistura de proteína A e G imobilizada para purificação de IgGh.....83

Figura 22 – SDS-PAGE de proteínas presentes em tampão de ligação (BB) e tampão de eluição (EB) eluídas de uma coluna contendo proteína A imobilizada para purificação de anti-IgGh (H+L).....85

Figura 23 – SDS-PAGE de proteínas presentes em tampão de ligação (BB) e tampão de eluição (EB) eluídas de uma coluna contendo proteína G imobilizada para purificação de anti-IgGh (H+L).....85

Figura 24 – SDS-PAGE de proteínas presentes em tampão de ligação (BB) e tampão de eluição (EB) eluídas de uma coluna contendo uma mistura de proteína A e G imobilizada para purificação de anti-IgGh (H+L).....86

Figura 25 – SDS-PAGE de proteínas presentes em tampão de ligação (BB) eluídas de uma coluna contendo proteína G imobilizada para purificação de anti-IgGh (H+L), após avaliação da eficiência das diferentes colunas disponíveis (proteína A, G ou uma mistura de A e G imobilizadas).....87

Figura 26 – SDS-PAGE de proteínas presentes em tampão de eluição (EB) eluídas de uma coluna contendo proteína G imobilizada para purificação de anti-IgGh (H+L), após avaliação da eficiência das diferentes colunas disponíveis (proteína A, G ou uma mistura de A e G imobilizadas).....87

Figura 27 – SDS-PAGE de proteínas presentes em tampão de ligação (BB) e tampão de eluição (EB) eluídas de uma coluna contendo proteína A imobilizada para purificação de anti-IgGh (Fab_2).....89

Figura 28 – SDS-PAGE de proteínas presentes em tampão de ligação (BB) e tampão de eluição (EB) eluídas de uma coluna contendo proteína G imobilizada para purificação de anti-IgGh (Fab_2).....89

Figura 29 – SDS-PAGE de proteínas presentes em tampão de ligação (BB) e tampão de eluição (EB) eluídas de uma coluna contendo uma mistura de proteína A e G imobilizada para purificação de anti-IgGh (Fab_2).....89

Figura 30 – Princípio do processo de separação em micro-poços. A) proteínas em solução antes da aplicação de uma diferença de potencial; B) proteínas em solução migrando, ao longo do tempo, devido à aplicação de uma diferença de potencial; C) proteínas em solução impedidas de migrar por causa da neutralidade de cargas (pH = pI).....94

Figura 31 – Visualização e comparação de bandas do padrão de massa molecular com proteínas presentes em cada poço, após separação de solução de IgGh 7,2 mg mL^{-1} em micro-poços, utilizando-se tira IPG pH 3-10 de alta resolução.....95

Figura 32 – Visualização e comparação de bandas do padrão de massa molecular com proteínas presentes em cada poço, após separação de solução de BSA 1,38 mg mL^{-1}, utilizando-se tira IPG pH 3-10 de baixa resolução.....98

Figura 33 – Espectrometria de massa de BSA (m/z = 35.000 a 215.000). Inserção corresponde à SDS-PAGE.....100

Figura 34 – Espectrometria de massa de BSA (m/z = 30.000 a 86.000). Inserção corresponde à SDS-PAGE.....101

Figura 35 – SDS-PAGE para amostras de IgGh submetidas à ação da enzima papaína 0,1 mg mL^{-1} em diferentes tempos de incubação (1, 2, 4, 6, 12, 18, 24 e 48 h) a 37 ºC.....104

Figura 36 – SDS-PAGE para amostras de IgGh submetidas à ação da enzima papaína 0,02 mg mL^{-1} em diferentes tempos de incubação (1, 2, 4, 6, 12, 18, 24 e 48 h) a 37 ºC.....105

Figura 37 – SDS-PAGE para amostras de IgGh não submetidas à ação da enzima papaína em diferentes tempos de incubação (1, 2, 4, 6, 12, 18, 24 e 48 h) a 37 ºC.....106

Figura 38 – SDS-PAGE aplicada para visualizar as bandas características da IgGh, dos fragmentos que não interagem com a proteína A na coluna e fragmentos eluídas desta.....108

Figura 39 – SDS-PAGE utilizando soluções concentradas contendo fragmentos presentes no tampão de ligação e no tampão de eluição.....109

Figura 40 – Rendimento do processo de fragmentação utilizando papaína imobilizada previamente utilizada (após 150, 90 e 60 dias) e controle (papaína nunca utilizada).....110

Figura 41 – Mudança de coloração da solução semente: CTAB 0,10 mol L^{-1} em solução aquosa, complexo CTAB-Au^{3+} ($HAuCl_4$ 1,0 mmol L^{-1}) e semente após adição de $NaBH_4$ 0,10 mol L^{-1}.....112

Figura 42 – Mudança de coloração da solução de crescimento: CTAB 0,020 mol L^{-1} em solução aquosa, complexo CTAB-Au^{3+} ($HAuCl_4$ 3,0 mmol L^{-1}), complexo CTAB-Au^{+} (ácido ascórbico 0,10 mol L^{-1}) e avanço do crescimento das NP-Au.....113

Figura 43 – Ilustração da A) morfologia 3-D das faces das extremidades (111) e das faces laterais (100); B) formação da dupla camada de CTAB na superfície do NB (retângulo preto) que auxilia na formação do NB à medida que mais íons de ouro (pontos pretos) são introduzidos.....113

Figura 44 – Efeito da forma de nanoestruturas nas propriedades espectrais. Espectros UV-Vis calculados para nanoestruturas de Ag: extinção (preto), absorção (vermelho) e espalhamento (azul).....116

Figura 45 – Espectro de extinção da solução de preparação de NC-Au.....117

Figura 46 – MEV dos NC-Au, com aumento de 90.000 vezes.....118

Figura 47 – MEV das NP-Au obtidas a partir da preparação sem adição de Cu^{2+}. Aumento de 10.000 vezes.....119

Figura 48 – MEV das NP-Au obtidas a partir da preparação sem adição de Cu^{2+}. Aumento de 50.000 vezes.....119

Figura 49 – MEV das NP-Au obtidas a partir da preparação sem adição de Cu^{2+}. Aumento de 150.000 vezes.....120

Figura 50 – Distribuição das NP-Au obtidas a partir da preparação sem adição de Cu^{2+} (triângulo, bastão e cubo/esfera).....120

Figura 51 – A) Histograma do comprimento (SD = 9,4 nm); B) Histograma da largura (SD = 3,1 nm) dos NB-Au obtidos a partir da preparação sem adição de Cu^{2+}.....121

Figura 52 – Espectro de extinção de NP-Au que utilizou 2,5; 5,0 e 10,0 μL de solução semente.....122

Figura 53 – Imagem de MEV da preparação de NB-Au que utilizou 2,5 μL de solução semente.....123

Figura 54 – Imagem de MEV da preparação de NB-Au que utilizou 5,0 μL (volume referência) de solução semente.....124

Figura 55 – Imagem de MEV da preparação de NB-Au que utilizou 10,0 μL de solução semente.....124

Figura 56 – Espectro de extinção de NP-Au com variação da [Au^{3+}] (1,0; 1,5; 2,0; 2,4; 2,5; 3,0 mmol L^{-1}).....125

Figura 57 – A) Histograma do comprimento (SD = 10,5 nm); B) Histograma da largura (SD = 3,4 nm) dos NB-Au obtidos a partir da preparação sem adição de Cu^{2+} e [Au^{3+}] = 1,5 mmol L^{-1}; C) Imagem MEV.....126

Figura 58 – A) Histograma do comprimento (SD = 15,0 nm); B) Histograma da largura (SD = 7,1 nm) dos NB-Au obtidos a partir da preparação sem adição de Cu^{2+} e [Au^{3+}] = 2,4 mmol L^{-1}; C) Imagem MEV.....126

Figura 59 – A) Histograma do comprimento (SD = 14,8 nm); B) Largura (SD = 5,9 nm) dos NB-Au obtidos a partir da preparação sem adição de Cu^{2+} e [Au^{3+}] = 2,5 mmol L^{-1}; C) Imagem MEV.....127

Figura 60 – A) Histograma do comprimento (SD = 25,2 nm); B) Histograma da largura (SD = 10,0 nm) dos NB-Au obtidos a partir da preparação sem adição de Cu^{2+} e [Au^{3+}] = 3,0 mmol L^{-1}; C) Imagem MEV.....127

Figura 61 – Variação de frequência do sensor de QCM-D associado à deposição de massa de IgGh ou de seus fragmentos que não interagiram com proteína A imobilizada em coluna.....129

Figura 62 – Espectro Raman de IgGh 160 mg mL^{-1} adquirido utilizando-se laser 632,8 nm.....131

Figura 63 – Espectros SERS de IgGh 160 mg mL^{-1} reprodutíveis (adquiridos em diferentes pontos e utilizando-se laser 632,8 nm).....134

Figura 64 – Provável orientação de cistina presente em IgGh sobre superfície de eletrodo de Ag (-0,5 V e tampão fosfato 0,25 mol L^{-1}).....136

Figura 65 – Provável orientação de Trp presente em IgGh sobre superfície de eletrodo de Ag (-0,5 V, tampão fosfato 0,25 mol L^{-1} e pH 7,2).....137

Figura 66 – Provável orientação de Tyr presente em IgGh sobre superfície de eletrodo de Ag (-0,5 V, tampão fosfato 0,25 mol L^{-1} e pH 7,2).....138

Figura 67 – Espectros SERS de IgGh diluída (8,7 mg mL^{-1}) adquiridos em pontos distintos da solução e utilizando-se laser 632,8 nm.....140

Figura 68 – Espectro SERS de fragmento F(ab)' adquirido utilizando-se laser 632,8 nm.....141

Figura 69 – Ilustração das possíveis orientações de IgGh concentrada (a), diluída (b) e fragmento F(ab)' de IgGh (c), onde S–S correspondem às ligações de dissulfeto na região de dobradiça e entre as cadeias pesada e leve.....142

Figura 70 – Espectro SERS de fragmento F(ab)' em tampão de ligação – BB (preto) e de IgGh 8,7 mg mL^{-1} (vermelho) adquiridos utilizando-se laser 632,8 nm.....143

Figura 71 – Espectro Raman de anti-IgGh (H+L) 35 mg mL^{-1} adquirido utilizando-se laser 632,8 nm.....144

Figura 72 – Ilustração do modo vibracional de ligação de dissulfeto para as conformações *trans*- e *gauche*- em C–S, S–S e S–C.....145

Figura 73 – Espectro Raman de anti-IgGh (Fab_2) 35 mg mL^{-1} adquirido utilizando-se laser 632,8 nm.....142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classes de anticorpos.....30

Tabela 2 – Composição do soro de IgG em adultos.....34

Tabela 3 – Bandas Raman referente às estruturas secundárias de proteínas.....50

Tabela 4 – Volume de solução de padrão (BSA ou γ-globulina) 0,1 mg mL^{-1}, água e reagente Bradford utilizados para a construção da curva de calibração.....57

Tabela 5 – Composição do gel de separação (12%) e empilhamento (4%) suficientes para a formação de 2-3 géis de cada tipo.....59

Tabela 6 – Composição do tampão de corrida e amostra.....60

Tabela 7 – Composição da solução fixadora, corante e descorante para revelação de bandas em gel por meio do método azul de Coomassie.....61

Tabela 8 – Composição das soluções para revelação de SDS-PAGE.....62

Tabela 9 – Composição da solução de reidratação das tiras IPG.....64

Tabela 10 – Composição da solução de amostra.....64

Tabela 11 – Condições de concentração, pH e resolução para separação de BSA e IgGh.....65

Tabela 12 – Composição dos tampões e soluções utilizados no processo de fragmentação de IgGh por meio de papaína não imobilizada.....68

Tabela 13 – Tempo de digestão recomendado para diversas espécies e concentrações de IgG.....71

Tabela 14 – Aminoácidos “padrão” das proteínas e valores de pK de seus grupos ionizáveis.....91

Tabela 15 – Resultado qualitativo e quantitativo de IgGh após o processo de separação baseado no pI.....96

Tabela 16 – Resultado qualitativo e quantitativo de BSA após o processo de separação baseado no pI.....99

Tabela 17 – Bandas Raman e atribuições para IgGh concentrada.....132

Tabela 18 – Bandas Raman e SERS de IgGh 160 mg mL^{-1}.....135

Tabela 19 – Bandas Raman e atribuições para anti-IgGh (H+L) 35 mg mL^{-1}.....144

Tabela 20 – Bandas Raman e atribuições para anti-IgGh (Fab_2) concentrada.....147

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 25
1.1 Anticorpos 27
1.1.1 Estrutura básica dos anticorpos 28
1.1.2 Classes de IgG humana (IgGh) 29
1.1.2.1 Imunoglobulina A (IgA) 31
1.1.2.2 Imunoglobulina G (IgG) 31
1.1.2.3 Imunoglobulina M (IgM) 32
1.1.2.4 Imunoglobulina D (IgD) 32
1.1.2.5 Imunoglobulina E (IgE) 32
1.1.3 Subclasses de IgG humana 33
1.1.4 Interação entre anticorpos e antígenos 34
1.1.5 Fragmentação de imunoglobulinas 35
1.1.6 Imobilização de imunoglobulinas 39
1.2 Nanopartículas metálicas 40
1.3 Surface-Enhanced Raman Spectroscopy – SERS 43
1.3.1 Espectroscopia Raman de proteínas 47
1.3.1.1 Estrutura secundária 48
1.3.1.2 Cadeia lateral 51
2 OBJETIVO 53
2.1 Objetivo geral 53
2.2 Objetivos específicos 53
3 MATERIAIS E MÉTODOS 54
3.1 Quantificação de proteínas em solução (papaína, IgG humana, anticorpo anti-IgGh H+L e Fab_2) por meio do Método de Bradford 56
3.2 Identificação da massa molecular de anticorpos 57
3.3 Eletroforese em gel 58
3.3.1 Revelação do SDS-PAGE 60
3.3.1.1 Azul de Coomassie 61
3.3.1.2 $AgNO_3$ 61
3.4 Purificação de anticorpos em coluna de afinidade e por pI 62
3.4.1 Purificação em colunas de afinidade 62
3.4.2 Purificação por pI 63

3.5 Avaliação da eficiência do processo de fragmentação de anticorpos 67
3.5.1 Papaína não imobilizada 68
3.5.1.1 Geração de fragmentos..... 69
3.5.1.2 Purificação dos fragmentos F(ab)' em coluna de afinidade . 69
3.5.2 Papaína imobilizada 69
3.5.2.1 Equilíbrio/ativação da papaína 70
3.5.2.2 Preparo da amostra de IgGh 70
3.5.2.3 Geração de fragmentos..... 70
3.5.2.4 Reutilização de papaína imobilizada 71
3.6 Nanopartículas (NP) 72
3.6.1 Variação da preparação de nanocubos de Au (NC-Au) para obtenção de NB-Au 72
3.6.1.1 Preparo de solução semente..... 72
3.6.1.2 Preparo de solução de crescimento 73
3.7 Caracterização das NP-Au 73
3.7.1 Aquisição de espectro de extinção 73
3.7.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 74
3.8 Avaliação do processo de adsorção de IgGh e de seu fragmento (F(ab)') por meio de microbalança de cristal de quartzo (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring – QCM-D) 74
3.9 Caracterização espectroscópica de biomoléculas 75
3.9.1 Espectroscopia Raman 75
3.9.2 Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (do inglês, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy* – SERS) 75
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 77
4.1 Identificação da massa molecular de anticorpos..... 77
4.2 Purificação de anticorpos em coluna de afinidade e por pI 81
4.2.1 Purificação em colunas de afinidade 81
4.2.1.1 Purificação de IgGh..... 82
4.2.1.2 Purificação de anti-IgGh (H+L) 85
4.2.1.3 Purificação de anti-IgGh (Fab_2) 88
4.2.2 Purificação por pI 90
4.3 Avaliação da eficiência do processo de fragmentação de anticorpos 102
4.3.1 Papaína não imobilizada 103

4.3.2 Papaína imobilizada 108
4.3.2.1 Reutilização de papaína imobilizada 110
4.4 Nanopartículas (NP) 111
4.4.1 Variação da preparação de NC-Au para obtenção de NB-Au 111
4.5 Caracterização das NP-Au 115
4.5.1 Aquisição de espectro de extinção e MEV 115
4.5.1.1 NC-Au 117
4.5.1.2 NB-Au 118
4.6 Avaliação do processo de adsorção de IgGh e de seu fragmento F(ab)' por meio de microbalança de cristal de quartzo (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring – QCM-D) 129
4.7 Caracterização espectroscópica de biomoléculas 130
4.7.1 IgGh 131
4.7.2 Anti-IgGh (H+L) 143
4.7.3 Anti-IgGh (Fab_2) 146
5 CONCLUSÕES 152
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 155

1 INTRODUÇÃO

Na construção de biossensores, as biomoléculas (proteínas, enzimas, anticorpos, DNA, etc.) devem ser imobilizadas sobre superfícies, sendo que a imobilização deve permitir o reconhecimento do elemento biológico por sua molécula alvo e esta interação ser expressa por meio de um elemento transdutor que demonstre quantitativamente essa informação. A Figura 1 ilustra os principais componentes de um biossensor (CONROY *et al*., 2009; DORST *et al*., 2010).

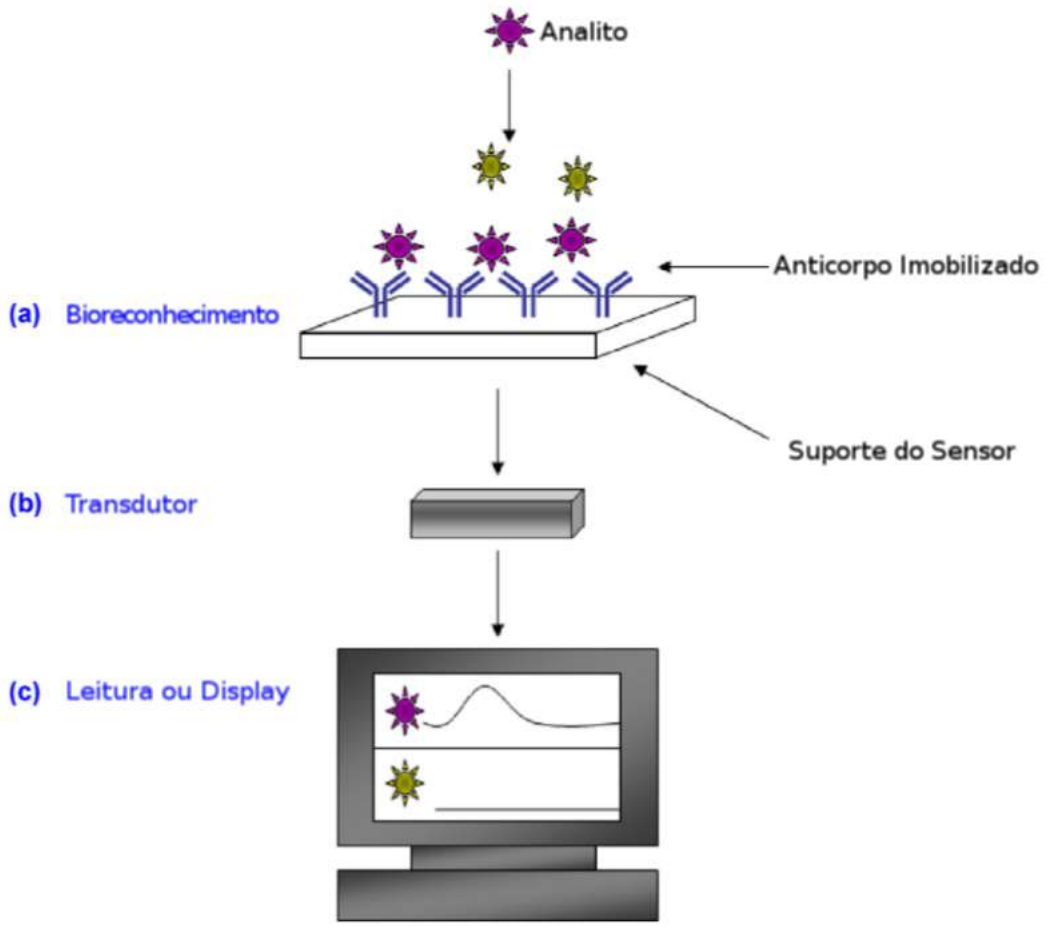

Figura 1 – Componentes de um biossensor. a) interação do analito com o elemento biológico para reconhecimento: imobilização do anticorpo específico por seu respectivo antígeno (roxo). Outros elementos biológicos para reconhecimento incluem enzimas, lectinas, receptores e células microbianas. b) Transdução do sinal: converte a interação da molécula e analito em um sinal quantificável. c) Leitura ou display: apresenta o sinal específico gerado pela interação com o analito de interesse. Amarelo: analito não específico (adaptado de CONROY *et al.*, 2009).

Em relação às biomoléculas, os anticorpos são frequentemente utilizados em biossensores (denominados como imunossensores) devido a sua especificidade frente a diversos analitos em uma matriz complexa, que pode ser entendida por meio da alta constante de associação/afinidade (K_0) que forma complexos fortemente combinados (FERRI *et al*., 1977).

Para que ocorra esta especificidade, diversas forças atuam, permitindo a interação do anticorpo com a sua molécula alvo, tais quais: regiões hidrofóbicas, forças coulômbicas, ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals. Essas forças estão diretamente relacionadas à maneira como a molécula de anticorpo está organizada em sua estrutura secundária, de modo que aminoácidos específicos, em determinadas posições, serão responsáveis pela adequada aproximação do analito, sua fixação e, consequente, formação do complexo com alta constante de associação/afinidade (FERRI *et al*., 1977).

Dentre as possibilidades de se expressar a ligação entre os anticorpos-analitos, imunossensores baseados em métodos eletroquímicos (potenciometria, amperometria e impedância), piezoelétricos e ópticos (fluorescência, SPR, UV-Vis) são comumente utilizados. Em todos estes casos, superfícies de ouro podem ser empregadas para imobilizar os anticorpos diretamente ou por meio de ligantes, tais como a biotina (CONROY *et al*., 2009). No entanto, de um modo geral, o sinal adquirido e traduzido, quer seja da imobilização dos anticorpos ou da interação propriamente dita, não traz informações sobre a orientação da biomolécula sobre a superfície, tão pouco sobre as regiões por onde ocorreram as interações.

Além disto, quando as biomoléculas são imobilizadas, deve-se considerar as mudanças conformacionais (CONROY *et al*., 2009; KENEGNE-MOMO *et al*., 2012). Pois, embora os anticorpos sejam moléculas com alta especificidade, a interação

somente ocorrerá se houver a manutenção dos sítios de ligação, os quais devem estar disponíveis e, também, a estrutura secundária da molécula não pode sofrer significativas alterações de modo que prejudique a formação do complexo estável, comprometendo o desempenho do imunossensor (TRILLING, *et al*., 2013).

Assim, uma das técnicas mais recomendáveis para indicar a imobilização dos anticorpos sobre superfícies (por exemplo, Au), demonstrando a orientação da biomolécula, a sua conformação secundária e interações, corresponde à espectroscopia Raman, pois pode ser utilizada em soluções aquosas, com a possibilidade de se mensurar a intensidade do sinal Raman e correlacioná-lo com a concentração do analito, com preparo de amostra relativamente simples e, associado à microscopia Raman, pode-se obter altos níveis de resolução espacial e de profundidade. Além do que, é uma técnica que permite obter espectros característicos da amostra (KENGNE-MOMO *et al*., 2012).

1.1 Anticorpos

Os anticorpos são proteínas que são encontradas no soro e outros fluidos corporais de animais vertebrados, com a capacidade de se ligar a antígenos (corpos estranhos ao organismo) para marcá-los ou gerar uma resposta imune (ELGERT, 1996; SELA-CULANG, 2013).

A família de proteínas globulares com a função de se ligar e marcar antígenos é chamada de imunoglobulina e, neste contexto, os anticorpos são comumente chamados de imunoglobulinas (ELGERT, 1996).

Os anticorpos têm estrutura similar, com formato de Y, mas respondem especificamente a corpos estranhos distintos por causa da variabilidade de

aminoácidos na região denominada paratopo. No caso dos antígenos, estes possuem uma região denominada epitopo, que é a responsável pela resposta imune e por onde ocorre a interação anticorpo-antígeno. (ELGERT, 1996; SELA-CULANG, 2013).

1.1.1 Estrutura básica dos anticorpos

Os anticorpos são formados por duas subunidades denominadas cadeias leves (do inglês, *light chain*) e cadeias pesadas (do inglês, *heavy chain*) que são unidas por ligações dissulfídicas. Também, ocorre ligação entre as cadeias pesadas pelo mesmo tipo de ligação entre os aminoácidos cisteínas (Cys). Por fim, há uma região que confere flexibilidade aos anticorpos no processo de interação anticorpo-antígeno (Ab-Ag) denominada região de dobradiça (do inglês, *hinge region*) (FERRI *et al*., 1977; ELGERT, 1996; MURRAY *et al*., 2009).

Tanto a cadeia pesada quanto a leve possuem regiões com sequências de aminoácidos constantes (C) e outras com aminoácidos variáveis (V). Justamente na região variável das cadeias leves (V_L) e pesadas (V_H) é que ocorre a especificidade dos anticorpos (paratopo) pelos antígenos. As cadeias pesadas possuem aproximadamente 220 aminoácidos (massa molecular de 55.000 Da), enquanto a leve 110 (massa molecular de 25.000 Da) (HARLOW & LANE, 1988; ELGERT, 1996; MURRAY *et al*., 2009).

A Figura 2 ilustra a estrutura básica dos anticorpos, onde V_L e V_H correspondem às cadeias variáveis leves e cadeias pesadas, bem como C_L e C_H são as cadeias constantes leves e pesadas, respectivamente (ELGERT, 1996).

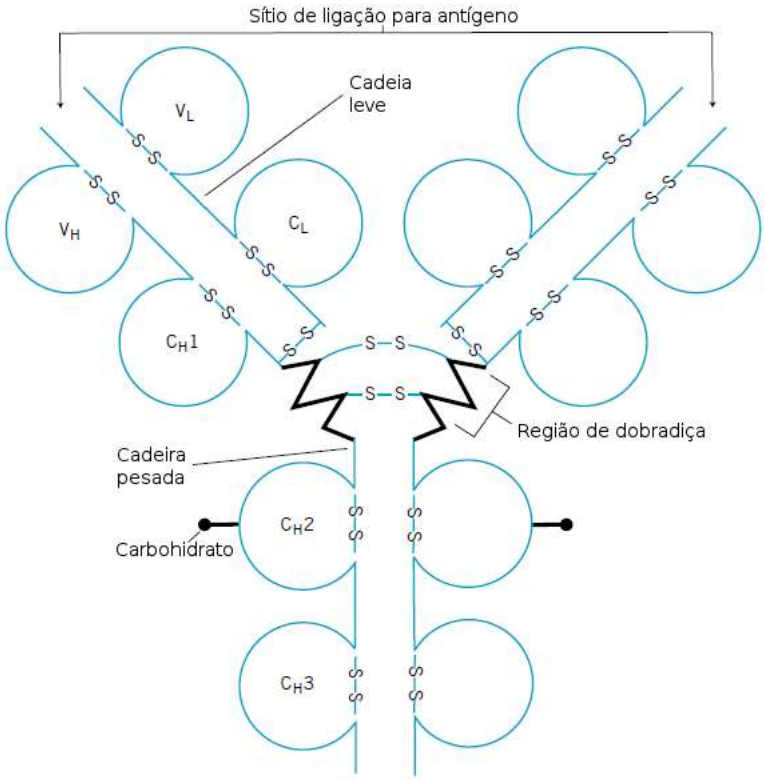

Figura 2 – Representação esquemática das diferentes regiões de um anticorpo (Adaptado de ELGERT, 1996).

1.1.2 Classes de IgG humana (IgGh)

As classes de IgGh diferem-se entre si pelo tipo de cadeia pesada (sequência de aminoácidos). Estas eram denominadas pelas letras gregas α, γ, μ, δ e ε, sendo que atualmente são conhecidas como IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. Em relação à cadeia leve, existem apenas dois tipos: κ e λ. A Tabela 1 apresenta as características das cinco classes de anticorpos e a Figura 3 a estrutura de algumas imunoglobulinas (FERRI *et al*., 1977; HARLOW & LANE, 1988; MURRAY *et al*., 2009).

Tabela 1 – Classes de anticorpos (Adaptado de HARLOW & LANE, 1988).

Características	IgG	IgM	IgA	IgE	IgD
Cadeia pesada	γ	μ	α	ε	δ
Cadeia leve	K ou λ	K ou λ	K ou λ	K ou λ	K ou λ
Fórmula molecular	$\gamma_2\kappa_2$ ou $\gamma_2\lambda_2$	$(\mu_2\kappa_2)_5$ ou $(\mu_2\lambda_2)_5$	$(\alpha_2\kappa_2)_n$ ou $(\alpha_2\lambda_2)_n$	$\varepsilon_2\kappa_2$ ou $\varepsilon_2\lambda_2$	$\delta_2\kappa_2$ ou $\delta_2\lambda_2$
Estrutura Y	Monômero	Pentâmero	Mono, di ou trímero	Monômero	Monômero
Valência	2	10	2, 4 ou 6	2	2
Concentração no soro	8-16 mg mL^{-1}	0,5-2 mg mL^{-1}	1-4 mg mL^{-1}	10-400 ng mL^{-1}	0-0,4 mg mL^{-1}
Função	Resposta secundária	Resposta primária	Proteção de membranas de mucosas	Proteção contra parasitas (hipótese)	Indeterminada

n = 1, 2 ou 3

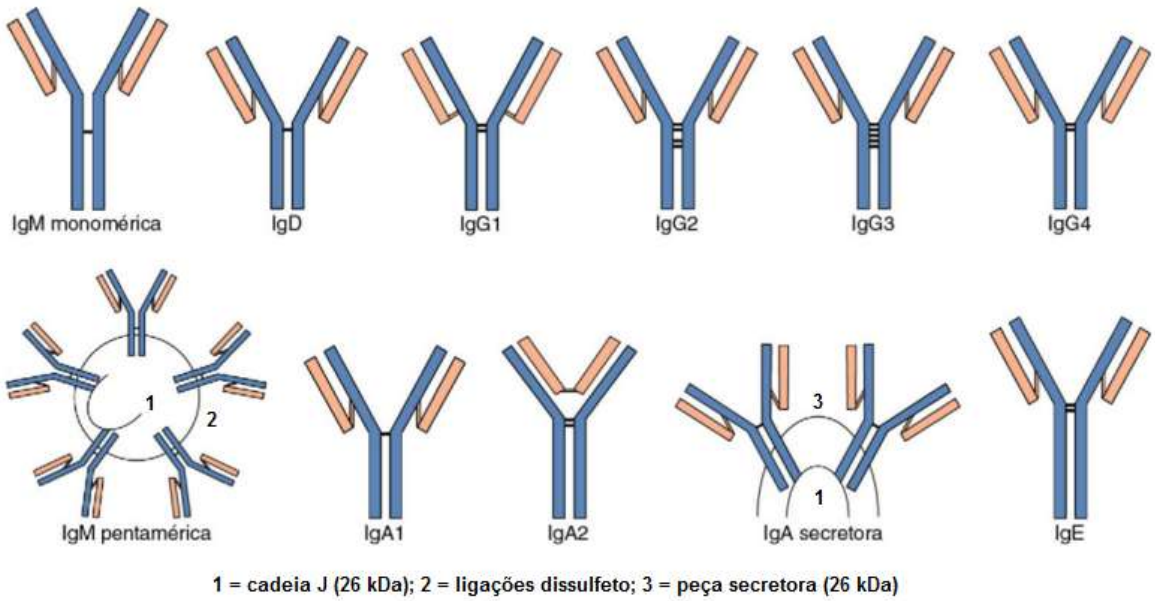

Figura 3 – Ilustração das estruturas das imunoglobulinas (A, D, E, G e M) (Adaptado de MURRAY *et al*., 2009).

1.1.2.1 Imunoglobulina A (IgA)

As IgA podem apresentar-se na forma de um monômero, dímero ou trímero, sendo o dímero o isotipo mais comum. Porém, nenhuma dessas formas atravessa a placenta. Em relação a sua composição, os dímeros possuem massa molecular de 390.000 Da, sendo que as duas unidades são interligadas por um peptídeo denominado cadeia J (26.000 Da) e outro denominado componente ou peça secretora (26.000 Da). As IgA ocorrem em secreções externas (saliva, lágrima, colostro e fluidos que recobrem as mucosas dos tratos respiratório, gastroentérico e urinário) e garantem a defesa do corpo humano contra germes e penetração de alérgenos (FERRI *et al*., 1977; HARLOW & LANE, 1988; SNOECK *et al*., 2006; MURRAY *et al*., 2009).

1.1.2.2 Imunoglobulina G (IgG)

As IgG possuem a mesma massa molecular dos monômeros de IgA, com aproximadamente 440 aminoácidos. Mas, diferentemente das IgA, as IgG atravessam a placenta e conferem aos recém-nascidos a defesa contra a invasão de micro-organismos nos primeiros meses. Esta capacidade de penetração placentária está relacionada à composição química da região denominada Fc (do inglês, *fragment crystallizable*) (FERRI *et al*., 1977; HARLOW & LANE, 1988). Sabe-se, também, que correspondem a 75% das imunoglobulinas do soro humano em adultos saudáveis (HAMILTON, 1987; MURRAY *et al*., 2009).

1.1.2.3 Imunoglobulina M (IgM)

A IgM apresenta-se na forma de pentâmero devido a ligações dissulfídicas, cujos monômeros são ligados por meio da cadeia J, tal qual ocorre na IgA. As unidades podem ser separadas por redução branda, resultando em monômeros com massa molecular de 180.000 Da, sendo sua cadeia pesada maior do que a de IgG (FERRI *et al*., 1977; MURRAY *et al*., 2009).

1.1.2.4 Imunoglobulina D (IgD)

Em relação à sua composição, as IgD apresentam-se na forma de monômeros, cujas cadeias pesadas possuem 70.000 Da e estão ligadas por apenas uma ligação dissulfídica. Elas já foram identificadas em soro de paciente portador de mieloma, podem possuir atividade antigênica contra nucleoproteínas e insulina (portadores ou não de diabetes) (FERRI *et al*., 1977; MURRAY *et al*., 2009).

1.1.2.5 Imunoglobulina E (IgE)

As IgE possuem cadeia pesada com massa molecular de 75.000 Da. Elas podem gerar reações anafiláticas quando sua porção Fc fixa-se nos tecidos e permite a liberação de substâncias farmacológicas ativas, estão presentes no colostro materno e há correlação entre este anticorpo e infecções por helmintos (FERRI *et al*., 1977; MURRAY *et al*., 2009).

1.1.3 Subclasses de IgG humana

Cada IgG possui 12 ligações de dissulfeto intra-cadeias, resultando nos chamados domínios das IgG. Já as ligações inter-cadeias são diferentes em cada uma das subclasses, conforme é apresentado na Figura 4, sendo que essas são responsáveis pelas ligações da cadeia leve e pesada na porção variável, bem como das pesadas na porção constante do anticorpo (LIU & MAY, 2012).

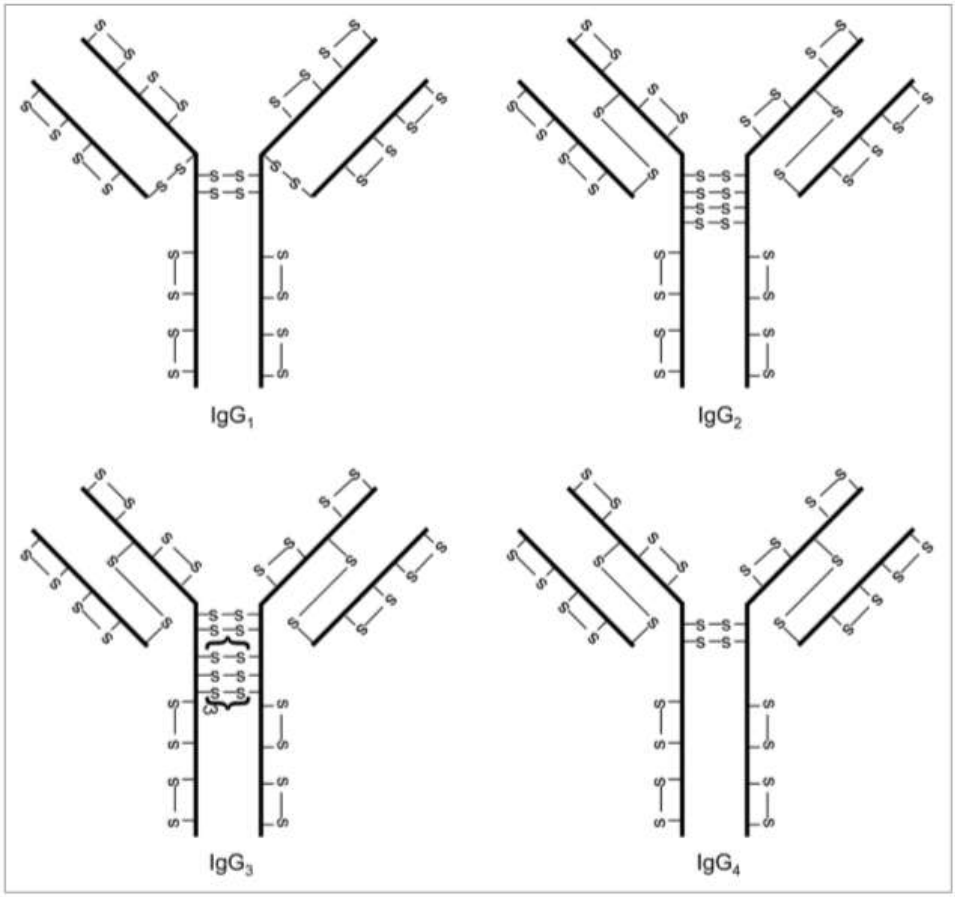

Figura 4 – Esquema ilustrando a constituição de cada subclasse de IgGh (LIU & MAY, 2012).

Na Tabela 2 é apresentada a composição do soro humano em relação às subclasses de IgG.

Tabela 2 – Composição do soro de IgG em adultos (HAMILTON, 1987).

IgG	%
1	60,3-71,5
2	19,4-31,0
3	5,0-8,4
4	0,7-4,2

1.1.4 Interação entre anticorpos e antígenos

A especificidade de anticorpos por um antígeno é regida pela complementaridade entre o epitopo e o paratopo. Assim, quanto maior for especificidade, menor será a quantidade de reações cruzadas.

As interações não são covalentes, mas os complexos formados são muito estáveis. Sendo que as características que favorecem a aproximação são atribuídas à: 1) hidrofobicidade das cadeias laterais dos aminoácidos valina (Val), leucina (Leu) e fenilalanina (Phe) que permitem a aproximação das moléculas e, consequentemente, dos grupos que interagirão; 2) forças coulômbicas entre grupos ionizados (por exemplo, $–NH_3^+$ e $–COO^-$) das cadeias laterais, podendo corresponder aos sítios de ligação Ab-Ag; 3) ligações de hidrogênio que são, geralmente, em maior número e ocorrem quando as distâncias são menores; 4) forças de Van der Waals quando o anticorpo e antígeno distam de 5 Å (FERRI *et al*., 1977).

Desta maneira, quaisquer modificações que forem feitas nos anticorpos, a região de ligação (paratopo) deve ser preservada. Por isso, reduções e desnaturações não podem ser feitas em sistemas que se deseja a formação do complexo Ab-Ag.

1.1.5 Fragmentação de imunoglobulinas

A elucidação de uma classe específica de imunoglobulinas, as imunoglobulinas G (IgG), foi realizada por Edelman e Porter no final dos anos 1950 e início dos anos 1960. O primeiro tratou essa molécula usando diferentes reagentes químicos, enquanto que o segundo baseou-se na degradação desta proteína por meio do uso de uma protease (papaína) (ELGERT, 1996).

Ao utilizar diferentes reagentes químicos (ditiotreitol, iodoacetamida e agente desnaturante), Edelman conseguiu separar subunidades grandes de 50 kDa e subunidades pequenas de 23 kDa, denominado-as como cadeias pesadas e cadeias leves, respectivamente. No processo de digestão proteolítica utilizando papaína, Porter identificou a geração de três fragmentos com massas moleculares semelhantes (50 kDa), mas com cargas diferentes. Dois fragmentos, chamados de fragmentos F(ab)' (do inglês, *fragments of antigen-binding*) com massa molecular de aproximadamente 40 kDa, idênticos e com sítios para a ligação com antígenos. O outro fragmento, denominado Fc, não tinha a capacidade de se ligar aos antígenos e quando eram estocados a baixas temperaturas e em pH próximo ao neutro, cristalizavam-se. Por meio desse experimento, Porter concluiu que a razão F(ab)' e Fc é 2:1. (ELGERT, 1996; KERR, 2006).

Nisonoff utilizou uma protease diferente, a pepsina, e demonstrou em seus estudos a geração de fragmentos $F(ab)_2$', que corresponde a dois fragmentos F(ab)' ligados que podem ser separados quando são tratados com agentes redutores (ELGERT, 1996).

De acordo com o tipo de fragmento desejado, podem ser empregados três tipos de fragmentação, conforme está ilustrado por meio da Figura 5:

1) uso da enzima pepsina, gerando um fragmento $F(ab)_2$', com ~100 kDa;

2) uso da enzima papaína, gerando dois fragmentos F(ab)', com ~50 kDa cada;

3) uso de meio redutor, alquilação e acidificação, gerando dois fragmentos correspondentes às cadeias pesadas, com ~50 kDa e dois fragmentos correspondentes às cadeias leves, com 23 kDa.

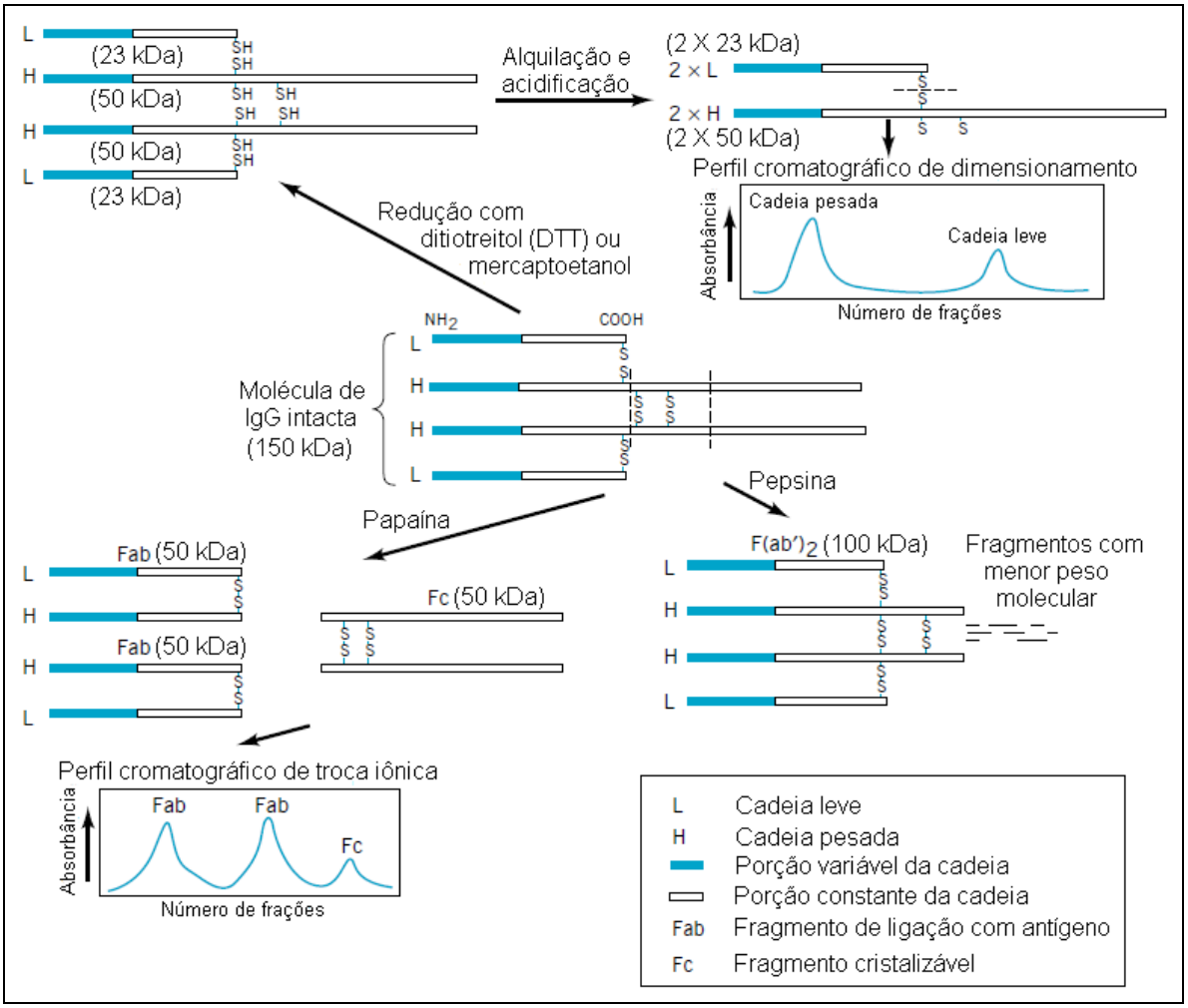

Figura 5 – Esquema contendo três maneiras de fragmentar IgG (Adaptado de ELGERT, 1996).

No processo de fragmentação por meio de pepsina, além do fragmento $F(ab)_2$', são gerados diversos fragmentos pequenos. Isto não ocorre no processo que envolve a papaína, pois além dos dois fragmentos F(ab)' gerados, o fragmento Fc permanece intacto (ELGERT, 1996). Desta forma, ele pode ser retido do meio

reacional utilizando-se proteína A ou G. Pois, possuem cinco e dois domínios, respectivamente, que se ligam especificamente ao fragmento Fc (TRILLING, 2013). Outras enzimas como a bromalina, ficina e elastase podem ser utilizadas para fragmentar anticorpos. Mas, frequentemente se utiliza a papaína (LUO *et al*., 2002).

A papaína é uma cisteíno protease que possui os domínios L e R em sua estrutura bilobada com o sítio catalítico na cavidade dos domínios, conforme é ilustrado na Figura 6.

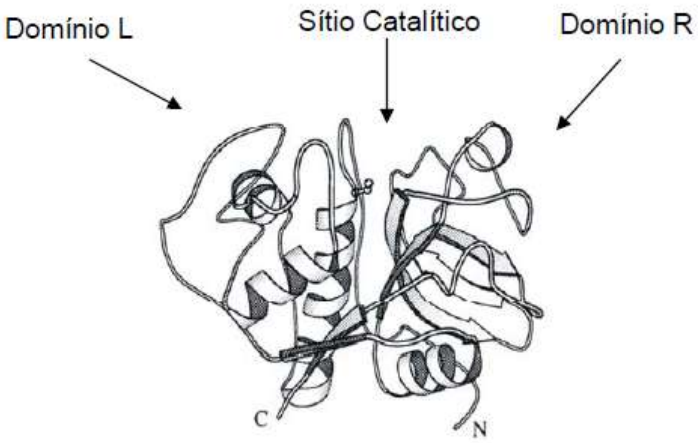

Figura 6 – Estrutura bilobada da enzima papaína com ilustração dos domínios L (C-terminal) e R (N-terminal), bem como do sítio catalítico na reentrância dos domínios (DUARTE, 2008).

Em relação ao sítio ativo, a existência da cisteína no domínio L e da histidina no domínio R permite a ação catalítica da enzima. Outros aminoácidos também são úteis no processo, que estão na seguinte ordem de ligação na cadeia polipeptídica: glutamina (Gln19), cisteína (Cys25), histidina (His159) e asparagina (Asn175). Para que ocorra catálise, a glutamina estabiliza a estrutura tetraédrica intermediária na hidrólise do substrato (anticorpo, por exemplo) e a histidina faz a orientação do anel imidazólico. Já a cisteína, na forma ionizada, atua como nucleófilo, conforme será demonstrado (Figura 7). Na forma ativada da enzima, é formado o par tiol-imidazol que estarão carregados durante a atividade catalítica, demonstrando-se a

dependência do pH para a clivagem e regeneração do sítio catalítico (DUARTE, 2008).

O mecanismo de fragmentação pela ação da enzima papaína está apresentado na Figura 7, com destaque para a ação da Cys e His.

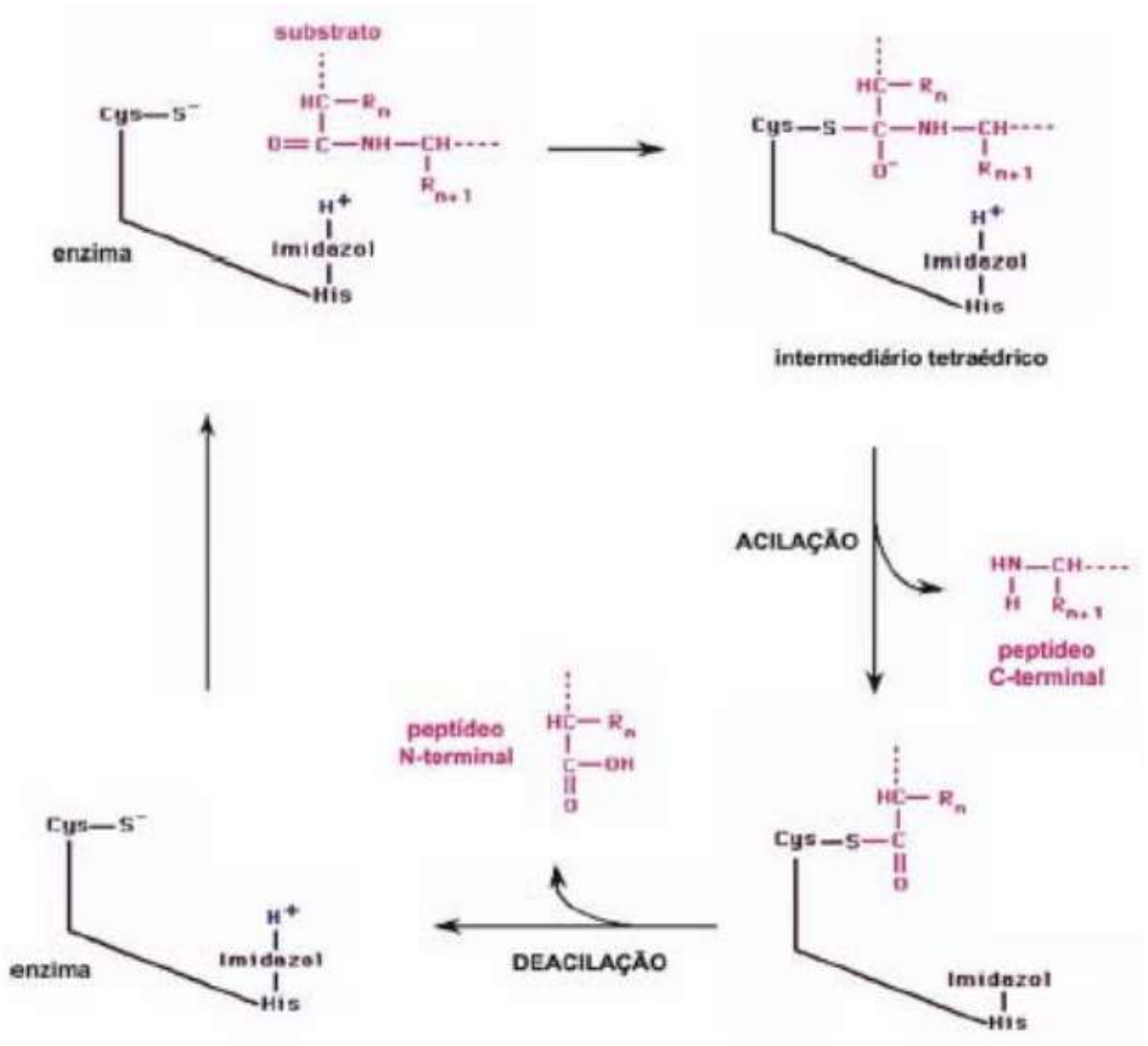

Figura 7 – Mecanismo de catálise utilizado por cisteíno protease (DUARTE, 2008).

Na ilustração acima, o grupo tiol da Cys reage com a carbonila do substrato, resultando na perda da porção C-terminal ($R'NH_2$), acetilando a enzima que reage com a água para formar o produto (RCOOH) por deacilação, resultando na

regeneração da estrutura da enzima, permitindo que o ciclo catalítico seja reiniciado (DUARTE, 2008).

Para que a catálise seja finalizada, utiliza-se iodoacetamida a fim de se inativar a Cys do sítio ativo, sendo que essa substância reage irreversivelmente com a papaína, impedindo-se que o substrato seja atacado por este nucleófilo, conforme está ilustrado na Figura 8.

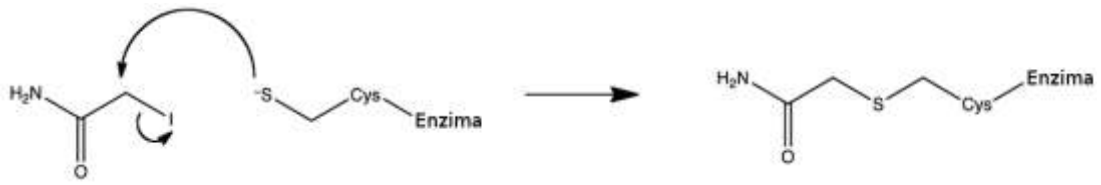

Figura 8 – Mecanismo de inativação de uma cisteíno protease.

1.1.6 Imobilização de imunoglobulinas

O uso de fragmentos F(ab)' ou $F(ab)_2$' tem sido uma alternativa na construção de imunossensores, tendo-se em vista que as orientações adotadas por essas moléculas, no processo de imobilização, permitem a ligação de até 2,5 vezes mais analitos do que quando se utiliza o anticorpo inteiro (TRILLING *et al.*, 2013). Também, há estudos que compararam a eficiência de imunossensores que utilizaram fragmentos F(ab)' e $F(ab)_2$' (VIKHOLM, 2005).

As superfícies nas quais os anticorpos ou seus fragmentos podem ser ligados são as mais variadas possíveis. Na técnica ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA*), uma placa de poliestireno é o suporte para as biomoléculas. Já nas técnicas de QCM (do inglês, *quartz crystal microbalance – QCM*) e SPR (do inglês, *surface plasmon resonance – SPR*), por exemplo, são

utilizados sensores de ouro, onde ocorre a imobilização direta ou indireta dessas biomoléculas (TRILLING, 2013).

Com o avanço de tecnologias baseadas em partículas com tamanhos menores do que 100 nm, amplamente conhecidas como nanopartículas, a imobilização de anticorpos ou de seus fragmentos também tem sido explorada. O interesse por superfícies metálicas em escala nanométrica ocorre, principalmente, por causa de suas características ópticas e eletrônicas (ESCOSURA-MUÑIZ *et al*., 2010).

1.2 Nanopartículas metálicas

Em relação às partículas metálicas em escala nanométrica, estas possuem propriedades ópticas e eletrônicas distintas do *bulk*.

No *bulk* os elétrons livres são responsáveis pela condutividade elétrica e alta refletividade óptica. Já as nanopartículas possuem superfícies que se destacam por apresentar um fenômeno chamado *plasmon*, que consiste na oscilação coletiva dos elétrons superficiais (elétrons de condução) (BRONGERSMA & KIK, 2007).

Este fenômeno ocorre quando as partículas são menores do que o comprimento de onda da radiação eletromagnética incidente (AROCA, R., 2006). O resultado corresponde à geração de um campo elétrico local, conforme Figura 9 (BRONGERSMA & KIK, 2007).

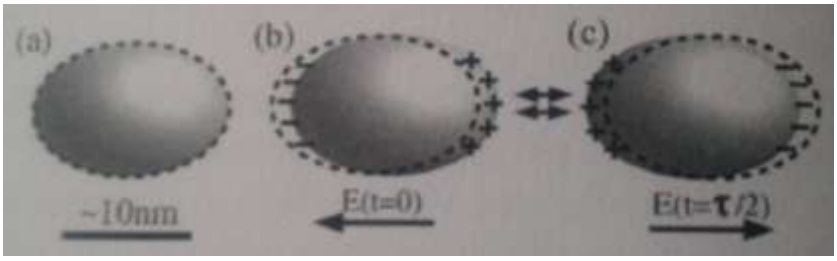

Figura 9 – Representação de uma nanopartícula exposta um campo elétrico (a), tem seus elétrons deslocados conforme tracejado (b-c). A polarização das cargas na superfície aplica uma força restauradora nos elétrons (BRONGERSMA & KIK, 2007).

Uma das técnicas que se utiliza de tal característica, isto é, geração do campo elétrico local, corresponde à Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS). Para tanto, as nanopartículas metálicas comumente utilizadas são: Cu, Ag e Au. Também, diferentes formas podem ser obtidas, por exemplo, esferas, bastões, fios, cubos, entre outros (KUMAR, 2009).

A obtenção das NP pode ser feita com base em duas abordagens conhecidas como "*top-down*" e "*bottom-up*" (Figura 10). Na primeira, parte-se de um *bulk* e, por meio de gravações, são produzidas as estruturas em nanoescala, destacando-se a fotolitografia e a litografia por feixe de elétrons. A vantagem é o controle sobre as formas e a desvantagem está associada ao custo do material e maquinário. Na segunda abordagem, a construção das nanoestruturas dá-se pelo controle em nível atômico, isto é, são utilizadas rotas sintéticas que constroem as estruturas de interesse. Como vantagem, pode-se citar a facilidade e velocidade de produção. Em contrapartida, pode-se ocorrer uma grande dispersão do tamanho e forma das nanoestruturas (KUMAR, 2009).

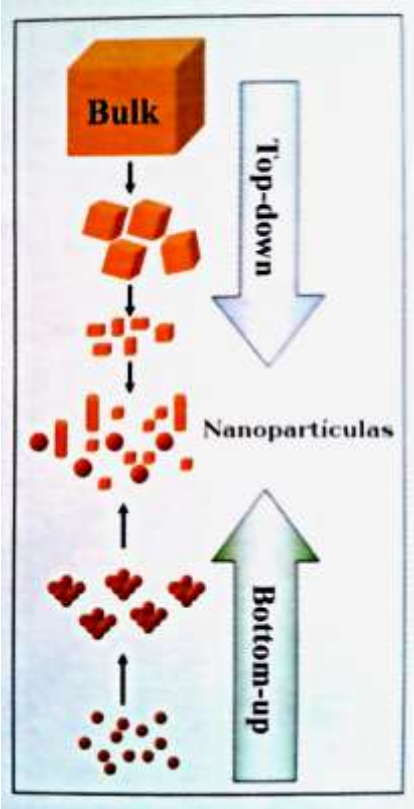

Figura 10 – Ilustração de métodos de preparação de nanopartículas metálicas (Adaptado de KUMAR, 2009).

Em relação à abordagem do tipo "*bottom-up*" é possível preparar NP a partir do crescimento das estruturas conhecidas como sementes. Esse crescimento pode ser feito controlando-se a deposição do íon metálico, que será reduzido, sobre as diferentes faces do cristal formado, conforme pode ser ilustrado na Figura 11 (SAJANLAL *et al*., 2011).

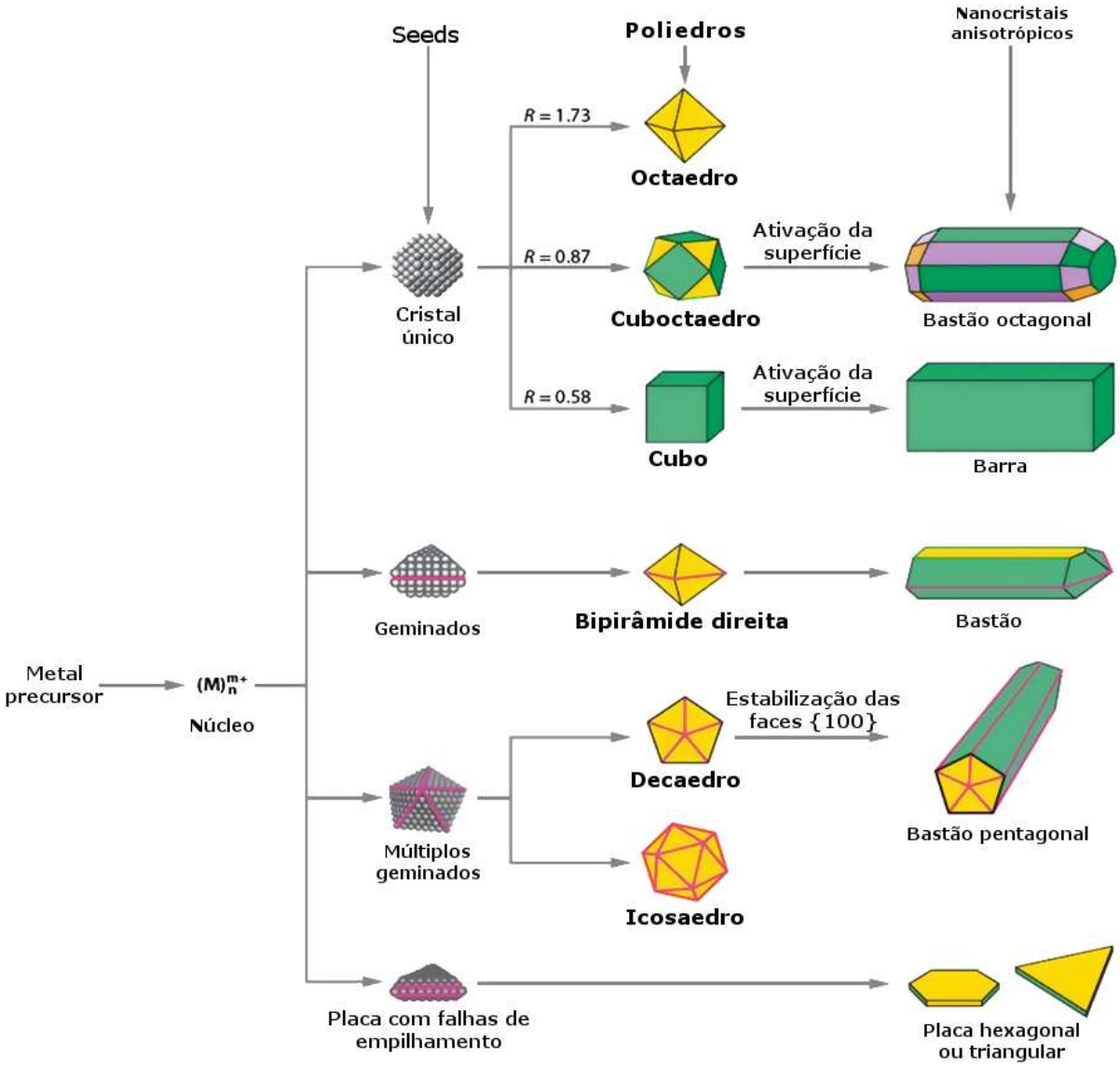

Figura 11 – Ilustração de etapas de reações que resultam em NP metálicas com diferentes formas. Após a formação de núcleos (pequenos *clusters*), os *seeds* tornam-se cristais únicos, geminados ou múltiplos geminados. Falhas no empilhamento geram placas. As colorações verde, amarelo e roxo representam as faces (100), (111) e (110), respectivamente. O parâmetro R é definido como a razão entre a taxa de crescimento ao longo das direções (100) e (111). Os planos são delineados com linhas rosas (Adaptado de SAJANLAL *et al*., 2011).

1.3 Surface-Enhanced Raman Spectroscopy – SERS

O fenômeno SERS está relacionado à amplificação dos sinais Raman de moléculas localizadas em superfícies cuja composição é metálica e nanométrica, principalmente Au e Ag (COSTA *et al*., 2011). No entanto, Cu é outro metal que

também pode ser utilizado, assim como em Pt e Pd (FARIA *et al*., 1999; AROCA, 2006).

A intensificação dos sinais Raman de moléculas localizadas sobre essas superfícies varia de 10^6 a 10^{10}. Sendo que o processo de adsorção envolvido pode ser físico ou químico (AROCA, 2006).

A fim de se explicar o efeito SERS, dois modelos foram propostos: o eletromagnético e o molecular (ou químico). Em ambos, a intensidade do espalhamento Raman (I) é proporcional ao quadrado do momento de dipolo induzido na molécula (α^2) pela interação desta com a radiação incidente (I_0), conforme é demonstrado na Equação 1.

$$I_{mn} = \left(\frac{16\pi^2}{9c^4}\right) I_0 v^4 \sum_{\rho} \sum_{\sigma} \left|(\alpha_{\rho\sigma})_{mn}\right|^2$$

(Equação 1)

onde I_{mn} é a intensidade do modo vibracional referente à transição mn, I_0 a intensidade da radiação incidente, ν a frequência da radiação espalhada e α_{ij} o tensor de polarizabilidade do momento de transição mn (FARIA *et al*., 1999; SALA, 2008).

Também, é possível que o momento de dipolo induzido da molécula seja proporcional ao campo elétrico (Equação 2), onde se tem:

$$\vec{p} = \alpha \vec{E}$$

(Equação 2)

onde $\vec{E}$ corresponde ao campo elétrico em NC^{-1} ou V m^{-1}, $\vec{p}$ é o momento de dipolo elétrico induzido da molécula em Debye (D), sendo que 1 D = 3,336 X 10^{-30} C m e α é a polarizabilidade em C^2 m^2 J^{-1}, de modo que J = C V (AROCA, 2006).

No modelo eletromagnético a intensificação do espalhamento Raman está associada à distância da molécula em relação à superfície metálica e os espectros obtidos são semelhantes aos da molécula em solução, considerando-se que não há contato direto desta com o metal.

Já no modelo molecular a interação da molécula com a superfície metálica conferirá uma mudança na polarizabilidade molecular, devido à formação de complexos de transferência de carga, ligações químicas ou interações eletrostáticas. Assim, o espectro Raman obtido poderá divergir dos espectros originados em solução (FARIA *et al*., 1999).

No processo de quimissorção, é comum a formação de ligações covalentes entre o metal, por exemplo, a Ag, e átomos como N, S, O ou halogênios presentes nas moléculas quimissorvidas, sendo possível a aquisição de seu espectro Raman intensificado (AROCA, 2006).

No caso do campo elétrico, este pode ser aumentado devido ao tamanho nanométrico ou superfícies com saliências (superfícies rugosas) que possuem capacidade de absorver a luz e gerar um fenômeno conhecido como ressonância plasmônica superficial, que corresponde a uma oscilação coletiva dos elétrons de condução do metal ao serem excitados em ressonância por meio da luz visível ou infravermelho próximo (FARIA *et al*., 1999). A Figura 12 ilustra a interação da radiação eletromagnética com a nanopartícula (HAYNES *et al*., 2005).

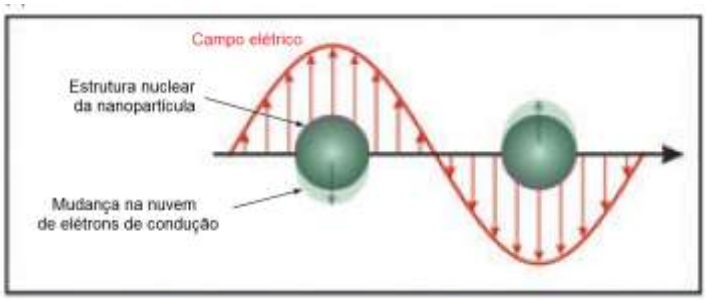

Figura 12 – Ilustração da excitação plasmônica superficial local de nanopartícula esférica pela radiação eletromagnética incidente (Adaptado de HAYNES *et al*., 2005).

O fenômeno SERS não ocorre em superfícies sem rugosidades. E, quando ocorre a oscilação coletiva dos elétrons e, consequente ressonância, o campo elétrico local dessas superfícies plasmônicas é intensificado. Portanto, pelo fato da intensidade Raman ser proporcional ao campo elétrico, caso este seja aumentado, moléculas próximas ou ligadas a superfícies com essa característica terão seus sinais Raman intensificados (AROCA, 2006). Como consequência do campo elétrico local, o processo de intensificação de sinais Raman permite a detecção e caracterização estrutural de moléculas fisi ou quimissorvidas em baixas concentrações, podendo chegar a um limite de detecção de uma molécula (COSTA *et al*., 2011).

No caso dos anticorpos, estes possuem ligações de dissulfeto que podem permitir a quimissorção do tipo S–Au, S–Ag ou S–Cu, de acordo com a nanopartícula utilizada. Assim, esses metais (Au, Ag ou Cu) podem ser utilizados para não somente suportar biomoléculas, mas também para intensificar os seus sinais Raman e permitir a identificação de sua imobilização por meio de sua caracterização espectroscópica.

Em relação às estruturas de NP que favorecem o efeito SERS, destacam-se aquelas que possuem pontas, pois ocorre a concentração do campo elétrico, conforme pode ser ilustrado por meio da Figura 13, onde ilustra alguns formatos de

NP que promovem este fenômeno (HAO & SCHATZ, 2004). Estas morfologias apresentam características vantajosas para as técnicas SERS, cuja intensificação do campo elétrico local permite a amplificação dos sinais Raman de moléculas localizadas em tais regiões.

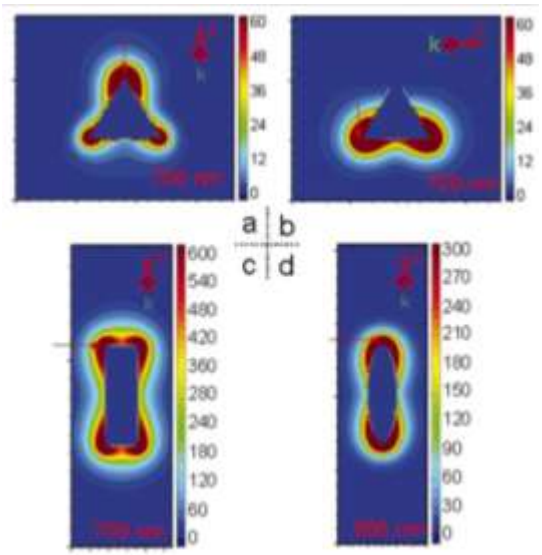

Figura 13 – Contornos externos da intensificação do campo elétrico (E) para monômeros com diferentes formas. (a) e (b) estão os contornos externos da intensificação do campo elétrico para prisma triangular polarizado ao longo de dois eixos de simetria primário, (c) e (d) estão os contornos externos da intensificação do campo elétrico para um bastão e esferoidal polarizado ao longo de seus eixos longitudinais. As setas mostram onde estão os campos elétricos máximos (HAO & SCHATZ, 2004).

1.3.1 Espectroscopia Raman de proteínas

Para proteínas, diversas informações podem ser obtidas por meio da espectroscopia Raman, desde a maneira como elas se organizam, no que diz respeito às suas estruturas secundárias (α-hélice, folha-β e orientação randômica), bem como à cadeia lateral de alguns aminoácidos que as constituem, conforme será apresentado a seguir.

1.3.1.1 Estrutura secundária

A estrutura secundária de proteínas pode ser determinada por meio da espectroscopia Raman. Para isto, a molécula N-metilacetamida (CH_3–CO–NH–CH_3) é amplamente utilizada como modelo para determinar os modos vibracionais de proteínas e peptídeos, correlacionando-os com aqueles presentes nessa amida (ARÊAS & KAWANO, 1991; ANDRUSHCHENKO, V. *et al*., 2009).

Para a construção de imunossensores, o conhecimento das bandas relacionadas às estruturas secundárias pode fornecer, por exemplo, uma relação entre a intensidade de seu sinal Raman com a concentração de uma determinada espécie, como foi demonstrado por Balzerova e colaboradores (BALZEROVA *et al*., 2014).

Assim, sabendo-se que o conhecimento de qual(is) banda(s) caracteriza(m) a(s) estrutura(s) secundária(s) de proteínas, a seguir, são apresentados os modos vibracionais relacionados às vibrações amida no plano e fora do plano, bem como quais são correlacionados as suas estruturas secundárias em estudos por espectroscopia Raman.

Os modos vibracionais que ocorrem entre 600-1800 cm^{-1}, são associados a 4 bandas características denominadas como amida I, II, III e IV. Dentre estas, destacam-se as bandas I e III que contém informações relacionadas às estruturas secundárias das proteínas (ARÊAS & KAWANO, 1991; COELHO, 2013).

As bandas referentes a modos vibracionais fora do plano, denominadas amida V, VI e VII, possuem intensidades fracas na espectroscopia Raman. Também, outras duas bandas relacionadas a uma ressonância de Fermi são características, sendo denominadas Amida A e B e que correspondem ao primeiro estado fundamental do estiramento NH (3236 cm^{-1}) e a primeira harmônica da vibração

amida II (3134 cm^{-1}) que apresentam um efeito de ressonância, gerando bandas intensas em 3280 e 3090 cm^{-1} (ARÊAS & KAWANO, 1991; COELHO, 2013).

Portanto, os modos vibracionais no plano da N-metilacetamida que são relacionados às amidas I, II, III e IV, pois apresentam bandas intensas na espectroscopia Raman (ARÊAS & KAWANO, 1991; COELHO, 2013), são descritos abaixo.

1) Amida I: ocorre em 1650 cm^{-1} e é associada ao estiramento C=O (80%) com contribuições menos significativas do estiramento CN (10%) e deformação angular NH (10%).

2) Amida II: ocorre em 1550 cm^{-1} e é associada à deformação angular NH (60%) e ao estiramento CN (40%).

3) Amida III: ocorre entre 1230 a 1300 cm^{-1} e é associado ao estiramento CN (40%), à deformação angular NH (30%) e ao estiramento CH_3–C (20%).

4) Amida IV: ocorre em 630 cm^{-1} quando a amida é do tipo R-CH_2-CO-NH-R e em 780 cm^{-1} quando H-CO-NH-R. Sendo associada à deformação O=CN.

Como já citado anteriormente, as bandas referentes à amida I e III podem ser correlacionadas com as estruturas secundárias (FERRARO & NAKAMOTO, 1994). Tal organização dá-se por específicas ligações de hidrogênio e ângulos diedros (φ, ψ) da cadeia polipeptídica, formando estruturas conhecidas como α-hélice, folha-β e orientação randômica (OSHOKOYA & JIJI, 2015). Na Figura 14 apresenta-se um peptídeo com seus ângulos diedros.

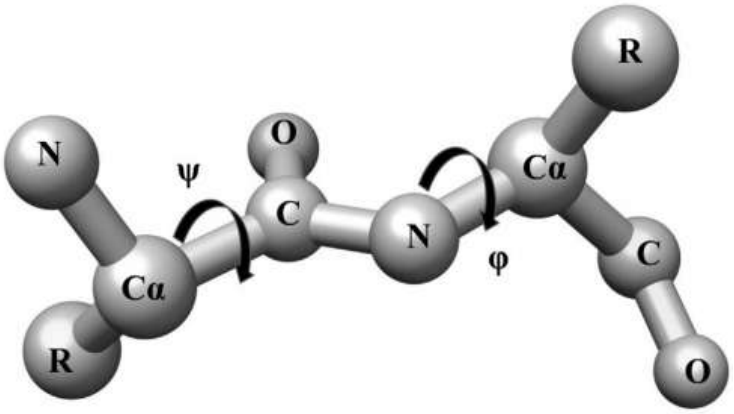

Figura 14 – Esqueleto de um peptídeo de proteína apresentando os ângulos diedros phi (φ) e psi (ψ) (OSHOKOYA & JIJI, 2015).

Os métodos mais comuns para quantificar as estruturas secundárias são: cristalografia de raios-X, ressonância magnética nuclear e dicroísmo circular, complementados pelos métodos vibracionais infravermelho, espectroscopia Raman e Raman ressonante e, mais recentemente, a técnica DUVRR (do inglês, *Deep-Ultraviolet Resonance Raman - DUVRR*) (OSHOKOYA & JIJI, 2015).

Em termos qualitativos, na Tabela 3 são apresentadas as bandas associadas às estruturas secundárias de proteínas (FERRARO & NAKAMOTO, 1994).

Tabela 3 – Bandas Raman referente às estruturas secundárias de proteínas (FERRARO & NAKAMOTO, 1994).

Estrutura secundária	Amida I	Amida III
α-hélice	1645-1600	1300-1260
folha-β	1680-1658	1243-1230
Randômica	1665-1660	1234

As estruturas secundárias folha-β e orientação randômica apresentam banda amida III menos intensa do que a de α-hélice. No entanto, em relação à banda amida I, a α-hélice apresenta banda menos intensa do que as duas outras conformações. A intensidade da banda pode ser associada à existência de maior ou menor quantidade de uma determina estrutura (FERRARO & NAKAMOTO, 1994).

1.3.1.2 Cadeia lateral

Alguns aminoácidos possuem cadeias laterais que são polarizáveis. Neste caso, quando ocorre a interação destes com a radiação eletromagnética, o espalhamento inelástico devido aos modos vibracionais dessas espécies ocorre, de modo que bandas características podem ser identificadas na espectroscopia Raman.

Os aminoácidos aromáticos tirosina (Tyr), triptofano (Trp) e fenilalanina (Phe); os ácidos aspartato (Asp) e glutamato (Glu); o básico histidina (His); o alifático metionina (Met) e o polar não carregado cisteína (Cys), assim como sua forma oxidada cistina, podem ser espécies identificadas por suas bandas características (VOET & VOET, 2006; ARÊAS & KAWANO, 1991; FERRARO & NAKAMOTO, 1994).

A respeito destes aminoácidos, algumas bandas características estão elencadas abaixo (ARÊAS & KAWANO, 1991).

1) modo vibracional relacionado à ionização do grupo fenólico, bem como a respiração do anel da Tyr, por meio da análise do dubleto em 830/850 cm^{-1};

2) modos vibracionais referentes ao anel indol do Trp em 880 e 1360 cm^{-1};

3) modos vibracionais associados às formas tautoméricas do anel imidazólico da His em 1260 a 1282 cm^{-1};

4) ligações C–S da Met e Cys, como também S–S da cistina;

5) ligação S–H em 2600 cm^{-1};

6) modos vibracionais atribuídos ao anel da Phe em 1005 cm^{-1};

7) ionização do grupo carboxílico presente nos aminoácidos ácidos Asp e Glu, apresentando uma banca característica em 1417 cm^{-1}.

Assim, em termos qualitativos, é possível determinar os principais modos vibracionais de anticorpos ou de seus fragmentos. Além do que, intensificar o sinal de bandas Raman por meio da interação entre essas biomoléculas e superfícies SERS-ativas, a fim de se propor eventualmente a construção de um imunossensor que permita a correlação entre o sinal Raman intensificado e a concentração de um analito que interagiu com o anticorpo/fragmento, dada a sua especificidade frente a uma gama de espécies em determinada matriz.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi estudar as características espectroscópicas de anticorpos em diferentes condições, tais quais em soro, após fragmentação e interação com superfícies de nanopartículas de ouro. Para isto, foram utilizadas as seguintes biomoléculas: imunoglobulina G humana, anti-imunoglobulina G humana específica para H+L e Fab_2.

Em relação à caracterização espectroscópica, utilizou-se a técnica de Espectroscopia Raman e SERS, a fim de se obter seus principais modos vibracionais na ausência e presença de superfícies SERS-ativas (NP-Au).

2.2 Objetivos específicos

– purificar os anticorpos IgG humana, anti-IgG humana (H+L) e anti-IgG humana (Fab_2) (coluna de afinidade e ponto isoelétrico);

– determinar as condições ideais para fragmentação de anticorpos por meio da protease papaína;

– preparar NP-Au via metodologia do tipo *bottom-up*;

– adquirir espectros de anticorpos e de seus fragmentos via Raman e SERS;

– identificar os principais modos vibracionais dos anticorpos e de seus fragmentos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

No preparo de todas as soluções aquosas foi utilizada água deionizada (18 mS cm^{-1}).

Os seguintes reagentes foram adquiridos e usados sem purificações adicionais:

L-ácido ascórbico, ácido etilenodiaminatetracético, ácido tetracloroáurico 99,9% ($HAuCl_4$), albumina de soro bovino ≥ 98% (BSA), azul de Coomassie, borohidreto de sódio ($NaBH_4$), brometo de hexadeciltrimetilamônio 98% (CTAB), L-cisteína 98%, dodecil sulfato de sódio 98,5% (SDS), glicerol 99%, glicina 99%, iodoacetamida 99%, 2-mercaptoetanol, padrão de massa molecular SigmaMarker™ Wide Range, persulfato de amônio 98% ($(NH_4)S_2O_8$), sal dissódico (EDTA), sal sódico de azul de bromofenol, solução de papaína (Papain latex Type III), N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina 99% (TEMED), Trizma® base 99,9% e Tris-HCl 99%, solução de Bradford foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Etanol P.A. e hidróxido de sódio (NaOH) foram adquiridos da Merck. 30% acrilamida/bis (37,5:1), padrão de BSA 1,38 mg mL^{-1}, proteína γ-globulina e padrão de massa molecular Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards foram adquiridos da BioRad.

Ácido acético P.A., metanol P.A., monohidrogenofosfato de sódio anidro (Na_2HPO_4) e di-hidrogenofosfato de sódio anidro (NaH_2PO_4) e tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$) da Synth foram adquiridos.

Ácido cítrico e carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3) foram adquiridos da CAAL. Formalina e glicose foram adquiridas da Carlo Erba. Azida sódica (NaN_3), peróxido de hidrogênio P.A. (H_2O_2) e hidróxido de amônio 30-32% (NH_4OH) foram adquiridos da Vetec.

Nitrato de prata ($AgNO_3$) e solução de Imunoglobulina G humana (IgGh)160 mg mL^{-1} foram adquiridos da Quimex e Berioglobina®, respectivamente.

Solução de anticorpos anti-IgG humana específicos para detecção da porção H+L e $F(ab')_2$ foram adquiridos da Jackson Immunoresearch. Sulfato de cobre hexahidratado ($CuSO_4 \cdot 6H_2O$) foi adquirido da Fisher Scientific Company. Ultrapure™ DEPC Treated Water foi adquirida da Invitrogen

Kit de fragmentação de Imunoglobulinas (Pierce® Fab Preparation Kit) composto por cisteína·HCl·H_2O, coluna contendo proteína A (NAb™ Protein A Spin Column, 1 mL), coluna de dessalinização (Zeba™ Desalt Spin Columns, 2mL), colunas de rotação, papaína imobilizada, tampão de digestão (Fab Digestion Buffer), tampão de eluição (IgG Elution Buffer), tampão fosfato salino – PBS (BupH™ Phosphate Buffered Saline) e tubos de microcentrifugação foram adquiridos da Thermo Fisher Scientific.

Kit de purificação de anticopos (NAb™ spin kits, 0.2 mL for antibody purification) composto por coluna contendo 200 μL de proteína A, G ou A/G imobilizada (NAb protein A plus (G ou A/G) spin kit), tampão de ligação (binding buffer), tampão de eluição (IgG elution buffer), tampão de neutralização e tubos de microcentrifugação foram adquiridos da Thermo Fisher Scientific.

Kit de análise qualitativa e quantitativa de proteínas para equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer composto por chip para 10 amostras cada, gel corante, gel descorante e padrão de massa molecular da Agilent Protein 230. A base para inserção de amostras no chip e seringa para inserção de gel matriz são materiais suplementares do Agilent 2100 Bioanalyzer.

Kit para separação de proteínas em equipamento Agilent 3100 OFFGEL Fractionator contendo tira para gerar um gradiente de pH (baixa resolução), canaleta

(12X12 cm), seladora de canaleta (12 poços), eletrodos de contato, eletrodos fixo e móvel, óleo mineral, glicerol e tampão OFFGEL (pH 3-10) da Agilent.

3.1 Quantificação de proteínas em solução (papaína, IgG humana, anticorpo anti-IgGh H+L e Fab_2) por meio do Método de Bradford

A quantificação das soluções de proteínas foi realizada por meio do método de Bradford que determina a quantidade de proteína total (LUCARINI & KILIKIAN, 1999). Neste método, uma curva de calibração é construída, utilizando-se um padrão de concentração 0,1 mg mL^{-1}.

No caso da papaína (23,406 kDa), utilizou-se solução de albumina bovina (do inglês, *bovine serum albumin – BSA*), cujo massa molecular é de 66,406 kDa, como padrão. Enquanto que para a quantificação dos anticorpos, foi utilizada uma solução de γ-globulina (BIO-RAD, 2010), cuja massa molecular é de aproximadamente 150 kDa.

Esta distinção dá-se pelo fato do ensaio determinar proteína total, de modo que o reagente interage com os aminoácidos superficiais das proteínas que contém resíduos básicos e aromáticos, principalmente com a Arg (LUCARINI & KILIKIAN, 1999). Assim, há necessidade de que o padrão possua massa molecular próximo ao da proteína de interesse, pois os aminoácidos superficiais no padrão e na amostra devem ser semelhantes, a fim de que representem a quantificação de proteínas totais.

A Tabela 4 apresenta os volumes dos reagentes utilizados para a construção da curva de calibração (0,2 a 10 µg mL^{-1}) para determinação da concentração das proteínas em solução.

Tabela 4 – Volume de solução de padrão (BSA ou γ-globulina) 0,1 mg mL^{-1}, água e reagente Bradford utilizados para a construção da curva de calibração.

Cubeta	Volume de solução de padrão (BSA ou γ-globulina) 0,1 mg mL^{-1} (μL)	Volume de H_2O (μL)	Volume de reagente Bradford (μL)
Branco	0	800	200
1	20	780	200
2	40	760	200
3	60	740	200
4	80	720	200
5	100	700	200

Para determinar a concentração das proteínas em solução, todos os experimentos foram feitos em triplicata (cubetas de 1 mL de capacidade, com caminho óptico de 1 cm e absorbância medida em λ = 595 nm) em espectrofotômetro UV-Vis (UV-2550 – SHIMADZU).

3.2 Identificação da massa molecular de anticorpos

A identificação da massa molecular de anticorpos foi feita pela Central Analítica do IQ-USP, utilizando-se o equipamento MALDI TOF-TOF (modelo Ultraflextreme – Bruker).

As soluções de anticorpos a serem analisadas estavam em tampão fosfato salino (do inglês, *Phosphate Buffered Saline – PBS*) e houve a necessidade de retirar os sais. Portanto, cada amostra (10 μL) foi submetida à coluna de separação de 30.000 MWCO (do inglês, *molecular weight cut-off – MWCO* – Vivaspin 500 – Healthcare). Sendo que, esta foi previamente lavada com água a 1000 X g, a 25 °C, durante 15 min em centrífuga (Centrifuge 5804 R – Eppendorf), enquanto a amostra foi submetida à lavagens na coluna a 10.000 X g, a 25 °C, durante 5 min e duas vezes a 10.000 X g, a 25 °C, durante 10 min, sendo o volume final sempre igual a

500 μL. Assim, os volumes retidos na coluna corresponderam à amostra que foi analisada por meio da técnica MALDI TOF-TOF.

Utilizou-se a matriz AS (ácido sinapínico) (CHEN *et al*., 2013) na proporção 1:2 μL (amostra:matriz) e aplicou-se 1 μL na placa. As amostras analisadas foram imunoglobulina G humana (IgGh), anti-imunoglobulina G humana H+L (anti-IgGh (H+L)) e anti-imunoglobulina G humana Fab_2 (anti-IgGh (Fab_2)).

3.3 Eletroforese em gel

Em diversas análises que envolveram o uso de anticorpos e proteínas, optou-se por utilizar a técnica de eletroforese em gel (do inglês, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis – SDS-PAGE*) para visualizar o resultado obtido. Desta forma, géis de poliacrilamida foram formados entre placas de vidro para permitir a migração de proteínas (desnaturadas e com carga negativa) no sentido do ânodo, durante a aplicação de um potencial. As etapas envolvidas na técnica SDS-PAGE são apresentadas abaixo:

As placas de vidro foram lavadas com etanol e colocadas em suporte para permitir a formação dos géis. Em todos os experimentos foram formados dois géis gel de separação (12%) e gel de empilhamento (4%), cuja composição é mostrada na Tabela 5 (BONIFACINO *et al*., 2004).

Tabela 5 – Composição do gel de separação (12%) e empilhamento (4%) suficientes para a formação de 2-3 géis de cada tipo (BONIFACINO *et al*., 2004).

Reagente	Gel	
	Separação (μL)	**Empilhamento (μL)**
30% acrilamida/bis (37,5:1)	6.000	1.300
H_2O	5.025	6.100
Tris-HCl 1,5 mol L^{-1} (pH 8,8)	3.750	–
Tris-HCl 0,5 mol L^{-1} (pH 6,8)	–	2.500
SDS	150	100
$(NH_4)_2S_2O_8$ 10% (m/v)	100	50
Solução comercial TEMED	15	10

Considerando-se que a polimerização do gel ocorre a partir da adição de $(NH_4)_2S_2O_8$ 10% (m/v) e TEMED, esta só pode ser feita momentos antes da montagem do gel. Também, deve-se adicionar etanol logo após a adição do gel de separação, a fim de que o O_2 do ar não interfira no processo de polimerização. Após a formação do gel de separação, a solução precursora do gel de empilhamento foi colocada sobre aquele e, em seguida, um pente com 10 poços que somente é retirado após a total polimerização (HAMES & RICKWOOD, 1990; BONIFACINO *et al*., 2004; OKAJIMA *et al*., 1993).

Para permitir a migração das proteínas, utilizou-se uma cuba eletroforética (MiniPROTEAN® Tetra Cell – BioRad), na qual foi adicionado o tampão de corrida. As amostras contendo proteínas foram preparadas em um tampão de amostra na razão 1:1 (em cada 20 μL deve haver entre 10-50 μg de proteínas), com agitação a 650 rpm, a 100 °C, durante 10min. Após esta etapa, foram usadas somente quando suas temperaturas equilibraram-se com a temperatura ambiente. Na Tabela 6 é apresentada a composição desses tampões.

Tabela 6 – Composição do tampão de corrida e amostra.

Reagente	Tampão	
	Corrida (V_{final} = 2 L)	**Volume de amostra (μL)**
Trizma Base®	6 g	–
Gly	28,8 g	–
SDS	2 g	–
Tris-HCl 0,5 mol L^{-1} (pH 6,8)	–	1.000
Glicerol	–	1.600
SDS 10% (m/v)	–	1.600*
azul de bromofenol 0,5% (m/v)	–	400
2-mercaptoetanol	–	400**

* Substituir o volume por H_2O em experimentos nos quais não há interesse na desnaturação das proteínas.
** Substituir o volume por H_2O em experimentos nos quais não há interesse na redução das proteínas.

Nessa técnica, é necessário utilizar um padrão de massa molecular. Assim, em cada gel foram adicionados 3 μL de padrão de massa molecular (SigmaMarker™ ou Precision Plus Protein™ Kaleidoscope Standards) e nos demais poços foram adicionados 20 μL das soluções de amostra, devidamente preparadas. Por fim, para promover a migração das proteínas, utilizou-se uma fonte (Power PAC™ HC – BioRad) para manter o potencial constante em 100 V, com variação da corrente ao longo do tempo. Em média, a corrida da amostra pelo gel, que permitiu um bom espaçamento entre as bandas, foi de 1h 30min (HAMES & RICKWOOD, 1990; BONIFACINO *et al*., 2004; OKAJIMA *et al*., 1993).

3.3.1 Revelação do SDS-PAGE

Após a migração, os géis foram colocados em recipientes para serem revelados, sendo que duas metodologias para este fim foram utilizadas: coloração com corante Azul de Coomassie e $AgNO_3$. Em ambas as técnicas, houve a necessidade de se utilizar mesa de agitação (KIA® MS 3 digital) para garantir que a coração/descoração fosse homogênea.

3.3.1.1 Azul de Coomassie

Primeiramente, o gel foi submetido a um volume de solução de fixação (t = 15 min) suficiente para o cobrir. Em seguida, procedeu-se da mesma maneira com um volume de solução corante (*overnight*) e, posteriormente, à solução descorante até que fosse observado o aparecimento das bandas de proteínas previamente separadas (BONIFACINO *et al*., 2004). Na Tabela 7 é apresentada a composição de cada solução.

Tabela 7 – Composição da solução fixadora, corante e descorante para revelação de bandas em gel por meio do método azul de Coomassie (BONIFACINO *et al*., 2004).

Reagente	**Solução**		
	Fixadora (%)	**Corante (%)**	**Descorante (%)**
metanol (v/v)	45	25	10
acido acético (v/v)	10	5	5
azul de Coomassie (m/v)	–	0,1 %	–

3.3.1.2 $AgNO_3$

Neste tipo de revelação, são necessárias diversas etapas de lavagem e enxague com água, sendo que o volume utilizado de cada solução foi suficiente para cobrir o gel a ser revelado.

Primeiramente, o gel foi submetido a uma solução de fixação (t = 10 min), lavado duas vezes (t = 5 min), adicionou-se solução de $Na_2S_2O_3$ 0,02 % (t = 1 min), lavado duas vezes (t = 20 s), adicionada solução de $AgNO_3$ 0,1 % (t = 10min), enxaguado uma vez e, também, com um pequeno volume da solução de revelação. Por fim, esta foi adicionada e mantida em contato com o gel até o aparecimento das bandas de proteínas. E, com o objetivo de se evitar o progresso da revelação, procedeu-se a adição de ácido cítrico 2,3 mol L^{-1} (t = 10min), com duas lavagens (t =

10 min e 30 min cada). Na Tabela 8 é apresentada a composição de cada solução (UNIVERSITY OF IOWA CARVER COLLEGE OF MEDICINE, 2013).

Tabela 8 – Composição das soluções para revelação de SDS-PAGE (UNIVERSITY OF IOWA CARVER COLLEGE OF MEDICINE, 2013).

Reagente	Solução			
	Fixadora (%)	Corante (%)	Revelação (%)	Bloqueadora (mol L^{-1})
metanol (v/v)	40	–	–	–
formalina (v/v)	13,5	–	0,05	—
$Na_2S_2O_3$	–	0,02	0,000016	–
$AgNO_3$	–	0,1	–	–
$NaCO_3$	–	–	3	–
acido cítrico	–	–	–	2,3

3.4 Purificação de anticorpos em coluna de afinidade e por pI

3.4.1 Purificação em colunas de afinidade

A purificação dos anticorpos (IgGh, anti-IgGh (H+L) e anti-IgGh (Fab_2)) em coluna de afinidade foi realizada em três diferentes colunas que continham proteínas A, G ou uma mistura de A e G imobilizadas (NAb™ Spin Kits, 0.2 mL for Antibody Purification – Thermo SCIENTIFIC), que poderão ser referidas como coluna A, G ou A/G, respectivamente.

A capacidade de volume de amostra é de 25-500 μL e a quantidade de anticorpos que podem ser imobilizados é ≥ 7 mg; 2,2-3,0 mg e ≥ 1,4 mg de IgG por coluna A, G e A/G, nesta ordem.

Primeiramente, as colunas foram centrifugadas (modelo 5804-R – Eppendorf) a 5.000 X g, a 25 °C, durante 1 min para retirar a solução de estocagem. Em

seguida, a coluna foi equilibrada com 400 μL de tampão de ligação (do inglês, *Binding Buffer* – BB), sob agitação suave, e foi feita centrifugação nas mesmas condições, descartando-se a solução eluída. Adicionou-se volume que continha 200 μg de anticorpo e foi realizada uma incubação a 650 rpm, a 25 ºC, durante 10 min em agitador (Thermomixer Comfort – Eppendorf). Após este período, foram feitas 4 lavagens (centrifugação nas mesmas condições), utilizando-se 400 μL tampão de ligação e coletadas as porções eluídas. Já a retirada dos anticorpos ligados às proteínas imobilizadas nas colunas foi feita por meio de 3 lavagens com tampão de eluição (do inglês, *Elution Buffer* – EB), cujas porções foram coletadas em tubos contendo 40 μL de tampão de neutralização cada. Posteriormente, utilizou-se a técnica SDS-PAGE para avaliar a eficiência da purificação dos anticorpos em colunas de afinidade.

3.4.2 Purificação por pI

Esta metodologia de separação foi aplicada à IgGh e, posteriormente, à BSA.

Uma solução estoque de tampão de amostra foi preparada, adaptando-se o procedimento do protocolo do equipamento Agilent 3100 OFFGEL Fractionator, sem causar a desnaturação e redução das proteínas. Esta solução foi preparada por meio da adição de 6 mL de solução de glicerol, 600 μL tampão OFFGEL e volume completado com água até 50 mL, que foi estocada em congelador.

A solução de reidratação das tiras contendo espécies que originaram um gradiente de pH (do inglês, *Immobilized pH Gradient – IPG*) foi preparada de acordo com a quantidade de poços utilizados na técnica, como segue na Tabela 9.

Tabela 9 – Composição da solução de reidratação das tiras IPG.

	24 poços (mL)	**12 poços (mL)**
Solução estoque OFFGEL	0,96	0,56
H_2O	0,24	0,14
Solução total	1,2	0,27

Na Tabela 10, segue a composição da solução de amostra. Nestes experimentos, todas as amostras foram previamente lavadas em coluna 30.000 MWCO para remover sais presentes na amostra.

Tabela 10 – Composição da solução de amostra.

	24 poços (mL)	**12 poços (mL)**
Solução estoque OFFGEL	2,88	1,44
H_2O	0,72	0,36

Inicialmente, foi retirada a película protetora da tira IPG (baixa ou alta resolução), em seguida, colocada na bandeja de corrida. Sobre a tira IPG, com cuidado, instalou-se a moldura dos poços (12 ou 24 poços). Adicionou-se em cada poço 40 µL de solução de reidratação, observando se a parte inferior de cada poço havia sido preenchida. Os eletrodos foram imersos nesta solução e colocados aos pares em cada extremidade da moldura, de modo a fazer o contato elétrico entre a solução e os polos. Esperou-se 15 minutos antes da adição de 150 µL da solução de amostra em cada poço.

Para evitar a evaporação da solução durante a separação das proteínas, devido o aquecimento do sistema, utilizou-se uma proteção seladora sobre os poços e, também, aplicou-se 10 µL de água em cada eletrodo.

Nos limites da bandeja, foram adicionados volumes de óleo mineral. Para separação utilizando-se 12 poços, inicialmente, adicionou-se 200 µL de óleo mineral no final do ânodo e 1 mL no final do cátodo. Após 1 minuto, adicionou-se 200 µL em ambos. Para separação envolvendo 24 poços, primeiramente, adicionou-se 200 µL

no final do ânodo e 400 µL no cátodo. Após 1 minuto, adicionou-se 200 µL em cada extremidade e depois de 3 minutos foram adicionados 200 µL apenas no ânodo. Foram instalados os eletrodos fixo no ânodo e o móvel no cátodo, observando se o contato entre os eletrodos fixo e móvel, com os eletrodos em contato com a tira IPG estava adequadamente ajustado.

Escolheu-se o método OG12PR01 para 12 poços e OG24PR01 para 24 poços. As características desse método consistem em: 1) durante a separação (máximo): aplicação de potencial por hora de 64 kVh, potencial de 4500 V, corrente de 50 µA e potência de 200 mW; 2) após separação (máximo): potencial de 500 V, corrente de 20 µA e potência de 50 mW.

Na Tabela 11, estão apresentadas as faixas de pH utilizadas, a resolução e a concentração de todas as proteínas submetidas a este procedimento.

Tabela 11 – Condições de concentração, pH e resolução para separação de BSA e IgGh.

Proteína	**Concentração (mg mL^{-1})**	**Faixa de pH**	**Resolução**
BSA	1,38	3-10	baixa
IgGh	7,20	3-10	alta

Após a separação dessas proteínas, foi feita uma análise qualitativa e quantitativa de cada poço por meio do equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer, que é equivale à técnica SDS-PAGE, porém a análise ocorre em microescala em um chip.

Inicialmente, são preparadas soluções estoques do gel corante e gel descorante. A seguir, são descritas as etapas de preparo de soluções e do chip para análise no equipamento.

As soluções estoque foram preparadas a partir do kit Protein 230. A solução do gel corante de proteínas foi preparada a partir da adição de 25 µL de solução

concentrada de corante ao gel matriz. Este foi agitado por meio de um agitador de tubos (Vortex AP 56 – Phoenix) durante 15 s. Em seguida, transferido para um filtro de centrífuga e submetido a 2.500 X g, a 25 °C, durante 15 min (modelo 5804 R – Eppendorf).

A solução de gel descorante foi produzida a partir de 650 µL do gel matriz. Esta alíquota foi adicionada em um filtro de centrífuga e este submetido a 2.500 X g, a 25 °C, durante 15 min.

O preparo da solução de desnaturação foi adaptado em relação ao protocolo do kit, pois havia interesse em submeter às proteínas a um meio desnaturante, mas não redutor. Desta maneira, adicionou-se 7 µL de água ao tampão de amostra, ao invés de β-mercaptoetanol, agitando este durante 5 s em agitador de tubos.

O preparo da amostra envolveu o uso de 4 µL de solução de cada poço submetido ao processo de separação, com adição de 2 µL de solução desnaturante em um tubo de 2 mL. Em outro tubo, adicionou-se 6 µL de solução de padrão de massa molecular (14-230 kDa). Os tubos contendo a amostra em meio de tampão, bem como a solução de padrão de massa molecular, foram aquecidos a 100 °C/5 min em agitador Thermomixer Comfort (Eppendorf). Após este período, foram centrifugadas durante 15 s e, em seguida, acrescentou-se 84 µL de água em cada tubo.

Aos chips de análise foram adicionados 12 µL de solução gel corante. Esta foi forçada a entrar nos canais do chip por meio da inserção de 1 mL de ar, utilizando-se uma seringa. Após 60 s sob pressão, a solução residual foi retirada por meio de uma pipeta. Em seguida, foram adicionados 12 µL de solução gel corante em quatro poços e a solução gel descorante em apenas um. Em dez poços foram colocadas as

amostras e em um poço a solução de padrão de massa molecular. A seguir, na Figura 15 demonstra-se o procedimento de preparo do chip.

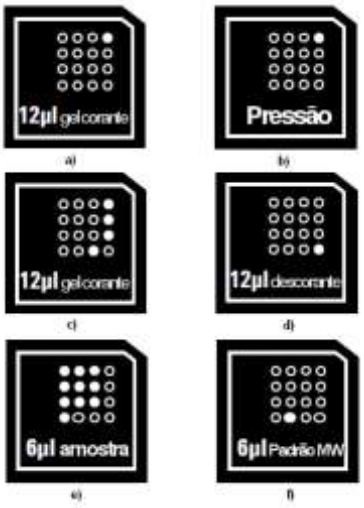

Figura 15 – Esquema do preparo do chip para análise. a) adição de gel corante; b) pressão exercida para entrada da solução nos canais do chip; c) adição de gel corante; d) adição de solução descorante; e) adição das amostras; f) adição de solução de padrão de massa molecular (Adaptado de INTERCHIM, 2012).

Antes de se iniciar a análise do chip, deve-se realizar um processo de limpeza dos eletrodos a partir de sua imersão em 300 µL água DEPC, que foram adicionados em um molde do chip durante 1 min. Na sequência, o chip previamente preparado foi ser analisado.

3.5 Avaliação da eficiência do processo de fragmentação de anticorpos

Para se obter fragmentos de anticorpos (F(ab)'), foram utilizadas duas técnicas: fragmentação por meio do uso de papaína em solução (BONIFACIO *et al*., 2004) ou papaína imobilizada (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC., 2009).

Neste caso, utilizou-se IgGh como anticorpo para o estudo da avaliação da eficiência do processo de fragmentação.

3.5.1 Papaína não imobilizada

Neste experimento, foram preparados tampões e soluções (estocados a T = 4 °C) conforme a Tabela 12.

Tabela 12 – Composição dos tampões e soluções utilizados no processo de fragmentação de IgGh por meio de papaína não imobilizada (BONIFACINO *et al*., 2004).

Reagente	Tampões				
	PBS (mmol L^{-1})[a]	**Digestão em PBS (mol L^{-1})[b]**	**Ligação (mmol L^{-1})[c]**	**Eluição (mol L^{-1})[d]**	**Neutralização (mol L^{-1})[e]**
NaH_2PO_4	1,9	–	20	–	–
Na_2HPO_4	8,1	–	20	–	–
NaCl	154	–	–	–	–
EDTA	–	0,02	–	–	–
Cys	–	0,02	–	–	–
Gly-HCl	–	–	–	0,1	–
Tris-HCl	–	–	–	–	1,0
Reagente	**Soluções**				
		IgGh em PBS (mg L^{-1})	**P01 em PBS (mg mL^{-1})**	**P002 em PBS (mg mL^{-1})**	
IgGh		2,0	–	–	
Papaína		–	0,1	0,02	

a = pH 8,00 ajustado com NaOH 2 mol L^{-1}.
b = usar em t < 10 h e estocagem em gelo.
c = pH 7,00.
d = pH 2,7 ajustado com HCl 1 mol L^{-1}.
e = pH 9,00 ajustado com NaOH 1 mol L^{-1}.

3.5.1.1 Geração de fragmentos

Para realizar a fragmentação de IgGh, foram pipetados 100 μL de IgGh 2 mg mL^{-1} em cada microtubo (8 unidades para cada grupo de experimento) e variou-se a concentração de protease (0,1 ou 0,02 mg mL^{-1}). Também, foi feito um grupo controle (GC), isto é, sem papaína, cuja composição era IgGh e tampão de digestão.

Portanto, foram feitos 3 grupos de experimentos: GC, IgGh submetidas à ação da papaína 0,1 mg mL^{-1} (G01) e à papaína 0,02 mg mL^{-1} (G002). Sendo que, o processo de fragmentação foi interrompido após 1, 2, 4, 6, 12, 18, 24 a 48 h, com adição de 20 μL de solução de iodoacetamida 0,3 mol L^{-1}. Por fim, a papaína inativada (23.406 Da) foi retirada da solução por meio de coluna 30 MWCO centrifugada a 8.000 X g, a 4 °C, durante 15 min.

3.5.1.2 Purificação dos fragmentos F(ab)' em coluna de afinidade

A fim de se separar os fragmentos gerados, foi utilizada uma coluna contendo proteína A.

A descrição das etapas envolvidas nesse processo foi previamente descrita no item 3.4.1. Neste caso, as frações geradas pela passagem do tampão de ligação foram utilizadas neste estudo.

3.5.2 Papaína imobilizada

Neste experimento, foi utilizado um kit de fragmentação de imunoglobulinas, sendo que todos os tampões e colunas foram estocados a 4 °C.

3.5.2.1 Equilíbrio/ativação da papaína

Uma das etapas do processo de fragmentação envolve a ativação da papaína. Para isto, 250 μL da solução de enzima imobilizada foi adicionada em uma coluna de rotação (capacidade para 800μL), submetida à centrifugação de 5.000 X g, a 25 °C, durante 1 min para remoção do tampão. Em seguida, foram adicionados 500 μL de tampão de digestão, centrifugando-se e descartando-se o filtrado.

3.5.2.2 Preparo da amostra de IgGh

Nesta etapa, utilizou-se uma coluna de dessalinização. Primeiramente, esta foi centrifugada a 1.000 X g, a 25 °C, durante 2 min para retirada do tampão presente na coluna. Em seguida, adicionou-se 1 mL de tampão digestão na coluna, centrifugando-se novamente. Esta etapa foi repetida 3 vezes, descartando-se o filtrado. A esta coluna, foram adicionados 500 μL de IgGh (concentrações variaram entre 1,5 mg mL^{-1} até 8,0 mg mL^{-1}, de acordo com a quantidade de fragmentos desejados, visto que o rendimento de fragmentação é de 50 a 65%). Foi feita novamente centrifugação e a IgGh foi coletada no filtrado.

3.5.2.3 Geração de fragmentos

A coluna contendo papaína imobilizada comporta até 500 μL de solução de anticorpos. O tempo de incubação depende da concentração de IgG e da espécie que gerou/produziu este anticorpo. A Tabela 13 apresenta os respectivos tempos de incubação.

Tabela 13 – Tempo de digestão recomendado para diversas espécies e concentrações de IgG.

Espécie	IgG (mg mL^{-1})	Tempo de digestão (h)
Coelho	8	8-9
	4	6-7
	1,5	4-5
	0,5	3-4
Humano	8	5-6
	4	5-6
	1,5	3-4
	0,5	2-3
Camundongo	8	4-5
	4	3-4
	1,5	2-3
	0,5	2-3

Após o tempo de digestão, centrifugou-se a solução a 5.000 X g, a 25 °C, durante 1 min, coletando-se o filtrado contendo IgGh não fragmentada, bem como os fragmentos F(ab)' e Fc gerados para serem analisados por meio de SDS-PAGE. Por fim, a coluna foi lavada com 500 μL de PBS por meio de centrifugação, de acordo com o protocolo estabelecido.

3.5.2.4 Reutilização de papaína imobilizada

Neste estudo, foram utilizadas soluções contendo papaína imobilizada empregadas em fragmentações anteriores, bem como um controle envolvendo papaína imobilizada não utilizada previamente. Para isto, a concentração de IgGh adicionada a cada coluna contendo papaína imobilizada (previamente utilizada ou não) foi de 7,2 mg mL^{-1}, que foi submetida à agitação a 650 rpm, a 37 °C, durante 5 h (Thermomixer Comfort – Eppendorf).

A avaliação do rendimento do processo de fragmentação de IgGh foi feita em SDS-PAGE em meio desnaturante e não redutor. O procedimento de formação dos géis (gel de empacotamento e separação), preparo dos tampões (tampão de corrida e amostra) e soluções de revelação do gel foram apresentados em relatório anterior.

3.6 Nanopartículas (NP)

Nestes estudos foram sintetizadas NP de ouro (NP-Au), objetivando-se a formação de nanobastões de ouro (NB-Au).

3.6.1 Variação da preparação de nanocubos de Au (NC-Au) para obtenção de NB-Au

O preparo de NC-Au é realizado a partir de duas soluções: semente e crescimento.

3.6.1.1 Preparo de solução semente

Em um erlenmeyer foram misturados, sob constante agitação, 18,75 mL de CTAB 0,10 mol L^{-1} com 6,2 mL de $HAuCl_4$ 1,0 mmol L^{-1}. Em seguida, adicionou-se 150 μL de $NaBH_4$ 0,10 mol L^{-1} (preparado recentemente e mantido em gelo durante 10 min antes do seu uso). Após 2 min de agitação, a solução foi mantida sob repouso durante 4h e estocada a 4 °C (SUN *et al*., 2008).

3.6.1.2 Preparo de solução de crescimento

A fim de se gerar NB-Au, a partir da adaptação do preparo de NC-Au, em um erlenmeyer foram misturados 20 mL de CTAB 0,020 mol L^{-1} com 5,0 mL de $HAuCl_4$ (1,5; 2,0; 2,4; 2,5 ou 3,0 mmol L^{-1}). No caso dos NC-Au, seu preparo utilizou $[Au^{3+}]$ = 2,0 mmol L^{-1} e 50 μL de $CuSO_4$ 10 mmol L^{-1}, sendo que para a formação dos NB-Au, não foi adicionado Cu^{2+}. Posteriormente, adicionou-se 3 mL ácido ascórbico 0,10 mol L^{-1} e, por fim, solução semente (2,5; 5,0 ou 10,0 µL), sendo que o sistema foi mantido sob agitação constante durante 15-30min e foi realizado a T = 25 °C (SUN *et al*., 2008).

A lavagem das NP-Au foi realizada em microcentrífuga a 7.200 X g, a 25 °C, durante 5 min (Mini Spin – Eppendorf) ou em centrífuga a 12.000 X g, a 25 °C, durante 5 min (Centrifuge 5804 R – Eppendorf), com retirada do sobrenadante, ressuspensão em água, sonicação por 10 min (Branson 2800 – Emerson Industrial Automation) e repetição destas etapas de 3-5 vezes.

3.7 Caracterização das NP-Au

3.7.1 Aquisição de espectro de extinção

Para caracterizar as NP-Au, utilizou-se um espectrofotômetro UV-Vis (UV-2550 – SHIMADZU) com variação do comprimento de onda incidente de 190 a 900 nm, com diluição 1:2 em água.

3.7.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens foram obtidas em um JEOL microscope (model FEG-SEM JSM 6330F), operado em 5 kV. Sendo que a amostra foi preparada a partir de 2 µL de solução de NP-Au sobre uma superfície (pastilha) de Si, com secagem a T = 30 °C *overnight* (adaptado de COSTA *et al*., 2011).

3.8 Avaliação do processo de adsorção de IgGh e de seu fragmento (F(ab)') por meio de microbalança de cristal de quartzo (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring – QCM-D)

Primeiramente, foi feita a limpeza do sensor de ouro utilizando-se 10 mL de solução piranha alcalina 5:1:1 (H_2O:NH_4OH 25%: H_2O_2 30%) aquecida a 70 °C. O sensor permaneceu imerso nessa solução durante 5 min. Em seguida, foi feito enxágue com água em um ultrassom. Após, secou-se a superfície com N_2 e o sensor foi imerso em solução de etanol e seco novamente.

Inicialmente, sobre o sensor foi passado tampão PBS com fluxo de 50 µL min^{-1} até estabilização da linha base. Depois, o sistema recebeu solução de IgGh 0,23 mg mL^{-1}, mesmo fluxo de passagem sobre o sensor e, posteriormente, PBS para remoção de material não quimissorvido.

O mesmo foi feito com uma solução contendo fragmentos F(ab)'. A concentração de IgGh utilizada no processo de digestão foi de 1,5 mg mL^{-1}. Os fragmentos gerados passaram por centrifugação a 12.000 X g, a 25 °C, durante 5 min em coluna 30 MWCO. A concentração dos fragmentos F(ab)' utilizada foi de 0,23 mg mL^{-1}.

3.9 Caracterização espectroscópica de biomoléculas

Para a caracterização espectroscópica de biomoléculas (Raman ou SERS), foi utilizado um Micro-Raman Renishaw in Via acoplado a lasers de He-Ne (632,8 nm) e de estado sólido (785 nm) e microscópio óptico Leica com objetiva 100x.

3.9.1 Espectroscopia Raman

Para aquisição do espectro dos anticorpos, um volume de 20 μL de solução de IgGh 160 mg mL^{-1} (solução original) ou anti-IgGh (H+L) 35 mg mL^{-1} (solução original) ou anti-IgGh (Fab_2') 35 mg mL^{-1} (solução lavada em coluna 50 MWCO) foi adicionado sobre uma lâmina de vidro limpa. No caso de fragmentos, o espectro Raman foi obtido por meio de um sólido de F(ab)' obtido por meio da clivagem de IgGh por papaína não mobilizada.

3.9.2 Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (do inglês, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy* – SERS)

Para aquisição do espectro SERS das biomoléculas foram utilizados as NP-Au obtidas sem adição de Cu^{2+} do preparo proposto por Sun e colaboradores. As NP-Au foram previamente lavadas, conforme descrito no item 3.6.1.2. O volume inicial de NP-Au foi concentrado em 3 vezes.

A cada volume de 150 μL de solução de NP-Au foram adicionados 150 μL de IgGh ou de fragmentos F(ab)' de IgGh e mantidos sob agitação a 650 rpm, a 4 °C, durante 4 h. Após, em uma lâmina de vidro limpa, foram adicionados 20 μL de cada

solução e feita a aquisição do espectro SERS nas condições de: 1% de potência do laser 632,8 nm e faixa de análise de 400 a 2000 cm^{-1}.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As etapas necessárias para a eventual proposta de construção de um imunossensor envolveram: 1) purificação de anticorpos por meio de colunas de afinidade contendo proteína A, G ou uma mistura de A e G e, também, por meio da separação pelo ponto isoelétrico; 2) definição de condições para o maior rendimento de fragmentos F(ab)' de IgGh por meio de papaína e comparação desse processo com aquele que utiliza papaína imobilizada; 3) preparação de NP-Au com superfícies SERS-ativas para a aquisição de espectros SERS de anticorpos/fragmentos F(ab)', bem como variação desse preparo a fim de se obter NB-Au que são partículas com características interessantes no processo de intensificação dos sinais Raman; 4) aquisição de espectros Raman para comparação com os espectros SERS, com a finalidade de se visualizar as mudanças que refletem a maneira como os anticorpos/fragmentos foram imobilizados sobre as superfícies SERS-ativas.

4.1 Identificação da massa molecular de anticorpos

As soluções de anticorpos adquiridos eram provenientes do soro do animal imunizado. Ao se quantificar tais soluções pelo método de Bradford, um erro pode ser inserido na análise, visto que há diversas proteínas em solução que respondem positivamente ao método e são quantificadas em conjunto com os anticorpos. Assim, surgiu a necessidade de se verificar a existência de outras proteínas que estão presentes nas soluções de anticorpos, bem como a massa molecular média dos anticorpos policlonais para utilizar esta informação no preparo de soluções com concentrações definidas. Pois, o conhecimento da composição da amostra de

anticorpos e a sua purificação são etapas importantes para posterior caracterização espectroscópica.

Para isto, foi utilizada a técnica MALDI-TOF-TOF. Nesta a amostra não pode conter altas concentrações de sais e, estando os anticorpos condicionados em tampão PBS, a lavagem em coluna de separação foi uma etapa essencial para garantir a eficiência da identificação das massas moleculares. Após a lavagem das amostras, foram coletados os seguintes volumes para análise: 40 μL de anti-IgGh Fab_2, 80 μL de anti-IgGh H+L e 10 μL de IgGh.

As Figuras 16, 17 e 18 correspondem aos gráficos da intensidade em função da relação m/z obtidas para cada amostra de anticorpo.

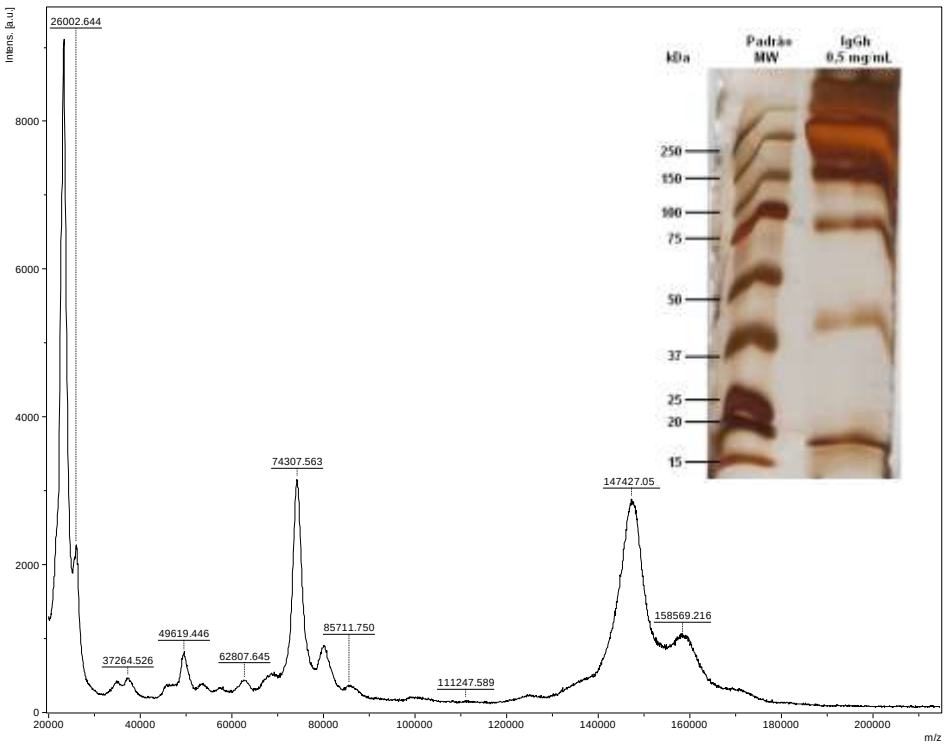

Figura 16 – Intensidade em função de m/z para a amostra contendo IgGh. Inserção corresponde à SDS-PAGE.

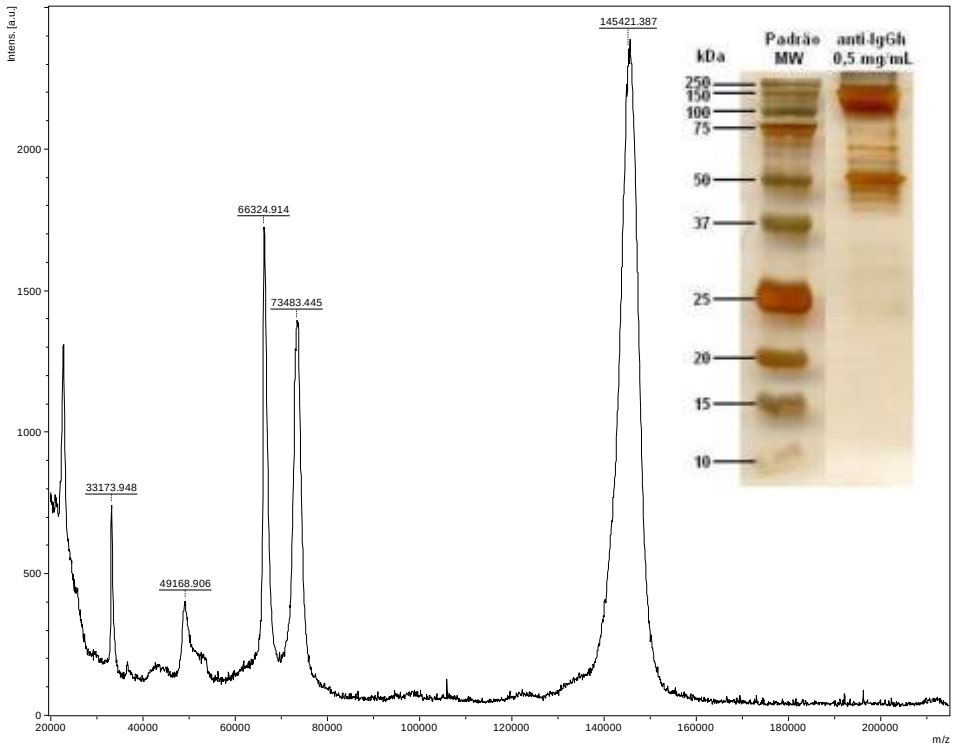

Figura 17 – Intensidade em função de m/z para a amostra contendo anti-IgGh (H+L). Inserção corresponde à SDS-PAGE.

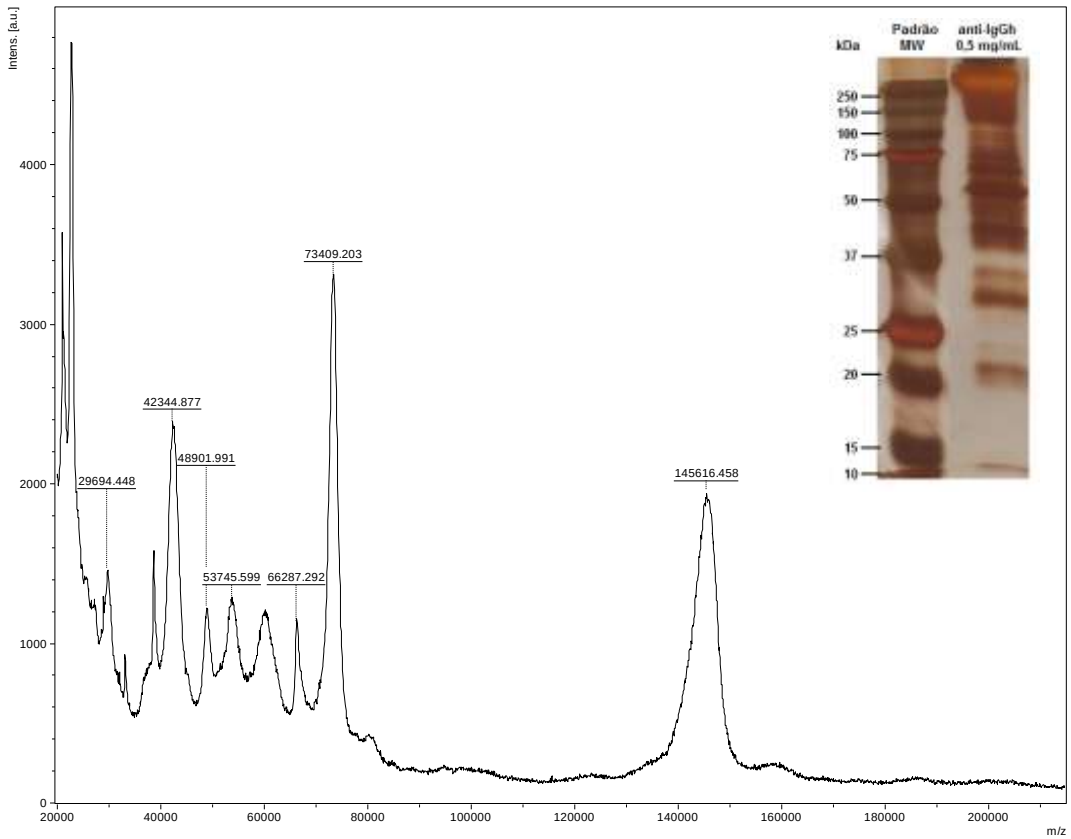

Figura 18 – Intensidade em função de m/z para a amostra contendo anti-IgGh Fab_2. Inserção corresponde à SDS-PAGE.

Todas as amostras (IgGh, anti-IgGh H+L e anti-IgGh Fab_2) são compostas por anticorpos policlonais. Portanto, a obtenção destes não foi realizada em células clonadas, o que permitiria uma menor variedade de composição no processo de produção (GIL *et al*., 1999). Observa-se também que as amostras apresentaram grande variedade de componentes, provavelmente proteínas presentes no soro humano (no caso da IgGh) ou no soro de cabra (no caso da anti-IgGh (H+L) e anti-IgGh (Fab_2)). Nas inserções das Figuras 16, 17 e 18 é possível perceber a composição heterogênea da amostra por meio da técnica SDS-PAGE.

No soro humano, as principais proteínas que estão presentes juntamente com as IgG são albumina (66,437 kDa) e transferrina (78-80 kDa), correspondendo, portanto, aos principais contaminantes. Na Figura 16 duas razões m/z destacam-se, sendo seus valores 26.003 e 74.308. Possivelmente, a proteína com massa molecular em torno de 26 kDa corresponde ao excesso de cadeia leve que é produzida naturalmente pelo organismo humano durante a anticorpogênese. Já a proteína com massa molecular em torno de 74 kDa pode ser a transferrina (FERRI, *et al*., 1977; PRASANNA *et al*., 2015).

A existência de outras proteínas na etapa de imobilização poderia afetar, não somente a caracterização dos anticorpos ou de seus fragmentos por meio da técnica SERS, mas também essas proteínas poderiam tornar-se sítios de interações não específicas na eventual construção de um imunossensor. Além do que, a existência de outras proteínas no meio reacional para clivagem dos anticorpos pela protease papaína poderia gerar diversos fragmentos inespecíficos e que, dificilmente, seriam separados por meio de uma coluna de afinidade, por exemplo.

Assim, para a um estudo das interações Ab-Ag, por exemplo, a purificação dos anticorpos é um fator relevante que poderia minimizar ligações inespecíficas

e/ou uma caracterização espectroscópica equivocada dos anticorpos ou de seus fragmentos.

4.2 Purificação de anticorpos em coluna de afinidade e por pI

Tendo em vista que as soluções de anticorpos utilizadas nesses experimentos eram provenientes de soros, experimentos de purificação foram realizados para avaliar a possibilidade de purificação das soluções, a fim de se minimizar a quantidade de proteínas presentes nas amostras para aplicação em estudos espectroscópicos. Dentre as possibilidades, optou-se por separar os anticorpos por: interação com proteínas A, G ou uma mistura de A e G imobilizadas em coluna e pelo ponto isoelétrico (pI).

4.2.1 Purificação em colunas de afinidade

No processo de purificação dos anticorpos por meio de uma coluna por afinidade, a porção Fc dos anticorpos interage com as proteínas A, G ou uma mistura de A e G imobilizadas na coluna (PRASANNA *et al*., 2015). Sabe-se que tanto a proteína A quanto a proteína G tem capacidade de se ligar especificamente à porção Fc de espécies de IgG e subclasses destas. No entanto, tal capacidade varia de acordo com a espécie de animal que deu origem aos anticorpos. Segundo o protocolo das diferentes colunas de afinidade para anticorpos, a proteína A geralmente tem maior afinidade por IgG provenientes de coelhos, porcos, cachorros e gatos. Já a proteína G apresenta capacidade de ligação com uma gama de subclasses de IgGh humana e de camundongo (IgG_1, IgG_2, etc.). E, por fim, uma

combinação entre proteínas A e G, leva a melhores resultados de separação/purificação de IgG de subclasses de coelhos, camundongos, humanos e outros mamíferos. Portanto, é necessária a avaliação da eficiência de cada uma das colunas contendo proteína imobilizada para escolha daquela que permitirá uma melhor purificação dos anticorpos de interesse.

Segundo a literatura, os sítios de ligação entre anticorpos e proteína A ocorrem na segunda e terceira regiões da cadeia pesada por meio de interações hidrofóbicas. Já a proteína G além de ligar-se com determinados anticorpos, também possui um sítio para ligação de albumina (HARLOW & LANE, 1988).

As soluções eluídas das colunas contendo proteína imobilizada A, G ou uma mistura de A e G, correspondentes às lavagens com tampão de ligação e tampão de eluição foram analisadas por meio de SDS-PAGE e os resultados estão apresentados nas Figuras 19, 20 e 21 para IgGh; 22, 23 e 24 para anti-IgGh (H+L); e 27, 28 e 29 para anti-IgGh (Fab_2).

4.2.1.1 Purificação de IgGh

Idealmente, considerando-se a capacidade de interação entre os anticorpos e as proteínas (A, G ou uma mistura de A e G) imobilizadas em coluna, presumia-se que os anticorpos ficariam retidos durante a passagem do tampão de ligação (BB) e que demais proteínas presentes em solução fossem eluídas nas primeiras etapas de passagem desse tampão. Também, previa-se que na etapa seguinte, isto é, com a passagem do tampão de eluição (EB), as primeiras eluições fossem concentradas com os anticorpos previamente imobilizados.

A seguir, são apresentados os resultados para a purificação de IgGh.

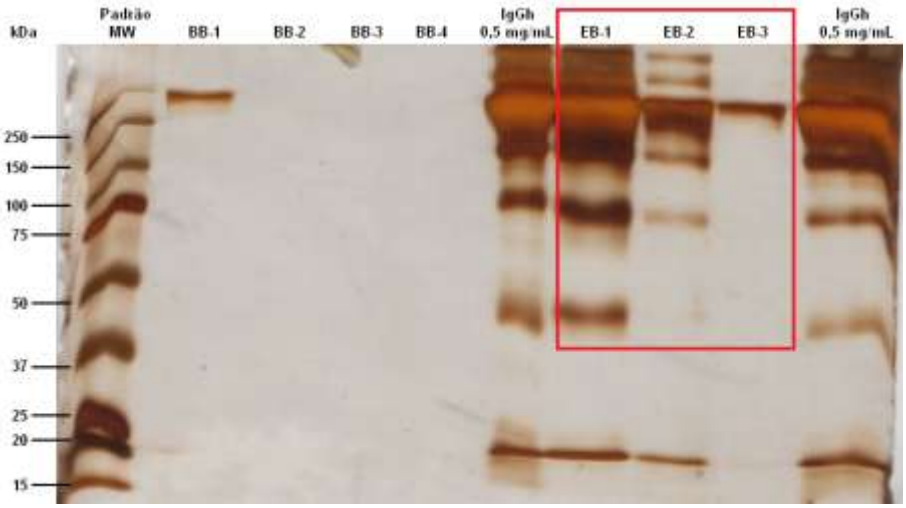

Figura 19 – SDS-PAGE de proteínas presentes em tampão de ligação (BB) e tampão de eluição (EB) eluídas de uma coluna contendo proteína A imobilizada para purificação de IgGh.

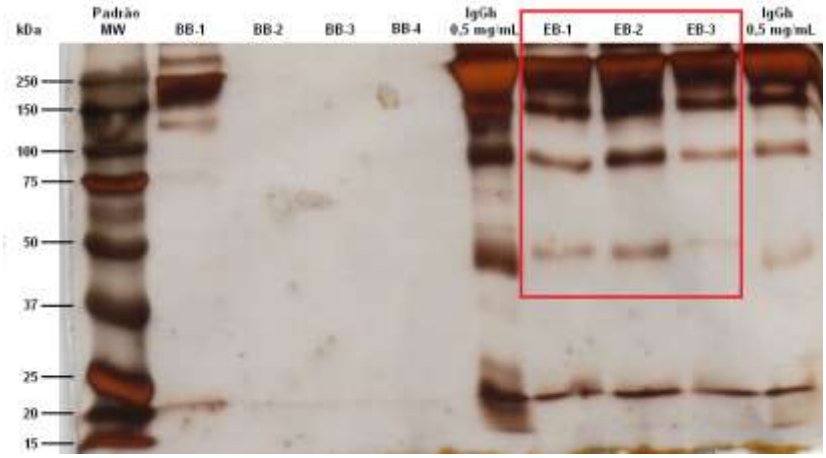

Figura 20 – SDS-PAGE de proteínas presentes em tampão de ligação (BB) e tampão de eluição (EB) eluídas de uma coluna contendo proteína G imobilizada para purificação de IgGh.

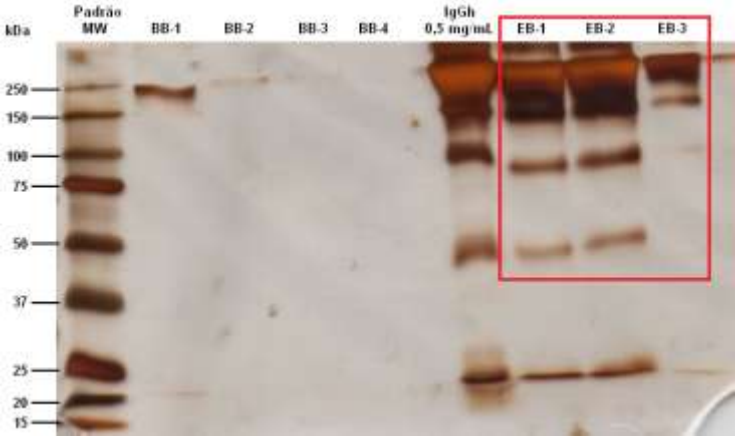

Figura 21 – SDS-PAGE de proteínas presentes em tampão de ligação (BB) e tampão de eluição (EB) eluídas de uma coluna contendo uma mistura de proteína A e G imobilizada para purificação de IgGh.

Observando-se os resultados para purificação de IgGh, utilizando-se tampão de eluição (destacados em vermelho), conclui-se que a coluna que permite uma melhor retenção dos anticorpos corresponde à coluna contendo proteína A imobilizada, pois interage de maneira mais eficiente com estes, visto que na passagem do tampão de ligação (BB-1) não eluiu tantos anticorpos, concentrando-os na coluna por meio da interação da porção Fc da IgGh com a proteína imobilizada.

No caso da coluna contendo proteína G imobilizada, na etapa de eluição com tampão de ligação (BB-1) uma quantidade significativa de anticorpos é perdida no processo de lavagem e, portanto, não interagem de maneira específica com as proteínas imobilizadas na coluna.

Já no caso da coluna contendo uma mistura de proteína A e G imobilizada, um resultado de interação anticorpo-coluna semelhante é observado. Porém, durante a passagem do tampão de ligação (BB-1 a BB-4) ocorrem perdas de anticorpos que não interagiram de maneira eficiente com a coluna A/G.

Para todos os casos, a purificação não se mostrou eficiente pelo fato de haver diversas proteínas que são eluídas da coluna, juntamente com os anticorpos de interesse, indicando que aquelas também têm afinidade pelas proteínas imobilizadas.

Por isso, a coluna contendo proteína A imobilizada foi utilizada somente na etapa de retenção de anticorpos não fragmentados e porção Fc, que é gerada no processo de fragmentação de anticorpos por ação de proteases, para permitir a eluição dos fragmentos F(ab)’ por meio do tampão de ligação (BB).

4.2.1.2 Purificação de anti-IgGh (H+L)

Assim como era esperado para o processo de purificação de IgGh, presumia-se que os anticorpos ficariam retidos durante a passagem do tampão de ligação (BB) e que demais proteínas presentes em solução fossem eluídas nas primeiras etapas de passagem desse tampão. Também, previa-se que na etapa seguinte, isto é, com a passagem do tampão de eluição (EB), as primeiras eluições fossem concentradas com os anticorpos previamente imobilizados.

A seguir, são apresentados os resultados para a purificação de anti-IgGh (H+L).

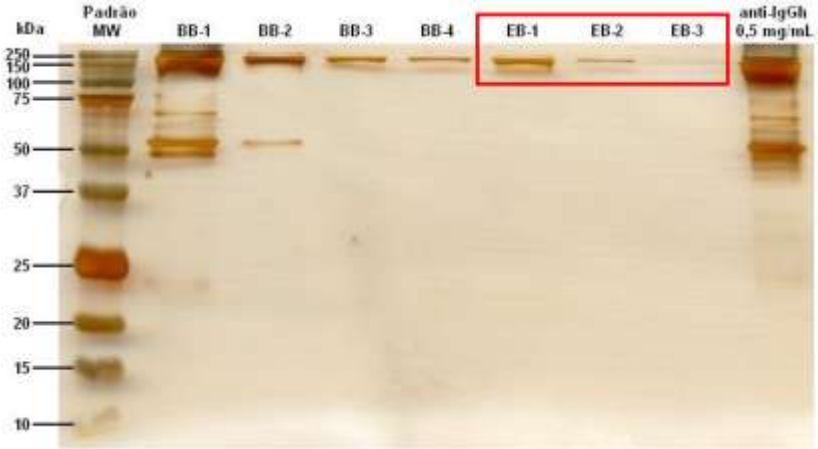

Figura 22 – SDS-PAGE de proteínas presentes em tampão de ligação (BB) e tampão de eluição (EB) eluídas de uma coluna contendo proteína A imobilizada para purificação de anti-IgGh (H+L).

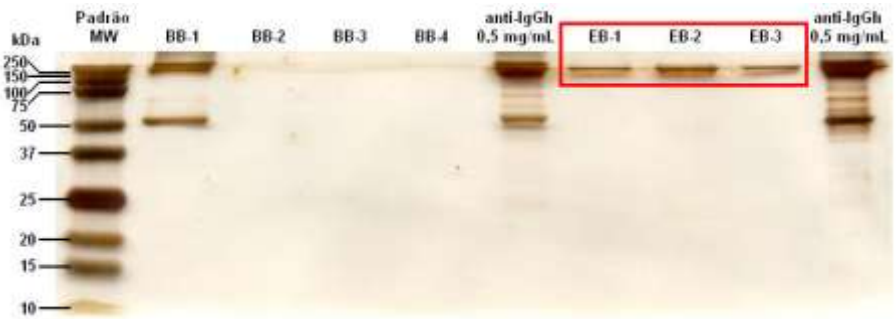

Figura 23 – SDS-PAGE de proteínas presentes em tampão de ligação (BB) e tampão de eluição (EB) eluídas de uma coluna contendo proteína G imobilizada para purificação de anti-IgGh (H+L).

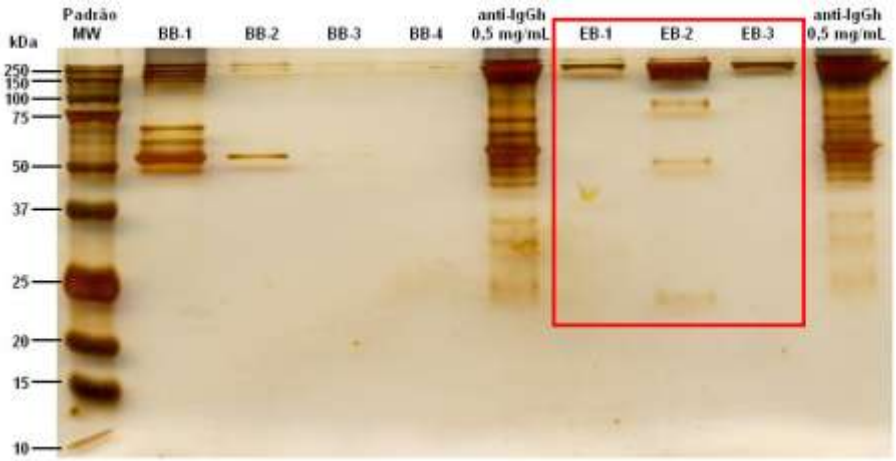

Figura 24 – SDS-PAGE de proteínas presentes em tampão de ligação (BB) e tampão de eluição (EB) eluídas de uma coluna contendo uma mistura de proteína A e G imobilizada para purificação de anti-IgGh (H+L).

Observando-se os resultados para purificação de anti-IgGh (H+L), utilizando-se tampão de eluição (destacadas em vermelho), conclui-se que a coluna que permite uma melhor separação corresponde à coluna contendo proteína G, pois interage de maneira mais eficiente com os anticorpos, visto que na passagem do tampão de ligação (BB-1) não eluiu tantos anticorpos, concentrando-os na coluna por meio da interação da porção Fc da anti-IgGh (H+L) e a proteína imobilizada.

No caso da proteína A, em todas as etapas de eluição com tampão de ligação (BB-1 a BB-4) anticorpos são perdidos no processo de lavagem. Portanto, não interagem de maneira específica com as proteínas da coluna.

O procedimento foi repetido para a anti-IgGh (H+L), utilizando-se apenas a coluna contendo proteína G imobilizada. As Figuras 25 e 26 correspondem ao resultado de SDS-PAGE das lavagens com tampão de ligação (BB) e tampão de eluição (EB), respectivamente.

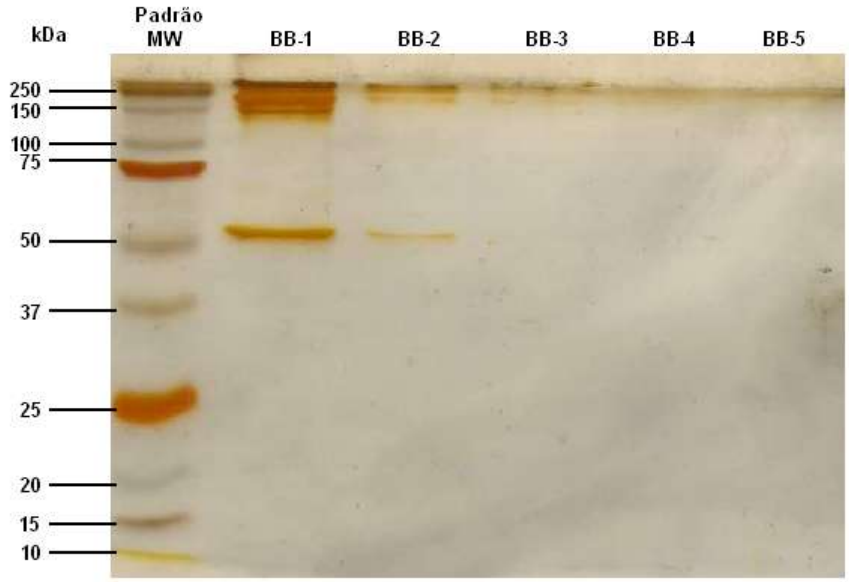

Figura 25 – SDS-PAGE de proteínas presentes em tampão de ligação (BB) eluída de uma coluna contendo proteína G imobilizada para purificação de anti-IgGh (H+L), após avaliação da eficiência das diferentes colunas disponíveis (proteína A, G ou uma mistura de A e G imobilizadas).

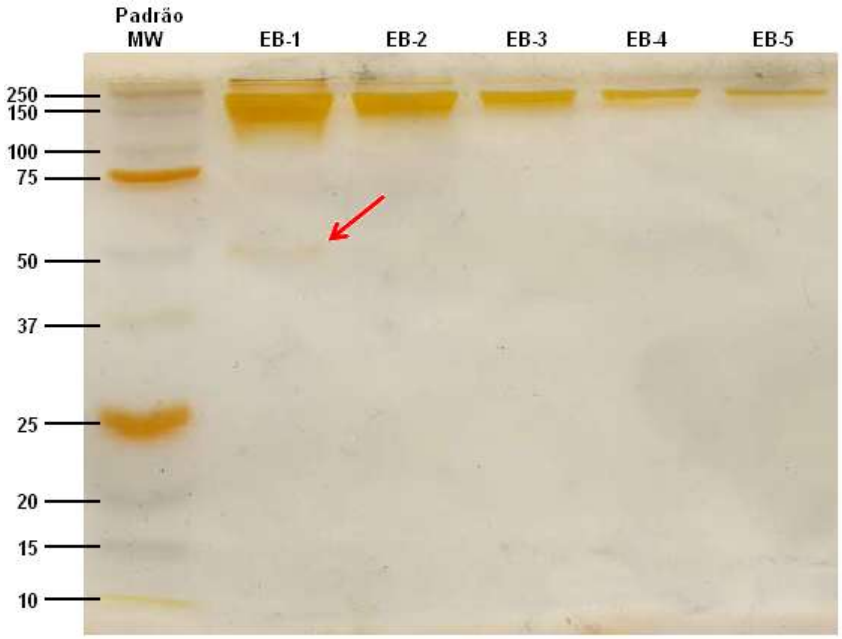

Figura 26 – SDS-PAGE de proteínas presentes em tampão de eluição (EB) eluída de uma coluna contendo proteína G imobilizada para purificação de anti-IgGh H+L, após avaliação da eficiência das diferentes colunas disponíveis (proteína A, G ou uma mistura de A e G imobilizadas).

Pela Figura 26, é possível concluir que a capacidade da separação utilizando-se proteína G imobilizada não é reprodutível, visto que um fragmento de

aproximadamente 50 kDa é encontrado na fração EB-1 (seta vermelha), sendo que esta é a porção que contém a maior quantidade de anti-IgGh (H+L).

Assim, embora a coluna contendo proteína G tenha apresentado um bom resultado no processo de purificação de anticorpos, restaram em solução algumas proteínas que poderiam comprometer a caracterização de anticorpos, que seriam considerados como purificados. Pelo fato da técnica SERS poder detectar uma pequena quantidade de moléculas quando ocorre a formação das chamadas regiões de *hot spots*, impurezas como essas proteínas poderiam ser detectadas (COSTA *et al.*, 2009). Desta forma, a presença de outras proteínas na amostra, além dos anticorpos, dificultaria a interpretação dos espectros SERS.

4.2.1.3 Purificação de anti-IgGh (Fab_2)

Por fim, assim como era esperado para o processo de purificação de IgGh e de anti-IgGh (H+L), presumia-se que os anticorpos ficariam retidos durante a passagem do tampão de ligação (BB) e que demais proteínas presentes em solução fossem eluídas nas primeiras etapas de passagem desse tampão. Também, previa-se que na etapa seguinte, isto é, com a passagem do tampão de eluição (EB), as primeiras eluições fossem concentradas com os anticorpos previamente imobilizados.

A seguir, são apresentados os resultados para a purificação de anti-IgGh (Fab_2).

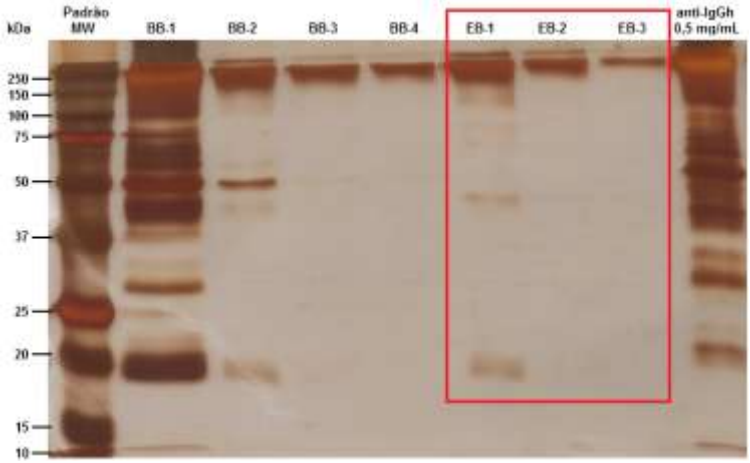

Figura 27 – SDS-PAGE de proteínas presentes em tampão de ligação (BB) e tampão de eluição (EB) eluídas de uma coluna contendo proteína A imobilizada para purificação de anti-IgGh (Fab_2).

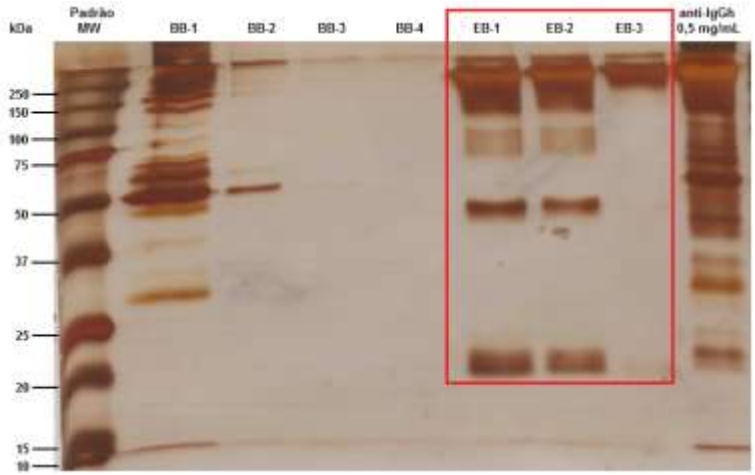

Figura 28 – SDS-PAGE de proteínas presentes em tampão de ligação (BB) e tampão de eluição (EB) eluídas de uma coluna contendo proteína G imobilizada para purificação de anti-IgGh (Fab_2).

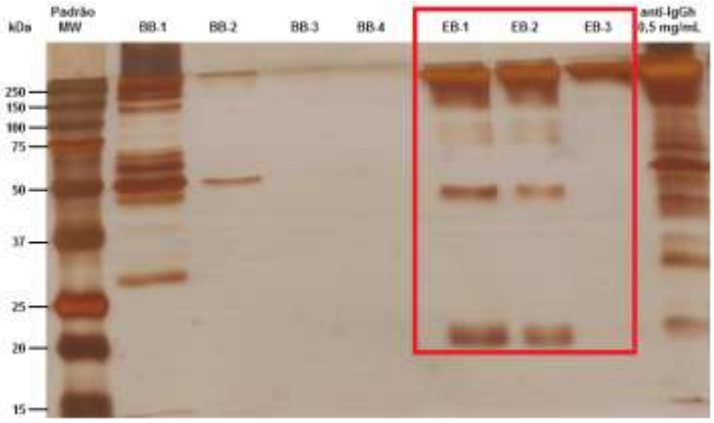

Figura 29 – SDS-PAGE de proteínas presentes em tampão de ligação (BB) e tampão de eluição (EB) eluídas de uma coluna contendo uma mistura de proteína A e G imobilizada para purificação de anti-IgGh (Fab_2).

Observando-se os resultados para a purificação de anti-IgGh (Fab_2), as colunas contendo proteína G imobilizada e mistura de A e G permitem retenções dos anticorpos semelhantes, visto que na passagem do tampão de ligação (BB-1 e BB-2) eluiu quantidade semelhante de anticorpos e demais proteínas, as quais devem ser eliminadas nesta etapa. Também, com base no resultado, após a passagem do tampão de eluição (destacadas em vermelho), conclui-se que as colunas apresentam semelhança na liberação dos anticorpos previamente ligados às proteínas imobilizadas. Assim, para a purificação de anti-IgGh (Fab_2) é possível utilizar ambas as colunas. No entanto, diferentemente de como ocorre a purificação da anti-IgGh (H+L), uma quantidade significativa de proteínas distintas dos anticorpos permanecem na coluna e, desta maneira, o processo de purificação ficou, novamente, comprometido.

4.2.2 Purificação por pI

Para se separar os anticorpos por meio do pI, algumas considerações sobre as suas características devem ser feitas.

Sabe-se que as proteínas são formadas a partir da ligação peptídica entre aminoácidos e que nestas moléculas isoladas estão presentes dois grupos que possuem diferentes pK, isto é, grupo carboxílico e grupo amina. O primeiro possui, em média, pK em torno de 2,2, estando esse grupo praticamente ionizado em pH 3,5. Já o segundo apresenta pK próximo de 9,4, de maneira que abaixo de pH 8 está na forma ionizada. Desta maneira, aminoácidos têm caráter ácido e básico, sendo denominados como substâncias *anfotéricas* ou *anfólitos* (eletrólitos anfotéricos) (VOET & VOET, 2006).

Alguns aminoácidos possuem uma cadeia lateral com grupo ionizável, sendo que dentre os 20 aminoácidos (essenciais ou não essenciais), a tirosina (Tyr), cisteína (Cys), lisina (Lys), arginina (Arg), histidina (His), ácido aspártico (Asp) e ácido glutâmico (Glu) possuem grupo ionizável. Na Tabela 14 são apresentados os aminoácidos formadores de cadeias polipeptídicas e pK do grupo carboxílico, amina e cadeia lateral, quando for o caso (VOET & VOET, 2006).

Tabela 14 – Aminoácidos "padrão" das proteínas e valores de pK de seus grupos ionizáveis.

Aminoácido com cadeia lateral apolar	**pK_1 α-COOH**	**pK_2 α-NH_3^+**	**pK_R Cadeia Lateral**
glicina (Gly)	2,35	9,78	–
alanina (Ala)	2,35	9,87	–
valina	2,29	9,74	–
leucina (Leu)	2,33	9,74	–
isoleucina (Ile)	2,32	9,76	–
metionina (Met)	2,13	9,28	–
prolina (Pro)	1,95	10,64	–
fenilalanina (Phe)	2,20	9,31	–
triptofano (Trp)	2,46	9,41	–
Aminoácido com cadeia lateral polar sem carga	**pK_1 α-COOH**	**pK_2 α-NH_3^+**	**pK_3 Cadeia Lateral**
serina (Ser)	2,19	9,21	–
treonina (Thr)	2,09	9,10	–
asparagina (Asn)	2,14	8,72	–
glutamina (Gln)	2,17	9,13	–
tirosina (Tyr)	2,20	9,21	10,46 (fenol)
cisteína (Cys)	1,92	10,70	8,37 (sulfidril)
Aminoácido com cadeia lateral polar com carga	**pK_1 α-COOH**	**pK_2 α-NH_3^+**	**pK_3 Cadeia Lateral**
lisina (Lys)	2,16	9,06	10,54 (ε-NH_3^+)
arginina (Arg)	1,82	8,99	12,48 (guanidino)
histidina (His)	1,80	9,33	6,04 (imidazol)
ácido aspártico (Asp)	1,99	9,90	3,90 (β-COOH)
ácido glutâmico (Glu)	2,10	9,47	4,07 (γ-COOH)

Quando ocorre a formação de cadeias polipeptídicas e o processo de enovelamento da proteína, esta possui cargas devido à exposição ou não de suas cadeias laterais. Neste caso, o pK dos grupos ionizáveis pode ser alterado de maneira significativa devido à influência de grupos carregados na vizinhança dos aminoácidos, efeito do meio associado a grupos com baixas constantes dielétricas em suas proximidades e efeito da ligação de hidrogênio. Quando a proteína está em um pH onde a carga elétrica líquida é nula, diz-se que a proteína está em seu ponto isoelétrico (pI) (VOET & VOET, 2006).

Baseando-se nesta característica, a separação de proteínas pode ser feita a partir da seleção do pH do meio, porque pelo fato de possuírem diferentes pI terão carga superficial líquida diferente no pH escolhido. Essa separação é denominada *Iso-electric focusing*. Quando aplicada em eletroforese em gel é chamada de *Polyacrylamide gel iso-electric focusing* (PAGIF) (ANDREWS, 1986). O método baseia-se na migração de proteínas em um gel de poliacrilamida na presença de uma mistura de anfóteros. Esta é composta por substâncias como aminoácidos, peptídeos (baixo massa molecular) e tampões anfotéricos ou não, que são capazes de se organizar em ordem crescente de pI quando um campo elétrico é aplicado. As proteínas inseridas nesse gel migrarão no sentido do cátodo ou ânodo, de acordo com suas cargas. Durante a migração, elas podem ganhar ou perder cargas e, quando estão com cargas negativas e positivas em igual quantidade, não migram. Assim, permanecem em um pH que corresponde ao seu pI (VOET & VOET, 2006; WALKER, 1994).

Em relação à formação do gel, às soluções de acrilamida e bis-acrilamida são adicionadas H_2O ao invés de tampão. A desvantagem desta separação consiste na dificuldade de se recuperar as proteínas. Porém, se aplicadas ao final de diversas

etapas de separação, são úteis na resolução de proteínas que diferem em 0,0025 unidades de pI (ANDREWS, 1986).

O processo de separação em questão baseou-se na migração de proteínas entre poços, de modo que em cada um existia uma faixa de pH devido à existência de uma tira com espécies que darão origem do gradiente de pH. À medida que as proteínas migraram, pois houve a aplicação de uma diferença de potencial entre os polos localizados nas extremidades dos poços, os pI destas foram alcançados na faixa de pH associadas a estes. Desta maneira, as proteínas pararam de migrar, pois possuíam quantidade igual de cargas negativas e positivas, ficando concentradas em poços onde se assumiu que pH = pI. Neste caso, diferentemente da SDS-PAGE, as proteínas ficaram em solução ao invés de permanecerem no gel. Na Figura 30 é ilustrado o processo de migração de proteínas e, consequente, concentração quando estas alcançam neutralidade de carga elétrica líquida.

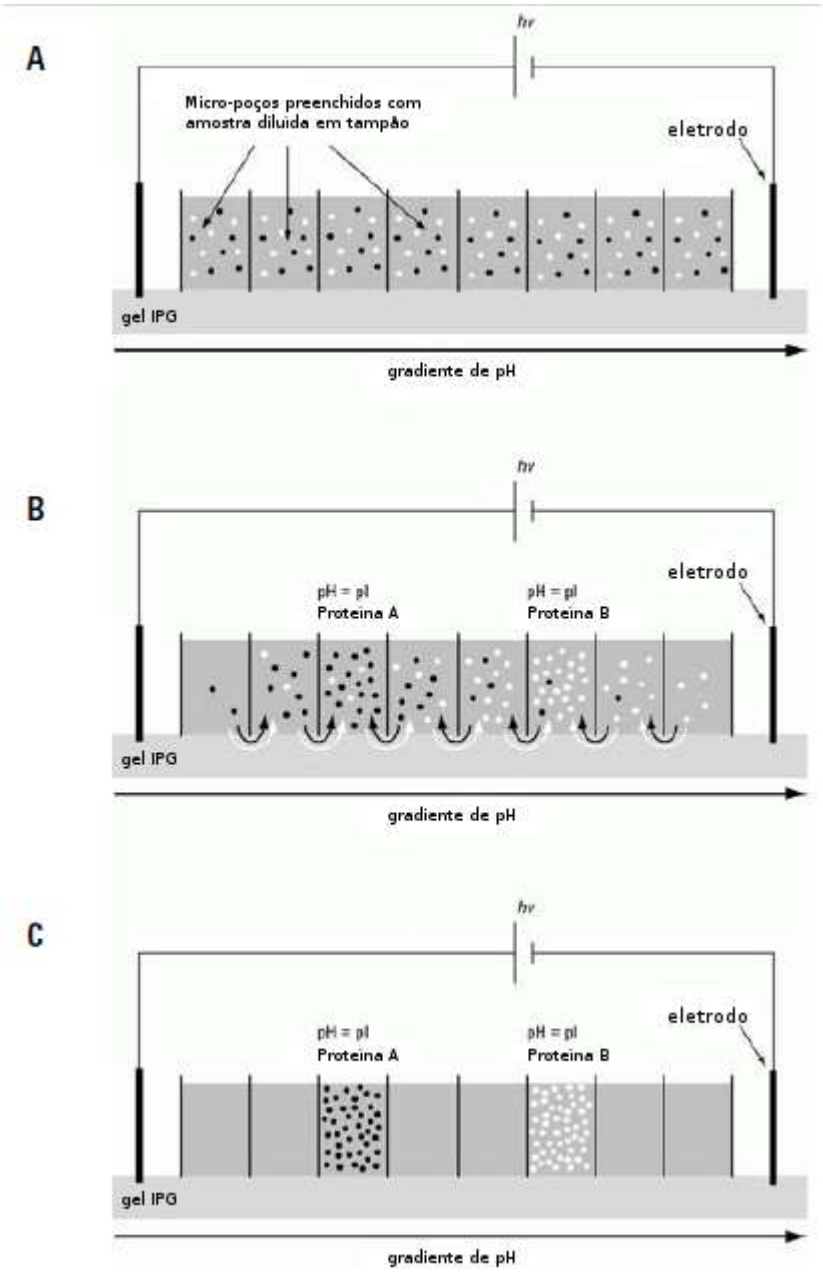

Figura 30 – Princípio do processo de separação em micro-poços. A) proteínas em solução antes da aplicação de uma diferença de potencial; B) proteínas em solução migrando, ao longo do tempo, devido à aplicação de uma diferença de potencial; C) proteínas em solução impedidas de migrar por causa da neutralidade de cargas (pH = pI) (Adaptado de AGILENT, 2012).

Nesta separação, optou-se por não desnaturar as proteínas, pois no caso dos anticorpos, o paratopo deveria ser mantido em condições que proporcionassem a sua ligação com o antígeno. Sabendo-se que a especificidade da interação está associada à complementaridade entre paratopo e epitopo, a localização dos aminoácidos em posições de reconhecimento deveria ser mantida.

O processo de lavagem das amostras antes do preparo da solução, submetida à separação, foi necessário para evitar que o potencial aplicado fosse baixo devido à alta quantidade de íons carregadores na solução que mantêm a corrente (*i*) constante. Segundo a Lei de Ohm (E = i.R), para que *i* seja mantida constante, se há muitas espécies carregadoras, não haverá alta resistência (*R*) e o potencial (*E*) não será aumentado. Neste caso, desejava-se que o campo elétrico fosse alto para promover a migração das proteínas por entre os poços (VOET & VOET, 2006).

Inicialmente, procedeu-se com a separação de solução de IgGh e o resultado das concentrações e massas moleculares das proteínas separadas e identificadas está apresentado na Figura 31 e Tabela 15.

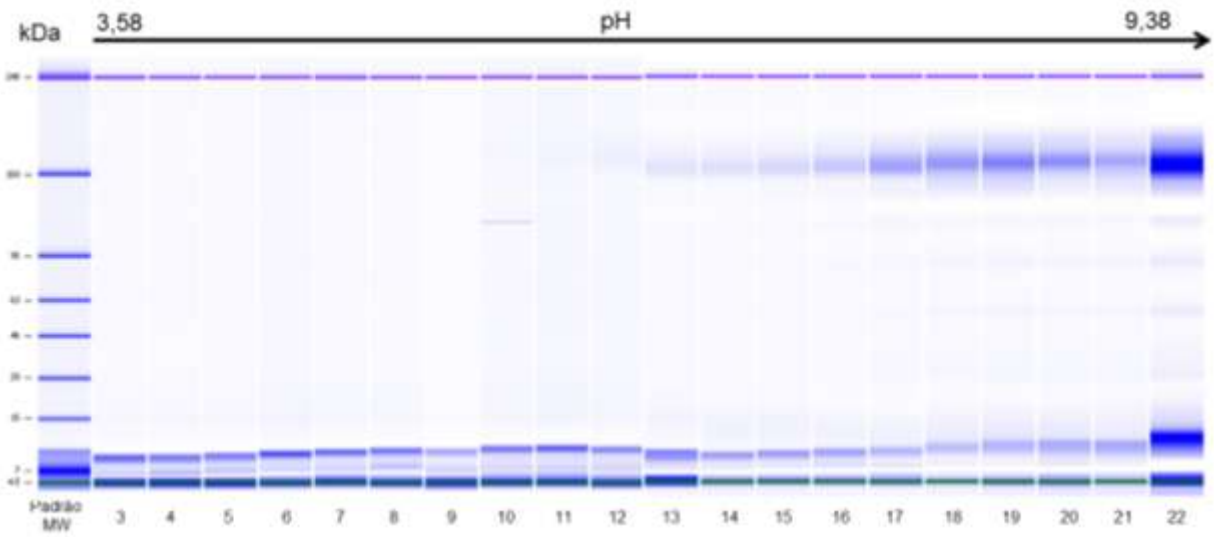

Figura 31 – Visualização e comparação de bandas do padrão de massa molecular com proteínas presentes em cada poço, após separação de solução de IgGh 7,2 mg mL^{-1} em micro-poços, utilizando-se tira IPG pH 3-10 de alta resolução.

Tabela 15 – Resultado qualitativo e quantitativo de IgGh após o processo de separação baseado no pI.

Poço	pH da tira IPG	Massa molecular (kDa)	$[proteína]_{relativa}$ (ng μL)
3	3,58 – 3,87	–	–
4	3,87 – 4,16	–	–
5	4,16 – 4,45	–	–
6	4,45 – 4,74	–	–
7	4,74 – 5,03	–	–
8	5,03 – 5,32	–	–
9	5,32 – 5,61	–	–
10	5,61 – 5,90	118,0	19,7
11	5,90 – 6,19	–	–
12	6,19 – 6,48	163,5	60,0
13	6,48 – 6,77	15,4	45,1
		156,5	104,2
14	6,77 – 7,06	156,6	226,9
15	7,06 – 7,35	157,4	305,4
16	7,35 – 7,64	157,7	355,6
17	7,64 – 7,93	158,2	661,9
18	7,93 – 8,22	15,7	20,7
		59,1	19,4
		90,9	24,2
		160,5	1.026,2
19	8,22 – 8,51	15,9	20,5
		160,8	921,2
20	8,51 – 8,80	15,3	30,8
		162,5	755,7
21	8,80 – 9,09	14,9	45,5
		141,3	34,9
		162,8	817,1
22	9,09 – 9,38	17,0	35,2
		158,7	1.421,5

Segundo a literatura, a massa molecular das IgGh é de aproximadamente 150 kDa e o pI encontra-se na faixa de 7-9,5 (PRIN *et al.*, 1995). Os resultados obtidos apresentaram, majoritariamente, proteínas com massa molecular entre 141,3-163,5

kDa que foram concentradas nos poços 12-22, excluindo-se os poços 1, 2, 23 e 24 porque se esperava, baseando-se na literatura, que as IgGh fossem concentradas em poços cujo pH estivesse em regiões próximas à neutralidade.

De acordo com os dados obtidos pela técnica MALDI TOF-TOF, a massa molecular da IgGh envolvida neste trabalho era de 147,4-158,6 kDa, ratificando a heterogeneidade na composição de anticorpos policlonais. Em relação ao pI, a faixa obtida não condiz com a literatura, pois em pH 6,19 havia IgGh. Assim, os parâmetros de massa molecular e pI possuem desvios. Também, outro fator desfavorável foi a quantidade de proteínas existentes nos mesmos poços que as IgGh, o que tornou a separação ineficiente para isolar os anticorpos de sua matriz complexa para uma caracterização por meio da técnica Raman ou SERS de IgGh purificada.

No entanto, a fim de se verificar o potencial de separação por pI, aplicou-se o processo à BSA, que é uma proteína com menor massa molecular e 98% de pureza. Na maioria dos poços foram encontradas bandas com massa molecular de aproximadamente 15 kDa. Pelo fato das amostras terem sido submetidas a um processo de lavagem, utilizando-se coluna 30.000 MWCO, esses sinais podem corresponder à formação de micelas de SDS, presentes na solução de amostra. Assim, o corante utilizado na detecção de proteínas pode intercalar-se na micela de SDS, o qual é utilizado para as revestir e conferir-lhes carga negativa. Neste caso, as micelas formadas podem ser detectadas pelo equipamento como tendo massa molecular em torno de 15 kDa.

Na Figura 32 observa-se a banda do padrão de massa molecular e da amostra proveniente de cada um dos poços, após a separação de BSA utilizando-se tira IPG pH 3-10 de baixa resolução. Na Tabela 16 são apresentadas as

concentrações e massa molecular das proteínas em cada poço. Os dados do perfil de separação, de concentração e massa molecular são fornecidos pelo software *2100 Expert*. Em todos os experimentos foram excluídos valores de massa molecular e concentração de proteínas que estão abaixo da faixa qualitativa da técnica (15 ng μL^{-1}), tomando-se como referência a BSA em tampão PBS. Portanto, a faixa de massa molecular detectável foi considerada de 14-230 kDa (INTERCHIM, 2012).

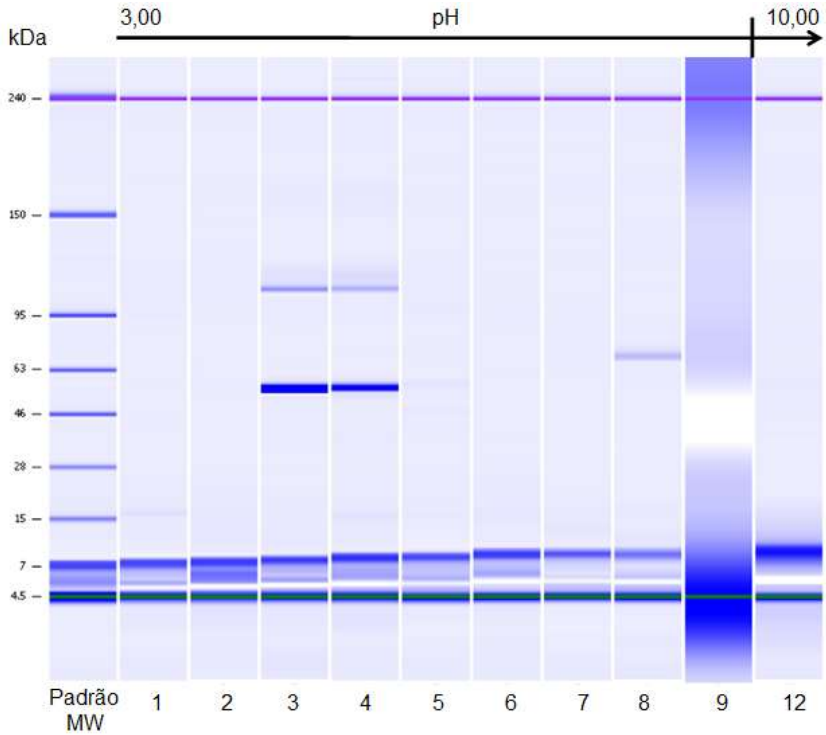

Figura 32 – Visualização e comparação de bandas do padrão de massa molecular com proteínas presentes em cada poço, após separação de solução de BSA 1,38 mg mL^{-1}, utilizando-se tira IPG pH 3-10 de baixa resolução.

Tabela 16 – Resultado qualitativo e quantitativo de BSA após o processo de separação baseado no pI.

Poço	pH da tira IPG	Massa molecular (kDa)	$[proteína]_{relativa}$ (ng μL^{-1})
1	3,00 – 3,58	16,4	32,7
2	3,58 – 4,16	–	–
3	4,16 – 4,74	55,6	1.372,1
		109,7	142,1
		116,8	32,7
4	4,74 – 5,32	16,1	45,2
		53,0	22,6
		56,1	669,7
		110,0	121,8
		116,5	69,4
		167,5	20,9
5	5,32 – 5,90	15,8	17,0
6	5,90 – 6,48	–	–
7	6,48 – 7,06	–	–
8	7,06 – 7,64	70,6	84,1
9	7,64 – 8,22	164,9	9,3
12	9,38 – 9,96	16,0	31,5

Cada poço de separação está associado a uma faixa de pH que, neste caso, varia de 3,00 até 10,00 em 12 poços. Assim, cada poço possuía um intervalo de pH de 0,58. Pelo fato do solvente migrar juntamente com as proteínas, alguns poços tiveram seu volume diminuído, de modo que este é insuficiente para análise, como ocorreu nos poços 10 e 11. Por isso, na Figura 32 há uma barra vertical sobre a seta que indica o aumento de pH, demonstrando a falta de continuidade nas faixas de pH associadas a cada poço na sequência da imagem.

Observa-se que houve a concentração de proteínas nos poços 3 e 4. Segundo a literatura, (AMIM *et al*., 2010; FUJIMOTO *et al*., 2002) a faixa de pI desta proteína corresponde à faixa de 4,7-5,5. Pelo fato de ter sido utilizada uma IPG 3-10 de baixa resolução, a variação de pH em cada poço é 0,58. Portanto, os poços 3 e 4

estão associados às faixas 4,16-4,74 e 4,74-5,32, respectivamente. Neste caso, essa técnica foi útil para concentrar BSA de acordo ao seu pI. Porém, no que diz respeito à análise qualitativa, as proteínas em maior quantidade nos poços 3 e 4 foram identificadas como tendo massa molecular de 55,85 ± 0,35 kDa. Baseando-se em uma análise de espectrometria de massa, cujos resultados encontram-se apresentados nas Figuras 33 e 34, observa-se que a massa molecular de BSA, determinada previamente como igual a 55 kDa, está divergindo.

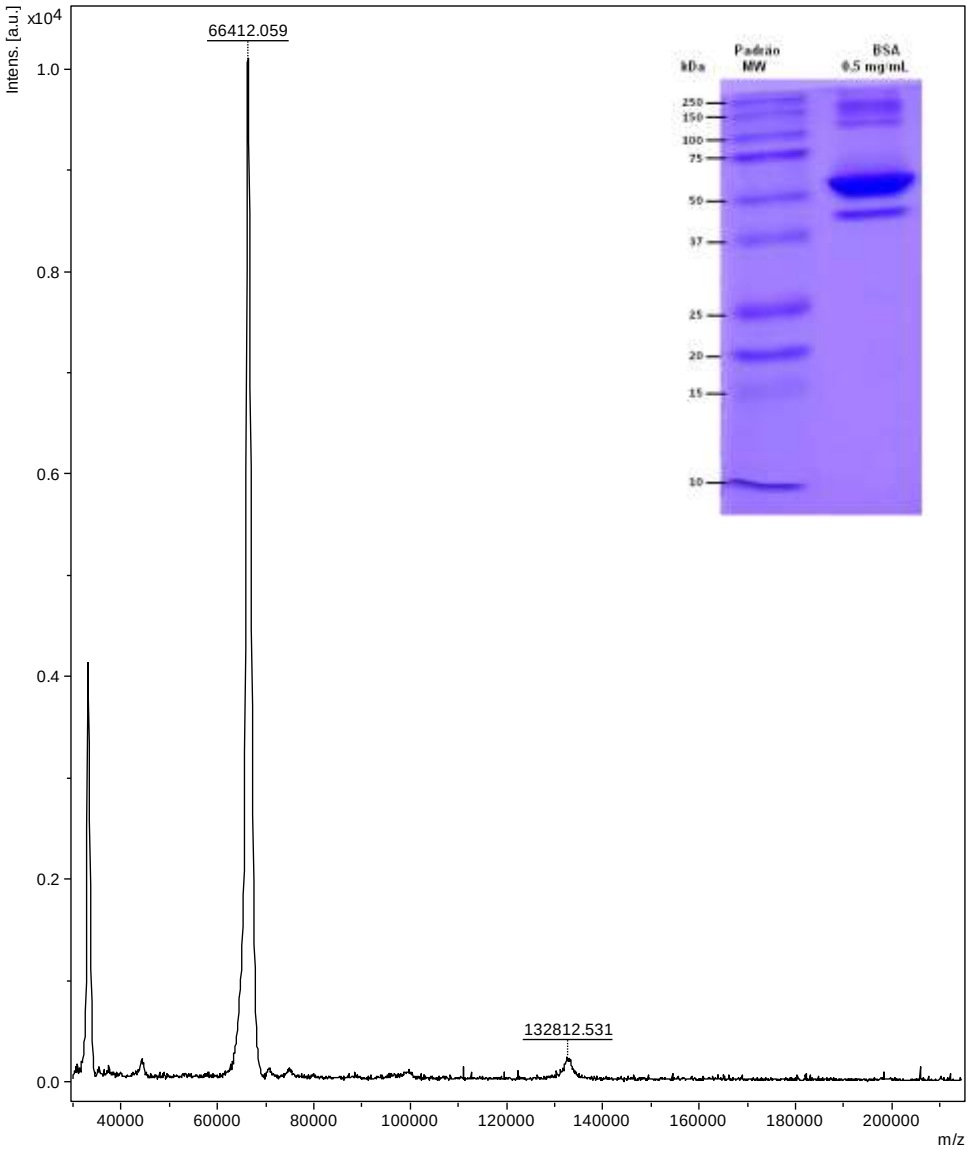

Figura 33 – Espectrometria de massa de BSA (m/z = 35.000 a 215.000). Inserção corresponde à SDS-PAGE.

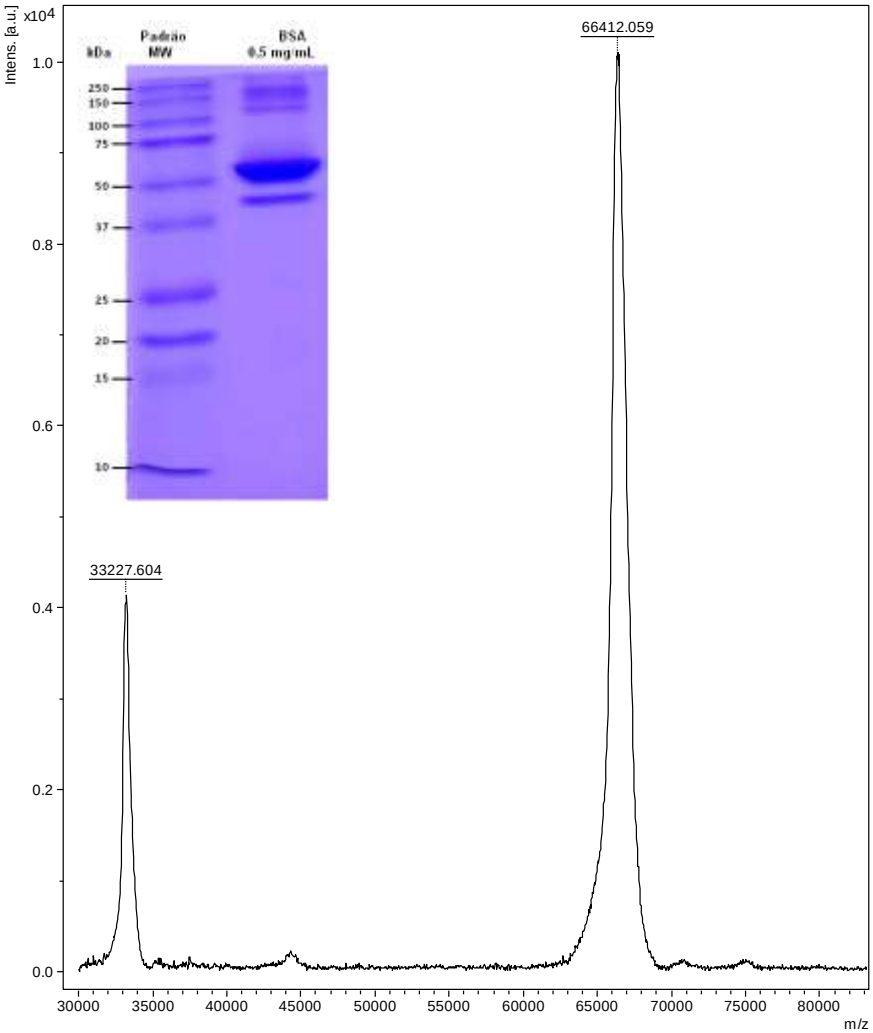

Figura 34 – Espectrometria de massa de BSA (m/z = 30.000 a 86.000). Inserção corresponde à SDS-PAGE.

Essa divergência de massa molecular entre as técnicas MALDI-TOF-TOF e eletroforese em gel ou em chip ocorre devido à migração das proteínas que pode ser influenciada por diversos fatores, sendo uma análise menos precisa do que a de espectrometria de massas. Nesse sentido, a eletroforese em gel utiliza-se de padrões de peso molecular que fornecem uma estimativa de grandeza da massa molecular, sendo que esta deverá ser confirmada por uma técnica mais robusta como a MALDI-TOF-TOF, por exemplo.

Após os testes de purificação de anticorpos, utilizando-se coluna de afinidade e pI disponíveis como ferramentas para tal finalidade, concluiu-se que a tese de se

trabalhar com anticorpos purificados para a caracterização espectroscópica de IgGh, anti-IgGh (H+L) e anti-IgGh (Fab_2) não seria possível, dadas as dificuldades para as isolar de outras proteínas existentes nas amostras. Na literatura, pode-se citar o trabalho de Kengne-Momo e colaboradores que fizeram aquisição do espectro Raman de IgGh e Proteína A de Estafilococos (SpA) sem prévio tratamento, o que permitiu uma análise da estrutura nativa dessas proteínas (KENGNE-MOMO *et al*., 2012). Também, Balzerov e colaboradores desenvolveram um método de detecção de IgGh que utilizou nos ensaios amostras com pureza ≥95% (BALZEROV, 2014).

Assim, em todos os experimentos realizados neste trabalho, optou-se pelo uso das soluções originais, sem qualquer purificação/tratamento prévio, dadas as dificuldades apresentadas.

4.3 Avaliação da eficiência do processo de fragmentação de anticorpos

Considerando-se que os fragmentos de anticorpos poderiam ser caracterizados pela técnica SERS, foram gerados fragmentos F(ab)'. No entanto, duas abordagens foram empregadas: uso de papaína não imobilizada e papaína imobilizada, a fim de se verificar o método que permitiria o melhor rendimento na produção de fragmentos F(ab)'.

A fragmentação utilizando-se papaína apresenta vantagem, pois além de conservar a região de reconhecimento do anticorpo (paratopo) pelo antígeno, são gerados dois fragmentos com ligações de dissulfeto que podem ser utilizadas no processo de imobilização sobre superfícies, como por exemplo, sobre o ouro. Também, os fragmentos Fc podem ser retirados do sistema reacional por meio de colunas de afinidade, conforme foi discutido no processo de purificação de

anticorpos (item 4.2.1), tendo em vista que, diferentemente da pepsina que produz diversos fragmentos, a porção Fc mantém-se intacta e pode interagir com proteínas A, G ou uma mistura das proteínas A e G, tal qual ocorre com os anticorpos não fragmentados.

Um estudo feito por Vikholm demonstrou o uso de fragmentos F(ab)' e $F(ab)_2$' provenientes de anti-IgGh para detecção de IgGh. Estes foram imobilizados sobre uma superfície de ouro para a construção de um imunossensor baseado na técnica SPR, sendo constatado que dependendo da maneira como os fragmentos se ligam, a interação paratopo-epitopo pode ser comprometida (VIKHOLM, 2005). Neste sentido, a técnica SERS possui vantagem em relação à SPR, pois a caracterização espectroscópica pode avaliar a orientação da ligação, bem como se esta afetou sua a conformação secundária.

4.3.1 Papaína não imobilizada

Para a visualização do rendimento dos fragmentos gerados, utilizou-se gel poliacrilamida não redutor, pois se o meio fosse redutor, seriam observadas bandas menores do que 50 kDa, devido à clivagem da cadeia pesada e leve existentes nos fragmentos F(ab)'.

Majoritariamente, espera-se a visualização de uma banda de massa molecular menor do que 50 kDa, referente à F(ab)', e uma banda em 27 kDa correspondente à porção Fc (2:1). Eventualmente, duas bandas podem ocorrer em 24 e 15 kDa devido a produtos não importantes gerados no processo de digestão (ELGERT, 1996; BONIFACINO *et al*., 2004).

A cisteína pode causar alguma modificação na mobilidade eletroforética do anticorpo não fragmentado e este efeito poderá ser observado no grupo de controle,

isto é, os anticorpos que não foram submetidos ao processo de fragmentação. Assim, em tempos de incubação menores que 4h, geralmente há o aparecimento de bandas em 120 kDa.

Inicialmente, bandas correspondentes a anticorpos intactos são esperadas. Pois, o processo de fragmentação é considerado completo quando as bandas em 150 kDa e 120 kDa não estiverem mais presentes. O tempo de fragmentação de cada tipo de anticorpo pode variar, por isso, é necessário testar as condições ideais de incubação (BONIFACINO, 2004).

Portanto, foram avaliadas as condições de fragmentação para IgGh, anti-IgGh (H+L) e anti-IgGh (Fab_2) durante o período de 1 a 48 h de incubação.

Na Figura 35 são apresentas as bandas geradas quando as IgGh são submetidas à ação da papaína 0,1 mg mL^{-1} (G01).

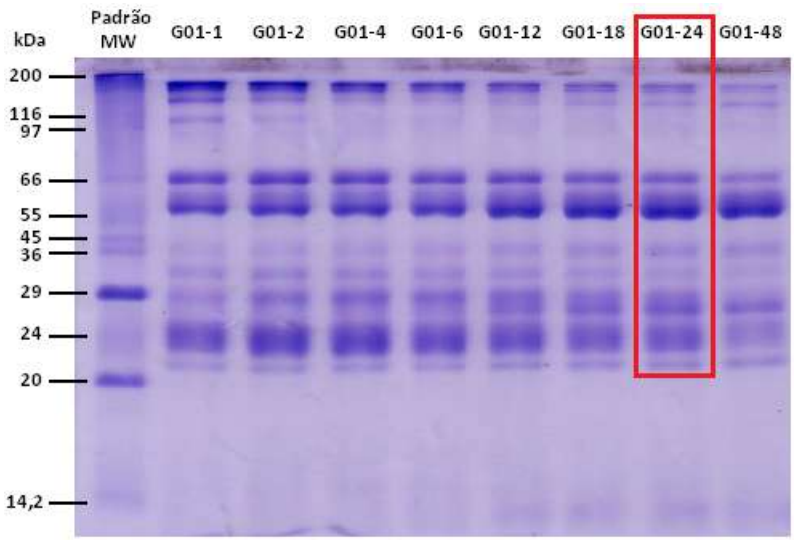

Figura 35 – SDS-PAGE para amostras de IgGh submetidas à ação da enzima papaína 0,1 mg mL^{-1} em diferentes tempos de incubação (1, 2, 4, 6, 12, 18, 24 e 48 h) a 37 ºC.

Observa-se que à medida que a reação avança as bandas correspondentes às IgGh (~150 kDa) vão desaparecendo e as bandas em ~50 kDa aumentando.

Neste caso, observa-se claramente o desaparecimento das bandas em ~150 kDa e 120 kDa, bem como o aumento das bandas em ~50 kDa, indicando que o processo gerou fragmentos que podem ser atribuídos a F(ab)'.

O mesmo perfil, representado na Figura 36, é seguido pelas IgGh submetidas à ação da papaína 0,02 mg mL^{-1} (G002).

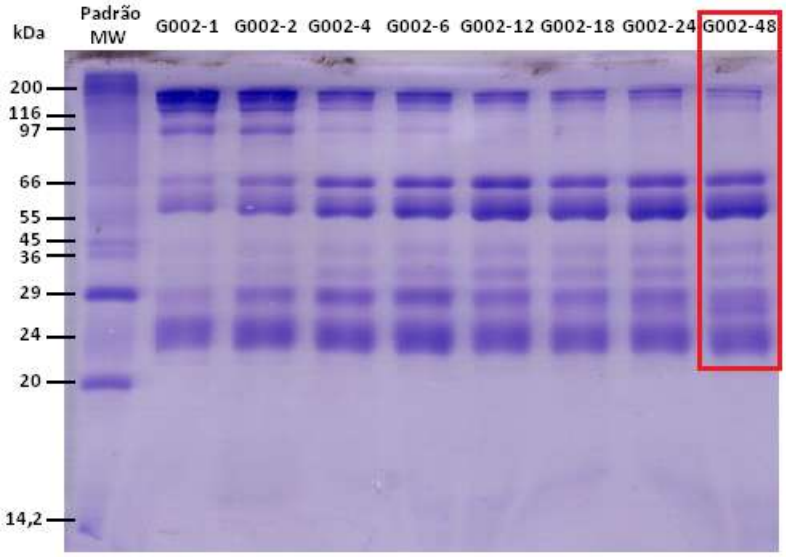

Figura 36 – SDS-PAGE para amostras de IgGh submetidas à ação da enzima papaína 0,02 mg mL^{-1} em diferentes tempos de incubação (1, 2, 4, 6, 12, 18, 24 e 48 h) a 37 ºC.

Observa-se tanto na Figura 35, quanto na Figura 36, uma proporção de aproximadamente 2:1 entre as bandas em ~50 kDa e 27 kDa, estando de acordo com a proporção F(ab)': Fc (ELGERT, 1996). No entanto, Coleman e Mahler afirmam que o fragmento Fc quando submetido à SDS-PAGE, por meio da ação do SDS tem suas duas cadeias pesadas separadas, com o surgimento de banda em ~25 kDa (COLEMAN & MAHLER, 2003). Neste estudo, bandas em ~25 kDa aparecem, mas menos intensas do que as demais bandas em ~50 kDa e, especificamente, nas bandas com padrão 2:1.

Apesar do perfil de fragmentação para as amostras submetidas à ação da papaína 0,02 mg mL^{-1} ser semelhante àquele obtido por meio do uso da papaína 0,1 mg mL^{-1}, concluiu-se que o tempo de 24 h de incubação em papaína 0,1 mg mL^{-1} é o melhor, pois a diferença nas intensidades das bandas em ~50 kDa entre 24 h e 48 h do grupo G01 não é tão grande e, comparando-se G01-24 e G002-24, observa-se que a intensidade da banda da primeira é maior do que a segunda.

Assim, definiu-se que as condições de G01-24 são as melhores para gerar os fragmentos de interesse provenientes da fragmentação de IgGh.

Na Figura 37 é demonstrado o comportamento das IgGh não submetidas à ação da papaína, isto é, aquelas que não foram fragmentadas (GC).

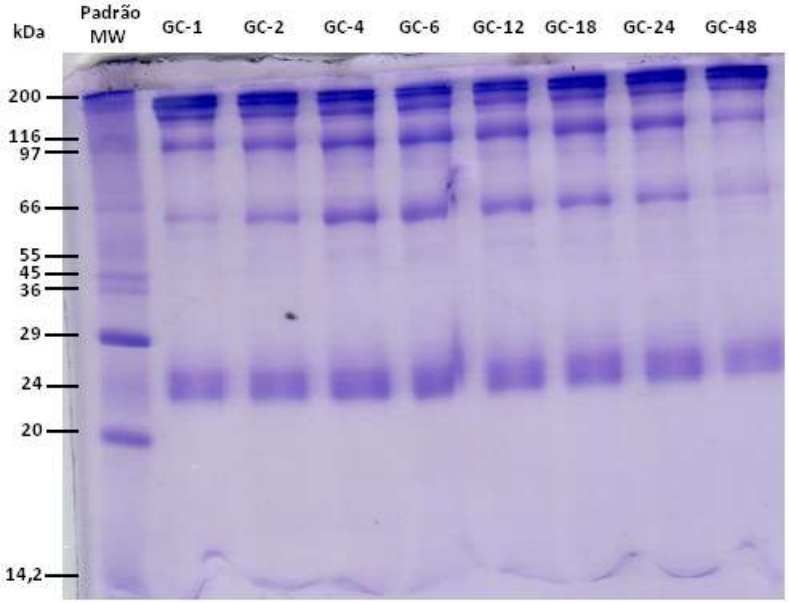

Figura 37 – SDS-PAGE para amostras de IgGh não submetidas à ação da enzima papaína em diferentes tempos de incubação (1, 2, 4, 6, 12, 18, 24 e 48 h) a 37 ºC.

As bandas em ~150 kDa e ~120 kDa (devido à ação da cisteína que pode mudar a mobilidade eletroforética das IgGh) eram esperadas. Observou-se que elas se mantêm constantes ao longo do período de incubação a 37 °C, indicando que não são formados fragmentos F(ab)' e Fc nas condições empregadas.

No entanto, diversas bandas aparecem ao longo do período de incubação, pois foram utilizadas soluções não purificadas nestes experimentos. A princípio, pode-se inferir que as bandas produzidas no GC, correspondem à impureza das IgGh, porém, pelo fato das amostras serem aquecidas a 100 °C durante 10 min no procedimento de desnaturação das amostras que foram submetidas ao gel é possível inferir que uma pequena parcela das IgGh pode sofrer decomposição nesta etapa. Luz e colaboradores, em um estudo de determinação de umidade em sementes, trataram estas em estufas com temperaturas que variaram de 103 a 200 °C em diferentes tempos. Observaram que na temperatura de 103 °C, durante 24 h, a decomposição de proteínas, lipídeos e carboidratos ocorria (LUZ *et al*., 1993). Neste caso, a afirmação sobre a decomposição parcial das IgGh no processo de desnaturação é razoável, pois a temperatura na qual as IgGh estão normalmente inseridas corresponde à temperatura corporal humana, que difere em mais do que 60 °C em relação àquela do processo de desnaturação das amostras.

O mesmo estudo de fragmentação foi aplicado à anti-IgGh (H+L) e anti-IgGh (Fab_2) não purificados. No entanto, os resultados de SDS-PAGE não foram apresentados, tendo em vista que a IgGh foi o anticorpo selecionado para ter sua porção F(ab') separada e utilizada nos experimentos de imobilização de fragmentos sobre superfícies metálicas, devido ao seu espectro Raman/SERS possuir maiores detalhes do que das anti-IgGh, conforme será discutido oportunamente. No entanto, é válido informar que as condições ideias para fragmentar anti-IgGh (H+L) foi a utilização de papaína 0,1 mg mL^{-1} com tempo de incubação igual a 12 h. E, para anti-IgGh (Fab_2) uso de papaína 0,1 mg mL^{-1} com tempo de incubação igual a 18 h.

4.3.2 Papaína imobilizada

Neste estudo foi utilizada apenas IgGh não purificada. Na Figura 38 são apresentas as bandas referentes aos fragmentos que não interagiram com a coluna contendo proteína A (que resultou na melhor interação entre a porção Fc da IgGh, conforme foi discutido anteriormente) e os fragmentos que foram eluídos desta.

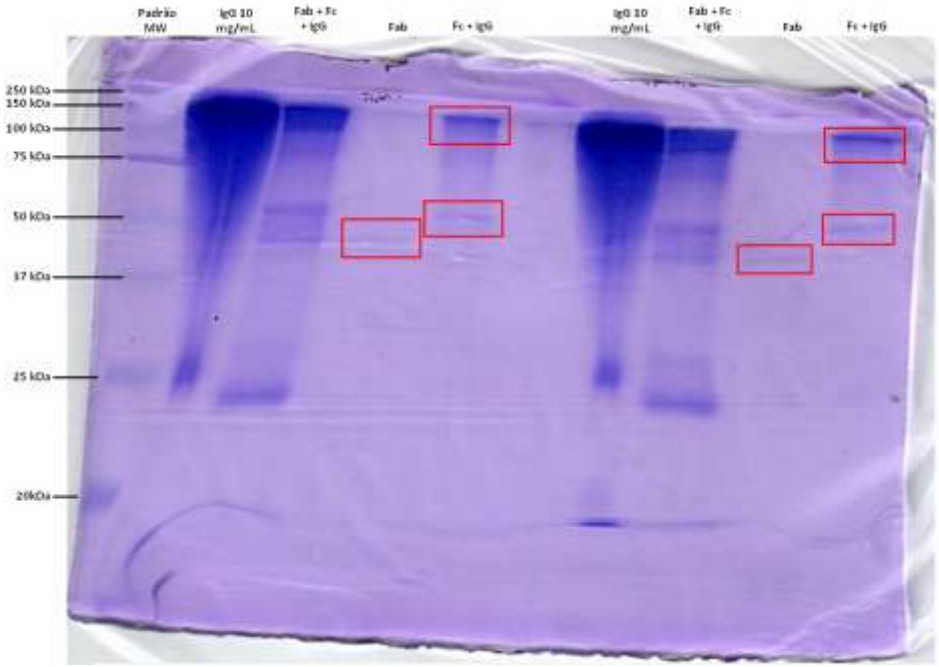

Figura 38 – SDS-PAGE aplicada para visualizar as bandas características da IgGh, dos fragmentos que não interagem com a proteína A na coluna e fragmentos eluídos desta.

A proteína A é um polipeptídio com massa molecular de 42 kDa produzida pela espécie *Staphylococus aureus*. Esta proteína tem capacidade para interagir de maneira específica com a porção Fc de IgG, principalmente. Devido à alta estabilidade desta proteína, ela é comumente imobilizada e utilizada com a finalidade de separar IgG (LUO *et al*., 2002).

Na Figura 39 são apresentas as bandas com visualização mais nítida após concentração em coluna 30 MWCO da solução contendo fragmentos que não interagem e aqueles que interagem com proteína A imobilizada na coluna.

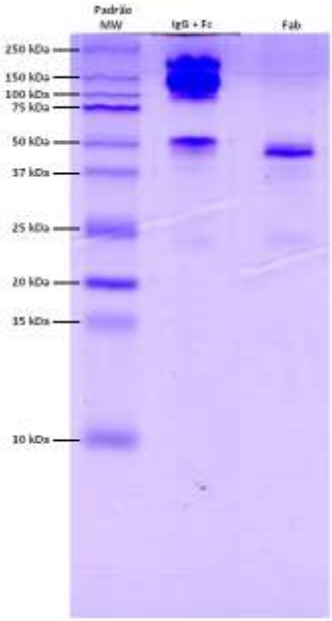

Figura 39 – SDS-PAGE utilizando soluções concentradas contendo fragmentos presentes no tampão de ligação e no tampão de eluição.

Como pode ser observado, a banda em 150 kDa pode ser atribuída à IgGh não fragmentada no processo, visto que o rendimento pode ser igual a 50-65%. Apesar do rendimento ser baixo, a obtenção dos fragmentos utilizando-se este kit é mais rápida e prática. Sendo, portanto, uma ferramenta útil para geração de fragmentos F(ab)', do ponto de vista da praticidade e rapidez. Outra vantagem desse kit está associada à imobilização da papaína, pois há maior controle do processo de digestão, fácil separação da enzima e solução onde ocorreu o processo de digestão, bem como aumento da estabilidade frente ao processo de desnaturação ou autólises (processo de auto-digestão desta protease). O fato da papaína estar imobilizada pouco afeta a atividade desta enzima, sendo que esta pode ser reutilizada (LUO *et al*., 2002). Neste sentido, a reutilização das enzimas presentes no kit é uma vantagem. Porém, do ponto de vista do rendimento na geração dos fragmentos é uma desvantagem. Assim, a fim de avaliar a manutenção da atividade da protease imobilizada, foram feitos experimentos em uma mesma coluna para verificar se o processo de fragmentação seria influenciado ao longo do tempo.

4.3.2.1 Reutilização de papaína imobilizada

Este experimento envolveu processos de clivagens entre 60-150 dias, sendo que um controle foi feito a partir do uso de solução de papaína imobilizada não utilizada previamente.

Na Figura 40 é demonstrado o perfil do rendimento no processo de fragmentação das IgGh.

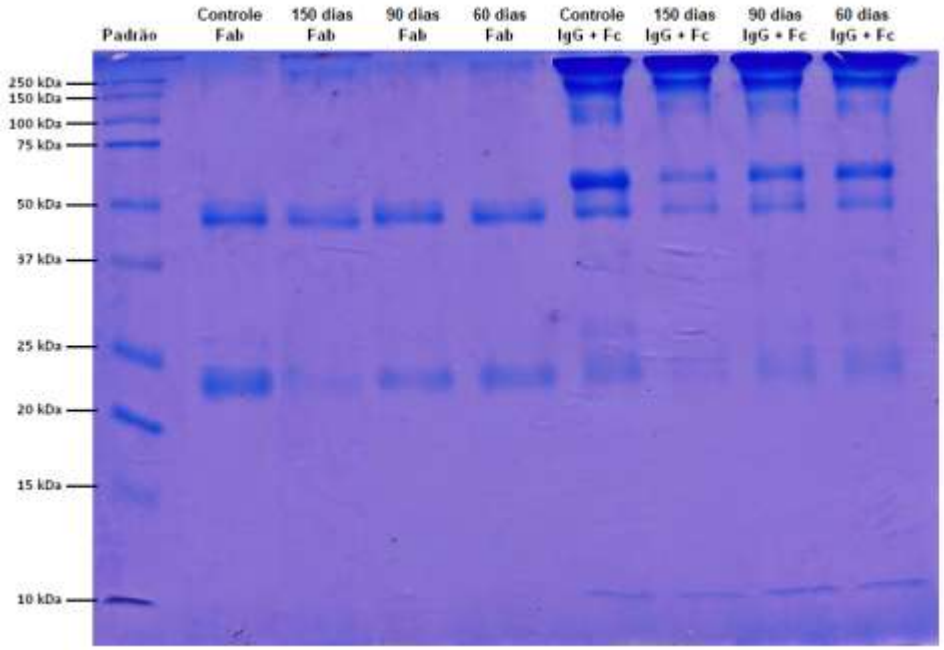

Figura 40 – Rendimento do processo de fragmentação utilizando papaína imobilizada previamente utilizada (após 150, 90 e 60 dias) e controle (papaína nunca utilizada).

Observando-se o decréscimo do rendimento do processo de clivagem (intensidade das bandas próximas à 50 kDa do padrão) ao se utilizar papaína imobilizada reutilizada, mesmo mantendo-a em baixa temperatura e em tampão contendo NaN_3, estas não são condições suficientes para manter a atividade da protease, que ao longo do tempo tem sua capacidade enzimática diminuída. Neste caso, reutilizar papaína imobilizada não é uma alternativa vantajosa, visto que a quantidade de fragmentos gerados não é a mesma quando comparada à papaína

não imobilizada que apresentou alto rendimento, de acordo com a concentração da enzima utilizada e o tempo de incubação.

Assim, nos experimentos para geração de fragmentos F(ab)', foi utilizada a técnica que envolve o uso de papaína com concentração e tempo de incubação pré-estabelecidos.

4.4 Nanopartículas (NP)

Para os estudos de caracterização espectroscópica dos anticorpos ou de seus fragmentos por meio da técnica SERS, há a necessidade de se utilizar superfícies com características plasmônicas. Por isso, para a aquisição deste tipo de espectro, foram sintetizadas NP-Au com capacidade de intensificar o sinal Raman, sendo, portanto, estruturas SERS-ativas. Neste sentido, além destas superfícies imobilizarem as biomoléculas, permitem a amplificação de sinais Raman e caracterização da orientação e conformação secundária dos anticorpos ou de seus fragmentos.

Inicialmente, foi selecionada uma preparação que produz nanocubos de ouro (NC-Au) (SUN *et al*., 2008). A partir desta, foram feitas mudanças que permitissem a modulação das características das NP-Au que são favoráveis às superfícies do tipo SERS-ativas.

4.4.1 Variação da preparação de NC-Au para obtenção de NB-Au

O processo de formação de NP-Au, da ordem de 2-5 nm, na solução semente ocorre a partir da redução de Au^{3+} complexado ao surfactante CTAB, por meio de um agente redutor forte $NaBH_4$ (SUN *et al*., 2008).

O crescimento das partículas na solução de crescimento ocorre sobre as NP-Au, provenientes da solução semente, que atuam como catalisadores nesse processo. Inicialmente, na solução de crescimento, o Au^{3+} complexado ao CTAB é reduzido pela ação do ácido ascórbico, que é um agente redutor fraco. Desta maneira, há a formação do Au^{+} complexado ao CTAB. Quando estes estão na presença de NP-Au (solução semente) sofrem redução, resultando no crescimento da partícula. A Equação 3 descreve a formação de NP-Au na solução semente, enquanto que as Equações 4 e 5 demonstram o processo envolvido no crescimento das NP-Au. As Figuras 41 e 42 apresentam as mudanças de coloração da solução semente (*seed*) e de crescimento.

$$Au^{3+} - CTAB \xrightarrow{NaBH_4} Au_{seed}\,(solução\ seed) \qquad \text{(Equação 3)}$$

$$Au^{3+} - CTAB \xrightarrow{Ácido\ ascórbico} Au^{+} - CTAB\ (solução\ de\ crescimento) \qquad \text{(Equação 4)}$$

$$Au^{+} - CTAB \xrightarrow{Au_{seed} + ácido\ ascórbico} NP(Au) \qquad \text{(Equação 5)}$$

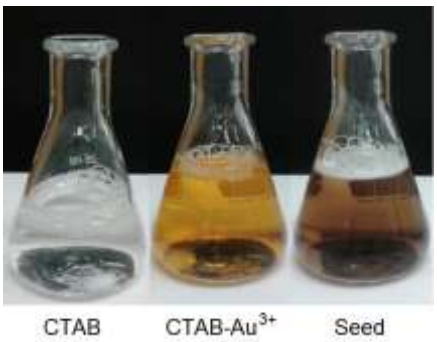

Figura 41 – Mudança de coloração da solução semente: CTAB 0,10 mol L^{-1} em solução aquosa, complexo CTAB-Au^{3+} ($HAuCl_4$ 1,0 mmol L^{-1}) e semente após adição de $NaBH_4$ 0,10 mol L^{-1}.

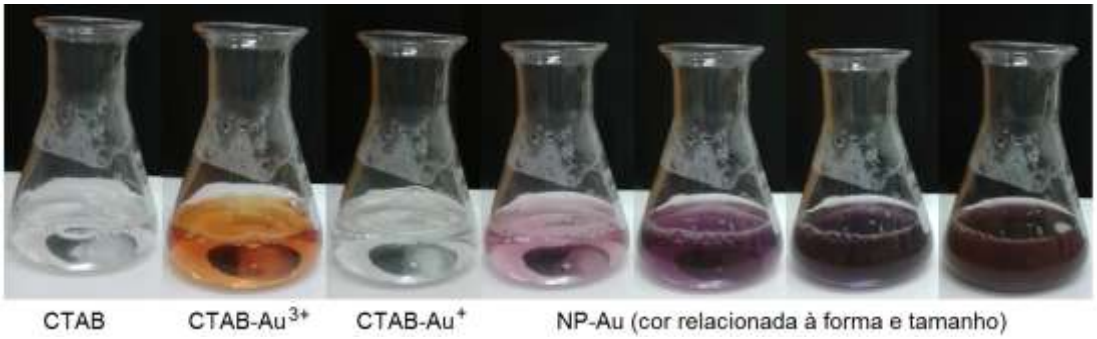

Figura 42 – Mudança de coloração da solução de crescimento: CTAB 0,020 mol L^{-1} em solução aquosa, complexo CTAB-Au^{3+} ($HAuCl_4$ 3,0 mmol L^{-1}), complexo CTAB-Au^{+} (ácido ascórbico 0,10 mol L^{-1}) e avanço do crescimento das NP-Au.

A mudança na coloração está diretamente associada ao crescimento das NP, pois além da absorção do plasmon, luz também é espalhada. Assim, conforme as NP têm seu tamanho aumentado, maior será o espalhamento de luz (MURPHY *et. al*., 2008).

O formato das NP-Au é controlado pela razão entre o crescimento da face [100] e [111]. O CTAB interage com a face [100], diminuindo a taxa de crescimento desta. Assim, a face [111] cresce com maior velocidade, resultando em NP-Au em forma de bastões (SUN *et al*., 2008). Conforme pode ser ilustrado pela Figura 43, esse tipo de NP-Au é formado por 5 faces laterais [100] e 10 faces nas extremidades [111], sendo que o CTAB forma uma bicamada por meio da interação entre os grupos alquilas (SAJANLAL *et al*., 2011).

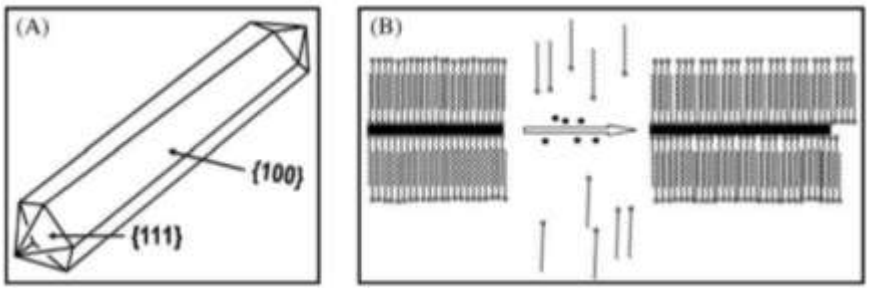

Figura 43 – Ilustração da A) morfologia 3-D das faces das extremidades (111) e das faces laterais (100); B) formação da dupla camada de CTAB na superfície do NB (retângulo preto) que auxilia na formação do NB à medida que mais íons de ouro (pontos pretos) são introduzidos (SAJANLAL et al., 2011).

Quando Cu^{2+} é adicionado ao meio reacional, este se liga na face [111], diminuindo sua taxa de crescimento, resultando em NP-Au em forma de cubos.

Na literatura (SUN *et al*., 2008; SAJANLAL *et al*., 2011), demonstra-se que a razão (R) entre as taxas de crescimento das faces [100] ($G_{[100]}$) pela [111] ($G_{[111]}$), quando resultam em R << 0,58 são formadas partículas em forma de bastões. Porém, quando R ≈ 0,58 as formas cuboides são favorecidas. Por fim, quanto maior é quantidade de Cu^{2+} adicionado à solução de crescimento (R ≈ 1,7), ocorre a formação de decaedros.

Neste estudo, limitou-se à preparação de NC-Au e a adaptação de sua metodologia para favorecer a formação de NB-Au, a partir da variação da [Au^{3+}] na solução de crescimento, bem como da quantidade de semente para o crescimento das NP-Au.

No processo de preparação de NB-Au, o CTAB e o ácido ascórbico tem contribuição significativa no formato das NP. Em um estudo feito por Jana, afirma-se que o $NaHB_4$ (agente redutor forte) é responsável pela nucleação, enquanto que o ácido ascórbico (agente redutor fraco que não reduz Au^+ na ausência de partículas de Au) controla o crescimento das NP (JANA, 2005).

Nos experimentos realizados, um dos objetivos era reproduzir esse controle sobre a forma e tamanho das NP, utilizando-se dessas ferramentas que consideram a diminuição da taxa de crescimento de determinadas faces, associadas ao controle no processo de nucleação e crescimento das NP.

4.5 Caracterização das NP-Au

Geralmente, devido ao custo, praticidade e rapidez, a caracterização de NP-Au pode ser feita por meio da aquisição do espectro de extinção (visualização da absorção dos plasmons na região do UV-Vis). Posteriormente, a aquisição de imagem MEV permitirá uma visualização do rendimento de formas e tamanhos das NP.

4.5.1 Aquisição de espectro de extinção e MEV

O espectro de extinção é formado pela contribuição da absorção e espalhamento das NP, conforme é ilustrado na Figura 44 que apresenta espectros calculados para diferentes formas de nanopartículas (KUMAR, 2009).

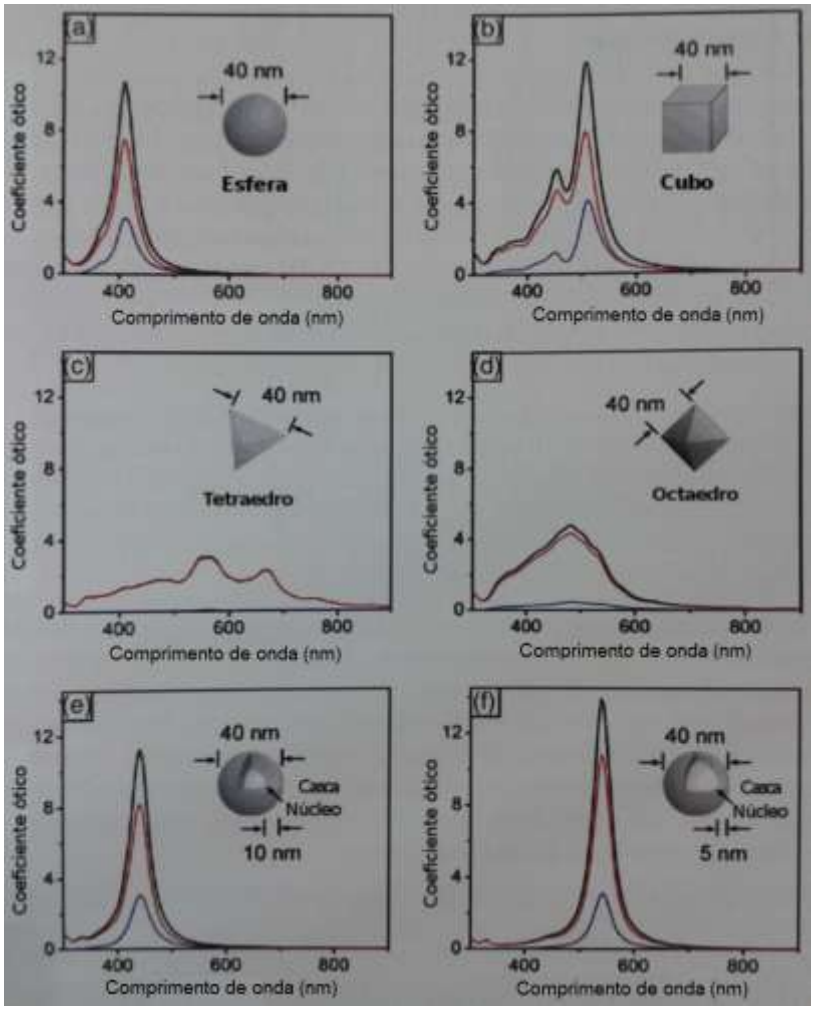

Figura 44 – Efeito da forma de nanoestruturas nas propriedades espectrais. Espectros UV-Vis calculados para nanoestruturas de Ag: extinção (preto), absorção (vermelho) e espalhamento (azul) (Adaptado de KUMAR, 2009).

A aquisição do espectro de extinção das NP-Au (NC-Au e NB-Au) corresponde a uma análise qualitativa preliminar sobre o êxito da síntese. Pois, por meio da visualização de bandas referentes ao seu plasmon é possível identificar o produto majoritário do processo de formação que, no caso dos NB-Au, apresenta duas bandas, enquanto que para os NC-Au, apenas uma deve ser formada. Assim, quando essa informação qualitativa for obtida, a aquisição de imagem MEV para avaliar os produtos majoritários e minoritários da preparação pode ser feita.

O espectro é denominado *espectro de extinção* porque há a contribuição da absorção do plasmon superficial e, quando as partículas possuem dimensões

próximas ao comprimento de onda da radiação incidente, há espalhamento destas de acordo com a Teoria de Mie. Portanto, para partículas maiores do que 50 nm, o espalhamento na região do vermelho e infravermelho próximo é considerável (SANT'ANA *et. al*., 2006).

4.5.1.1 NC-Au

A seguir, são apresentados o espectro de extinção dos NC-Au e a imagem de microscopia (Figuras 45 e 46).

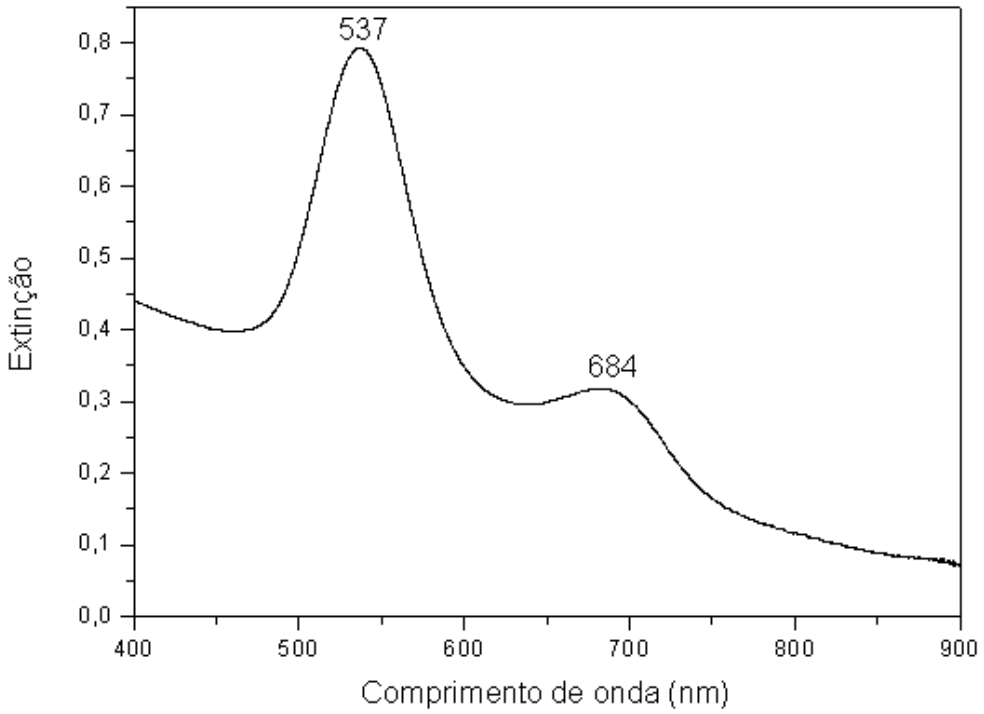

Figura 45 – Espectro de extinção da solução de preparação de NC-Au.

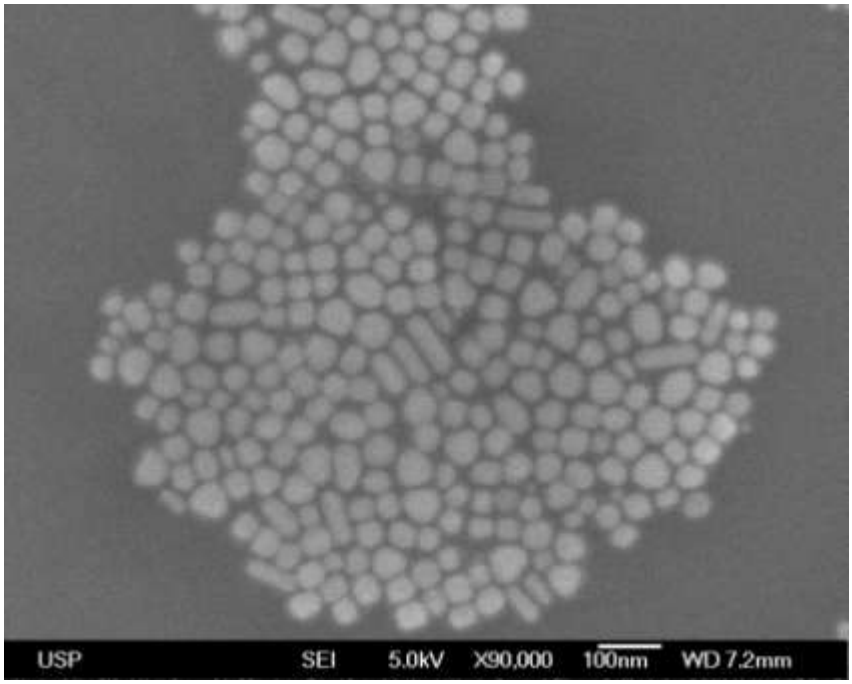

Figura 46 – MEV dos NC-Au, com aumento de 90.000 vezes.

O espectro de extinção apresenta uma banda em 537 nm referente à absorção do plasmon superficial correspondente aos eixos longitudinal e transversal de NC-Au. Como se pode observar pela imagem MEV, a preparação apresentou majoritariamente NC-Au (Figura 46). Porém, uma pequena banda em 684 nm, associada aos produtos minoritários demonstram que há eixos longitudinais maiores do que dos NC-Au, resultando também em uma fração significativa de NB-Au. Assim, concluiu-se que essa preparação teria potencial para a aquisição de NB-Au. Na técnica SERS, como será discutido posteriormente, há grande interesse em morfologias que resultem em pontas.

4.5.1.2 NB-Au

Considerando-se o potencial da preparação de NB-Au a partir da adaptação da metodologia proposta por Sun e colaboradores (SUN *et al.*, 2008), inicialmente,

exclui-se a adição de Cu^{2+}, de modo a permitir uma R << 0,5 e favorecer a formação de NB-Au.

Nas Figuras 47, 48 e 49 estão apresentas as imagens MEV das NP-Au sintetizadas, sendo que a Figura 48 foi utilizada para estimar o rendimento no processo de formação de NB-Au.

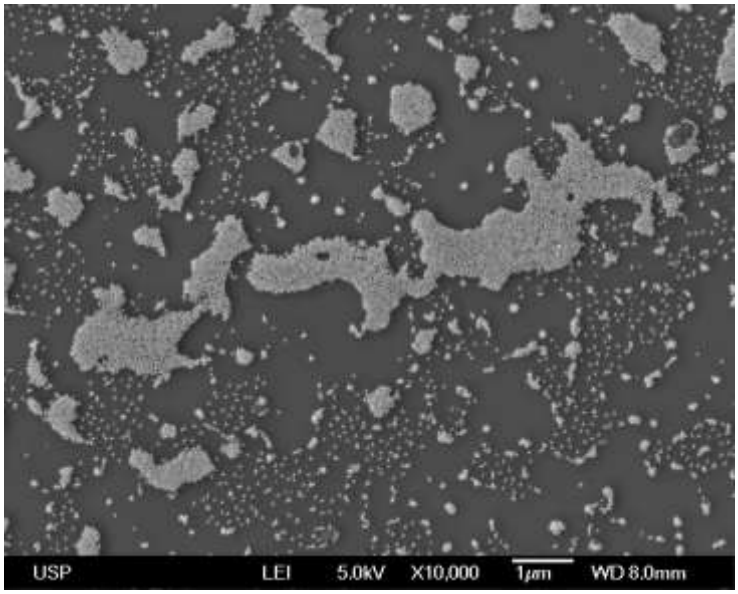

Figura 47 – MEV das NP-Au obtidas a partir da preparação sem adição de Cu^{2+}. Aumento de 10.000 vezes.

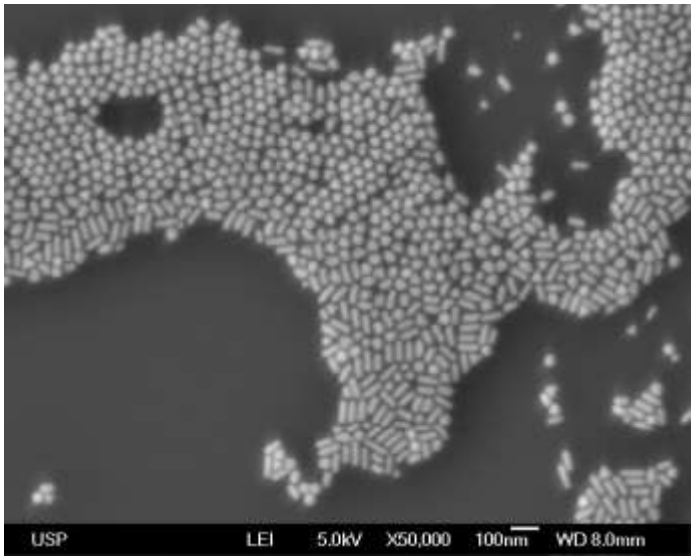

Figura 48 – MEV das NP-Au obtidas a partir da preparação sem adição de Cu^{2+}. Aumento de 50.000 vezes.

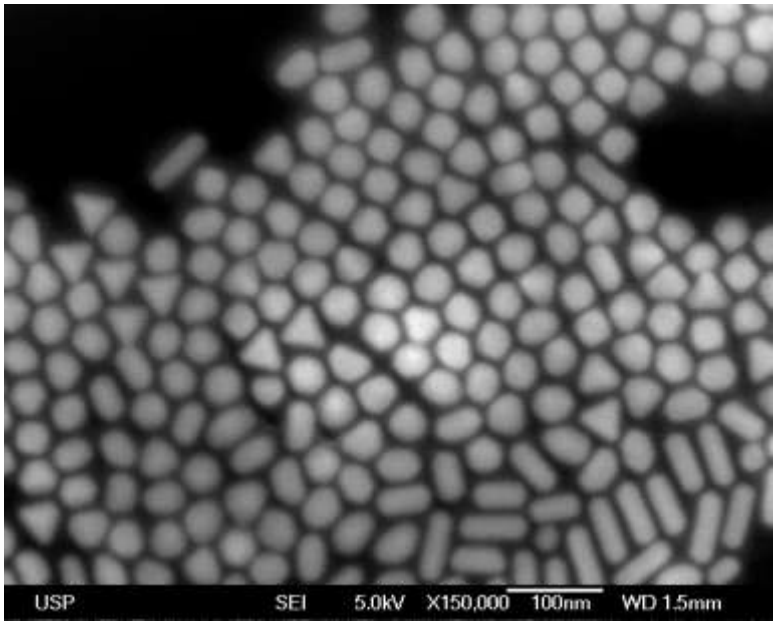

Figura 49 – MEV das NP-Au obtidas a partir da preparação sem adição de Cu^{2+}. Aumento de 150.000 vezes.

A distribuição desta preparação está apresentada na Figura 50.

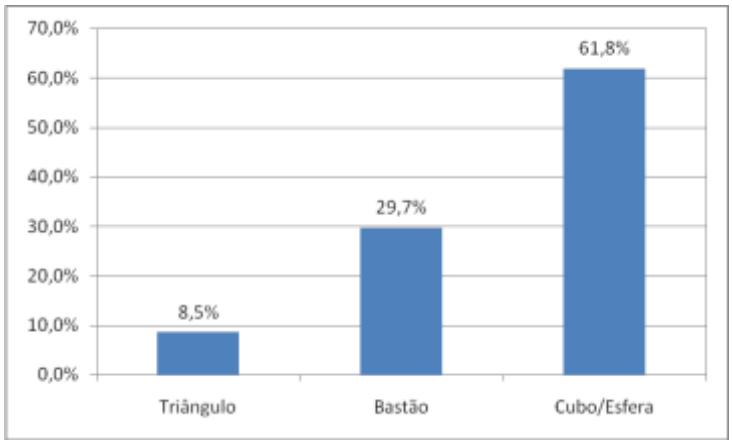

Figura 50 – Distribuição das NP-Au obtidas a partir da preparação sem adição de Cu^{2+} (triângulo, bastão e cubo/esfera).

Assim, como o objetivo da preparação era obter NB-Au, foi encontrada a distribuição do comprimento e largura dos NB-Au que é apresentada por meio de histogramas, contendo o desvio padrão na Figura 51.

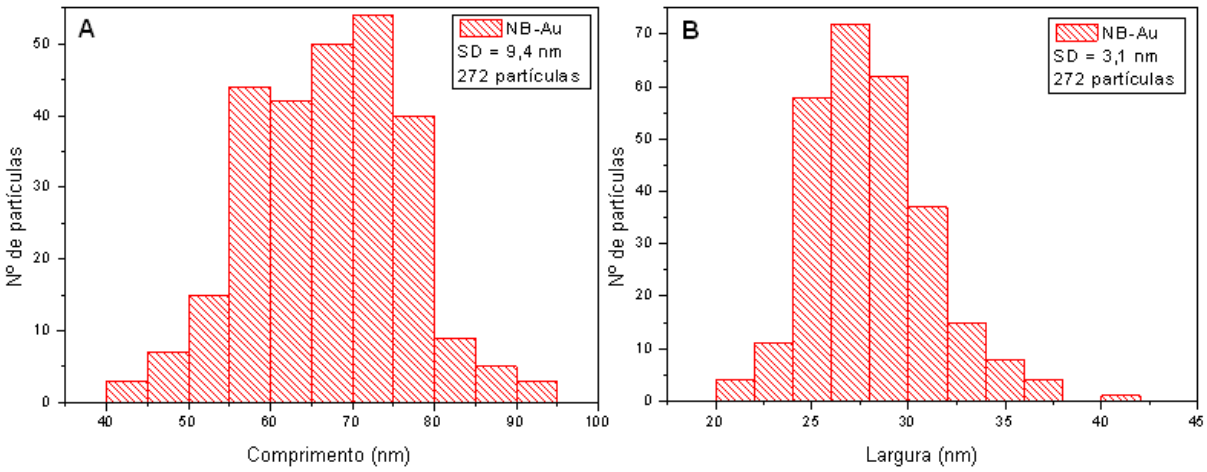

Figura 51 – A) Histograma do comprimento (SD = 9,4 nm); B) Histograma da largura (SD = 3,1 nm) dos NB-Au obtidos a partir da preparação sem adição de Cu^{2+}.

Baseando-se nos histogramas, a distribuição do comprimento está majoritariamente entre 55 e 80 nm (SD = 9,4 nm) e a largura entre 24 e 31 nm (SD = 3,1 nm).

O interesse na formação de NB-Au está relacionado à possibilidade de se obter o efeito SERS, sabendo-se que em estruturas com pontas, ocorre uma concentração do campo elétrico. Assim, pelo fato do espalhamento Raman estar associada ao campo elétrico, NB-Au podem ser utilizados com a finalidade de intensificação do sinal Raman por meio do efeito SERS, pois têm como característica um campo elétrico local significativo e concentrado.

Também, outro critério para que o fenômeno SERS ocorra é o tamanho das NP, que deve estar entre 10-100 nm (AROCA, 2006). Neste caso, os NB-Au preparados estão nesta ordem de grandeza. Portanto, podem ser estruturas com potencial para superfícies SERS-ativas.

Em análises quantitativas que utilizam o efeito SERS como sinal proporcional à concentração do analito, é necessário que as NP sintetizadas sejam homogêneas, de modo que a intensificação gerada seja constante. Para isto, o comprimento e largura dos NB-Au devem estar centrados em uma faixa menor de distribuição de

tamanho (largura da banda do espectro de extinção à meia altura deve ser estreita). No entanto, neste trabalho o objetivo era uma caracterização qualitativa das biomoléculas. Assim, focou-se na obtenção NP-Au, independentemente da homogeneidade do sistema. No entanto, quando a relação intensidade do sinal Raman *vs* concentração for um objetivo, é necessário que as formas e tamanhos das NP sejam homogêneos. Desta maneira, a técnica SERS pode tornar-se uma ferramenta analítica bastante interessante, pois além do seu potencial para determinar a orientação das biomoléculas e suas conformações, pode intensificar os sinais para posterior correlação com a concentração de um analito, por exemplo.

A seguir são apresentados os espectros de extinção (Figura 52) e imagens MEV (Figuras 53, 54 e 55) das variações feitas no preparo de NC-Au, isto é, variando-se o volume de semente (*seed*) adicionado (2,5; 5,0 e 10 µL) à solução de crescimento, bem como da concentração de Au^{3+} nesta solução (1,5; 2,0; 2,4; 2,5 e 3,0 mmol L^{-1}).

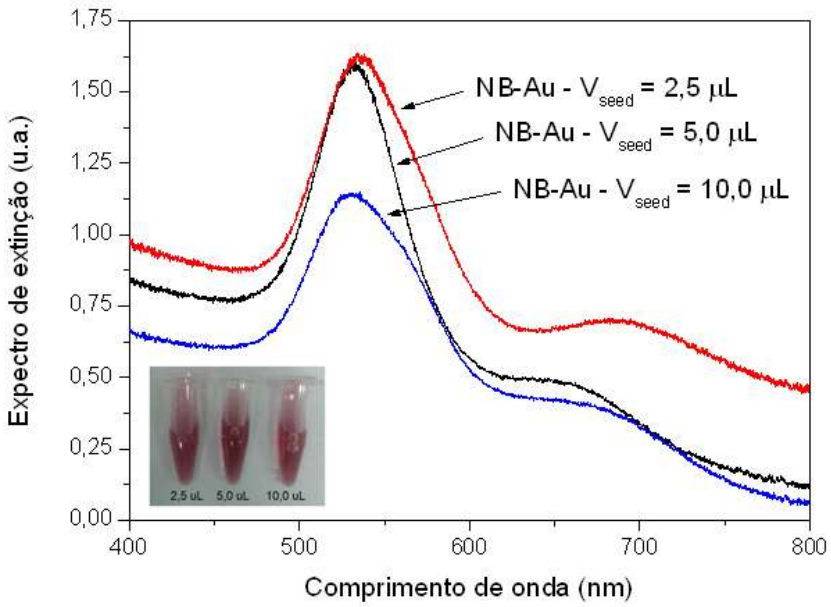

Figura 52 – Espectro de extinção de NP-Au que utilizou 2,5; 5,0 e 10,0 µL de solução semente.

Na Figura 53 observa-se que, ao se disponibilizar uma quantidade menor de sementes para o crescimento das NP-Au, há o favorecimento no processo de alongamento dos bastões, dado o aumento da intensidade das bandas associadas ao eixo longitudinal, bem como do deslocamento desta banda para maior comprimento de onda, evidenciando o crescimento dos NB-Au. Assim, os dados indicam que menor quantidade de semente permite que o Au^+ seja disponibilizado para o crescimento de menor quantidade de partículas na face [111], favorecendo-se o aumento dos NB-Au. No entanto, essa modificação não permite a obtenção majoritária de NB-Au, apresentando apenas uma tendência à formação. As imagens MEV das NP-Au sintetizadas por meio desta variação são apresentadas nas Figuras 53, 54 e 55.

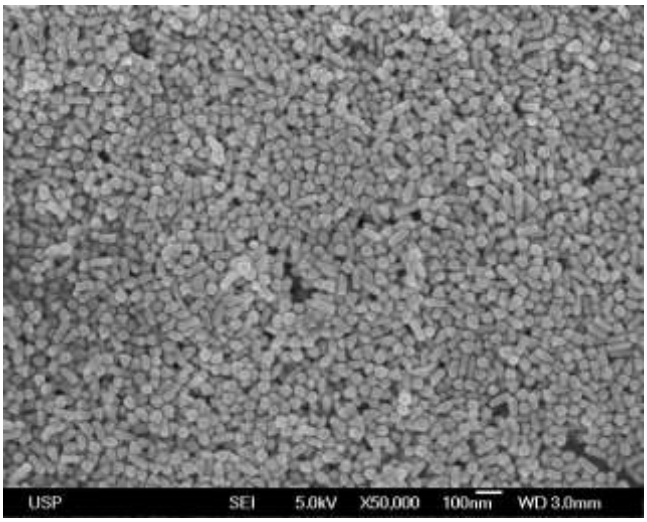

Figura 53 – Imagem de MEV da preparação de NB-Au que utilizou 2,5 μL de solução semente.

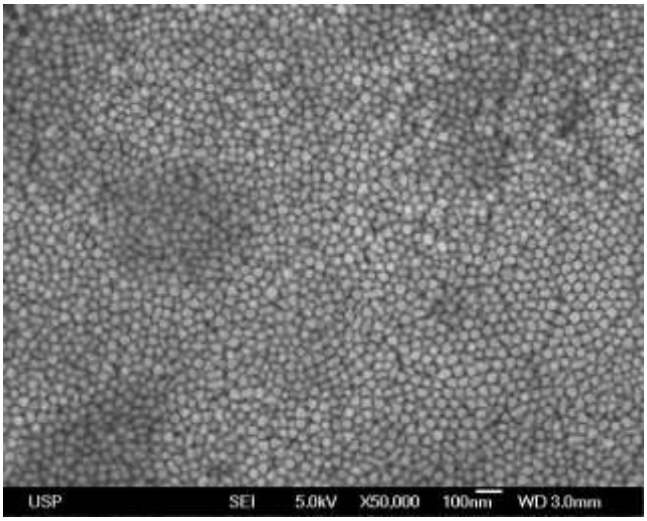

Figura 54 – Imagem de MEV da preparação de NB-Au que utilizou 5,0 μL (volume referência) de solução semente.

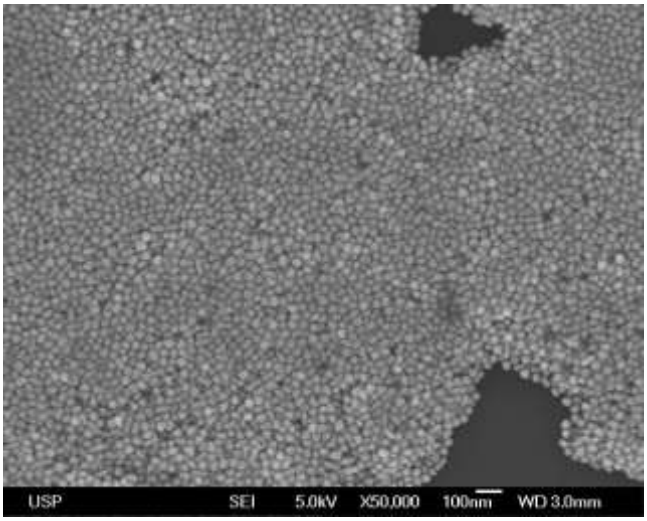

Figura 55 – Imagem de MEV da preparação de NB-Au que utilizou 10,0 μL de solução semente.

As imagens MEV corroboram com a informação extraída por meio do espectro de extinção: existência de maior quantidade de NB-Au na preparação que utilizou 2,5 μL de semente. Em relação ao espectro de extinção, a banda em aproximadamente 700 nm fornecia indícios de que a solução era majoritariamente formada por NP-Au de menor tamanho, dada a intensidade da banda em aproximadamente 500 nm.

Em relação às NP-Au obtidas a partir da modificação da concentração de Au^{3+}, são apresentados os espectros de extinção e MEV nas Figuras 56 e 57 a 60, respectivamente.

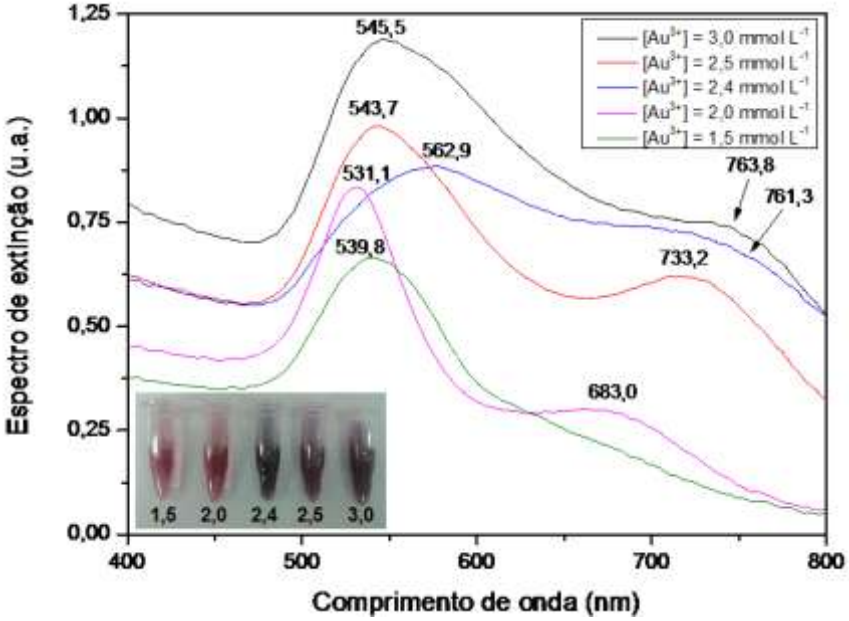

Figura 56 – Espectro de extinção de NP-Au com variação da $[Au^{3+}]$ (1,0; 1,5; 2,0; 2,4; 2,5; 3,0 mmol L^{-1}).

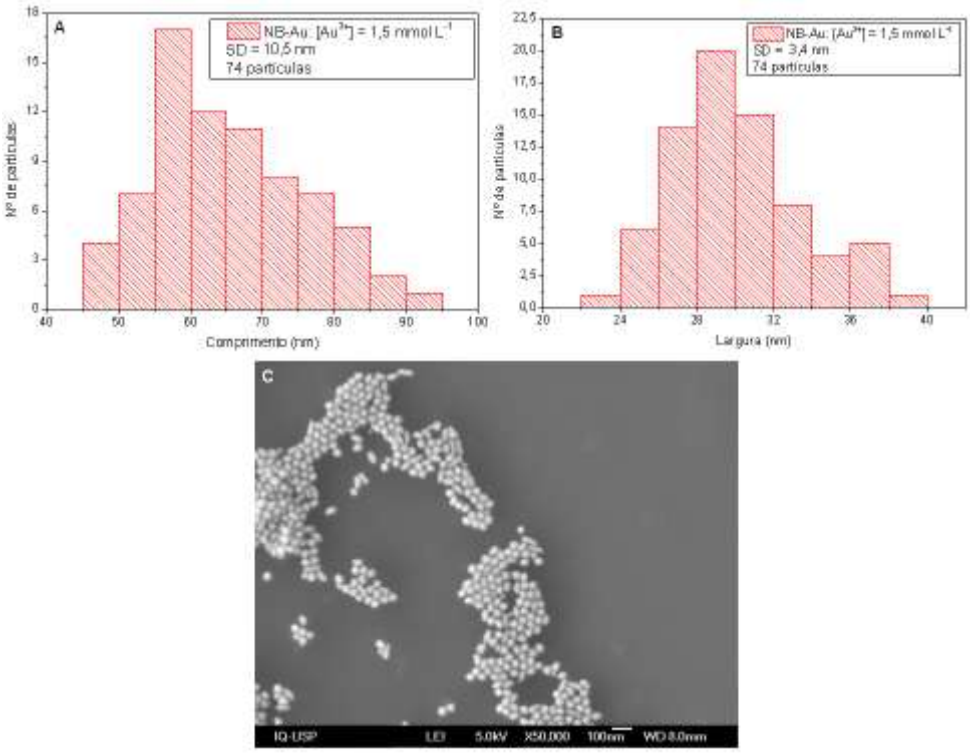

Figura 57 – A) Histograma do comprimento (SD = 10,5 nm); B) Histograma da largura (SD = 3,4 nm) dos NB-Au obtidos a partir da preparação sem adição de Cu^{2+} e $[Au^{3+}]$ = 1,5 mmol L^{-1}; C) Imagem MEV.

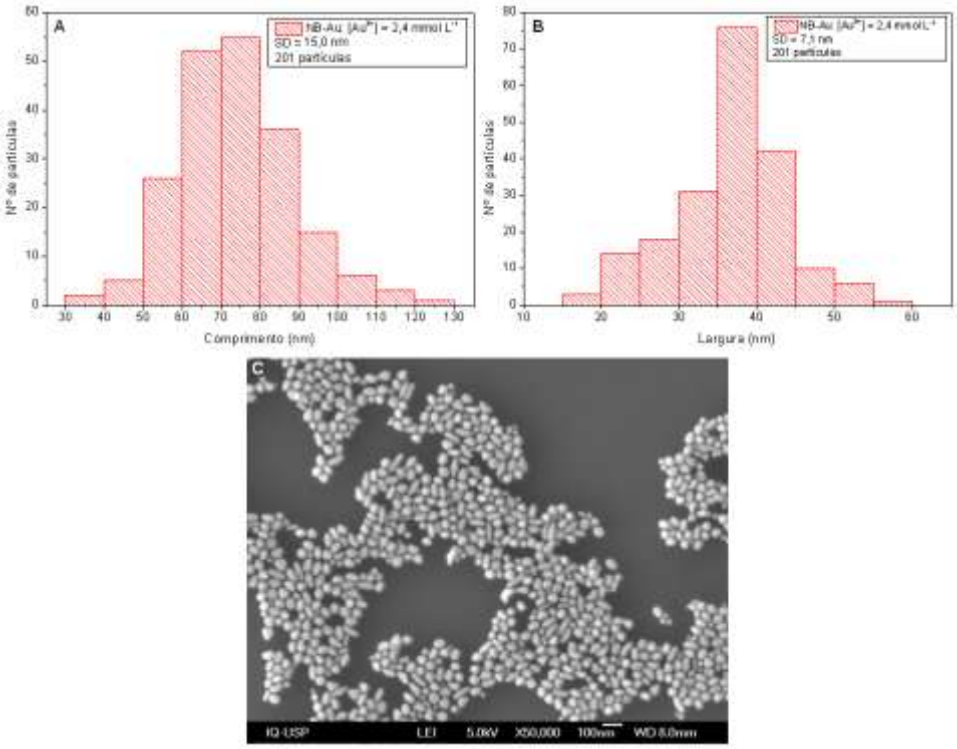

Figura 58 – A) Histograma do comprimento (SD = 15,0 nm); B) Histograma da largura (SD = 7,1 nm) dos NB-Au obtidos a partir da preparação sem adição de Cu^{2+} e $[Au^{3+}]$ = 2,4 mmol L^{-1}; C) Imagem MEV.

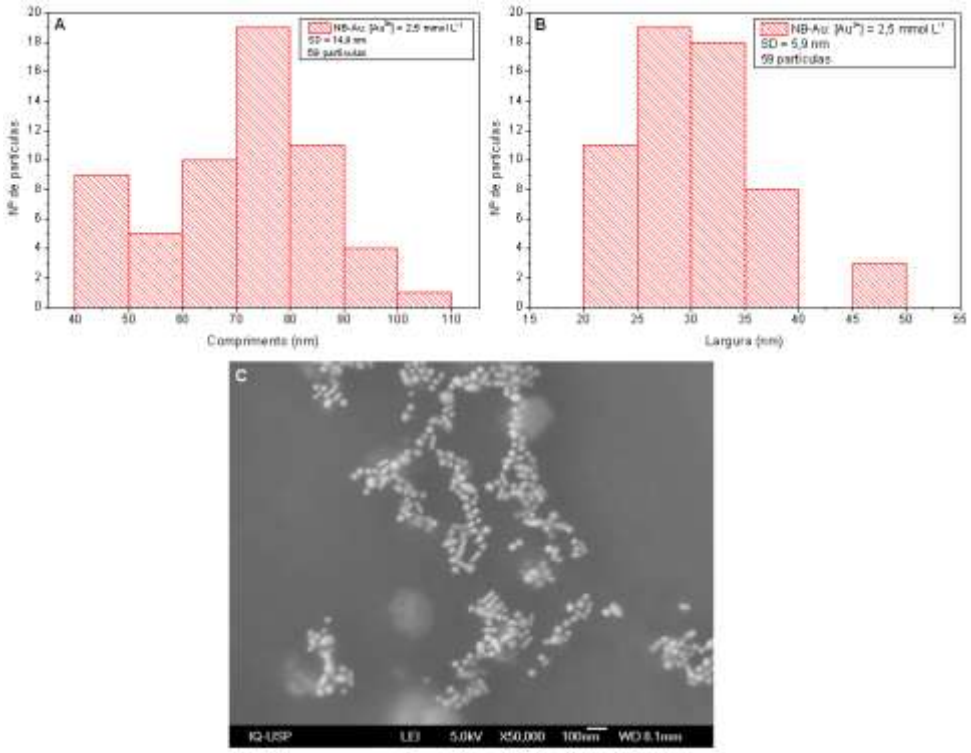

Figura 59 – A) Histograma do comprimento (SD = 14,8 nm); B) Largura (SD = 5,9 nm) dos NB-Au obtidos a partir da preparação sem adição de Cu^{2+} e $[Au^{3+}]$ = 2,5 mmol L^{-1}; C) Imagem MEV.

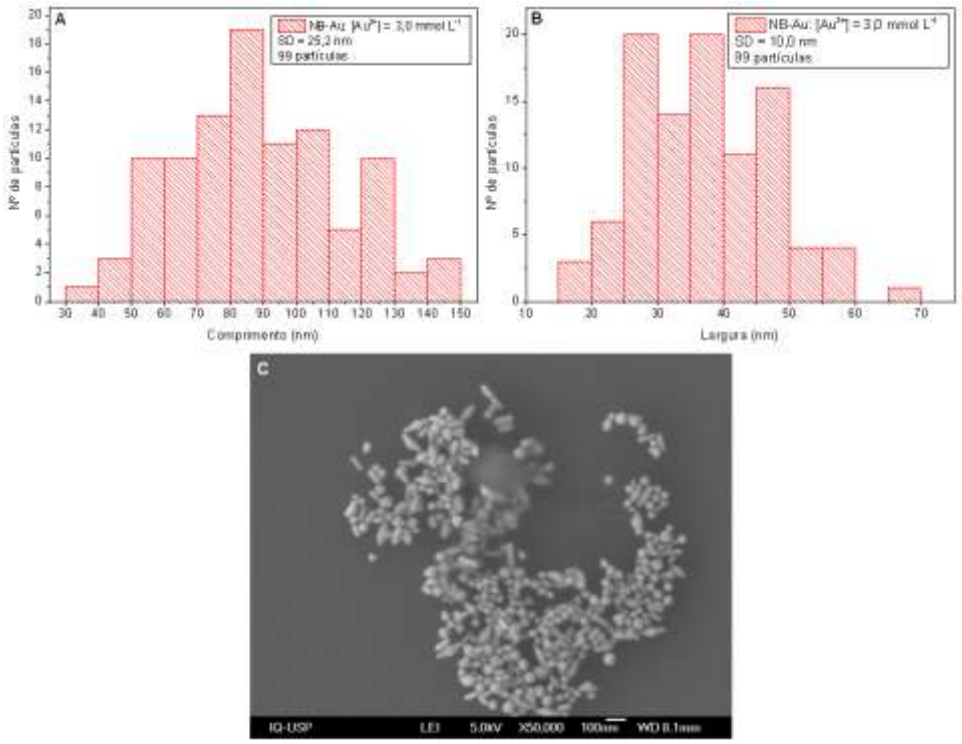

Figura 60 – A) Histograma do comprimento (SD = 25,2 nm); B) Histograma da largura (SD = 10,0 nm) dos NB-Au obtidos a partir da preparação sem adição de Cu^{2+} e $[Au^{3+}]$ = 3,0 mmol L^{-1}; C) Imagem MEV.

Considerando-se a distribuição do comprimento e largura dos NB-Au gerados a partir da modificação da preparação proposta por Sun e colaboradores, conclui-se que a menor distribuição nas dimensões dos bastões corresponde à metodologia que envolveu o uso de Au^{3+} 2,4 mmol L^{-1}. Neste sentido, para o uso da técnica SERS como ferramenta analítica, a busca por estruturas com menor distribuição de tamanho e forma das NP é um objetivo para que haja uma boa correlação entre sinal e concentração da molécula alvo, principalmente em regiões onde os campos elétricos ocorrerão, de modo a se gerar intensificações de sinais SERS reprodutíveis.

Embora a preparação que gerou NB-Au em quantidade significativa corresponda àquela que utilizou Au^{3+} 2,4 mmol L^{-1}, o espectro de extinção (Figura 56) apresenta bandas largas, o que caracteriza uma maior dispersão no tamanho das NP-Au, sendo que esta tendência é observada na imagem MEV (Figura 58). Porém, nas outras preparações, as bandas estreitas que poderiam ser correlacionadas às larguras dos NB-Au (entre 530-560 nm) estão mais associadas às esferas formadas, conforme pode ser observado nas imagens MEV, onde há majoritariamente este tipo de estrutura, com exceção da preparação que envolveu Au^{3+} 2,4 mmol L^{-1}, na qual há maior crescimento do eixo longitudinal.

Assim, em termos de potencialidade para obtenção de NB-Au, as preparações que envolveram o uso de 2,5 µL de solução semente e Au^{3+} 2,4 mmol L^{-1} são àquelas que poderiam ser exploradas para se obter superfícies SERS-ativas com o objetivo de promover maior intensificação do campo elétrico em NP devido à existência de pontas.

4.6 Avaliação do processo de adsorção de IgGh e de seu fragmento F(ab)' por meio de microbalança de cristal de quartzo (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring – QCM-D)

Para avaliar se a interação entre IgGh ou de seus fragmentos F(ab)' (em tampão de ligação) e superfície de Au ocorreria por processo de quimissorção ou fisissorção, utilizou-se a técnica de QCM-D, onde se avalia o aumento de massa sobre um sensor de Au, a partir da diminuição do sinal de frequência de um cristal de quartzo. Na Figura 61 apresenta-se a variação de massa sobre o sensor de Au e, consequentemente, diminuição da frequência deste.

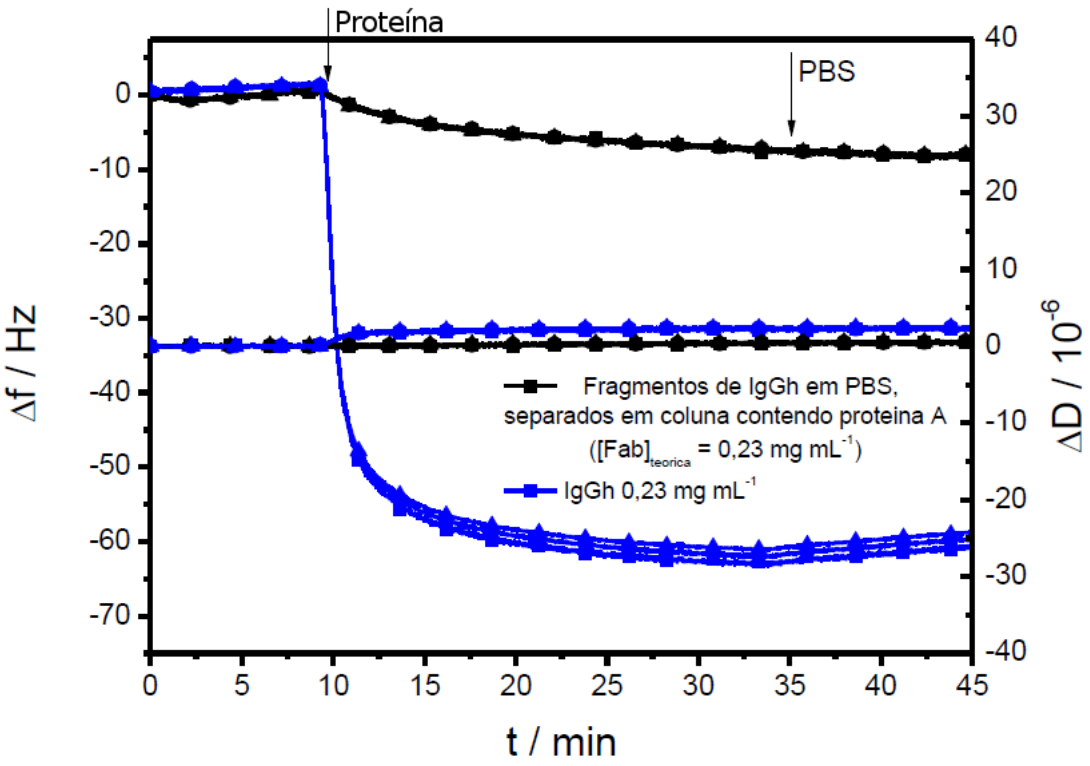

Figura 61 – Variação de frequência do sensor de QCM-D associado à deposição de massa de IgGh ou de seus fragmentos que não interagiram com proteína A imobilizada em coluna.

Para construção do gráfico apresentado na Figura 61, foram utilizados os harmônicos 5, 7 e 9. Como se pode observar, tanto IgGh quanto seus fragmentos

F(ab)' contidos em PBS interagem com a superfície de Au por meio de adsorção química, pois mesmo após a lavagem da superfície com tampão PBS, não há retorno do sinal à linha base. Caso a interação proteína-superfície de Au fosse devido à adsorção física, no processo de lavagem com tampão PBS, as proteínas sairiam nesta etapa e a frequência do sensor voltaria à linha base. Neste caso, observa-se que uma quantidade pequena de IgGh estava fisissorvida, sendo que o sinal de frequência aumentou ligeiramente após a etapa de lavagem do sensor.

Na literatura, um trabalho realizado por Zhou e colaboradores apresenta a adsorção de IgGh detectada pelas técnicas QCM-D, AFM, SAW e SPR. Nesse estudo, demonstra-se que o processo de adsorção sobre o sensor de Au da QCM é um processo de adsorção química (ZHOU *et al*., 2004). Neste caso, o presente trabalho está de acordo com a literatura.

4.7 Caracterização espectroscópica de biomoléculas

Após a constatação da imobilização das biomoléculas sobre Au, via técnica QCM-D, procedeu-se com a caracterização espectroscópica por meio da técnica Raman (sem imobilização das biomoléculas) e SERS (com imobilização dos anticorpos ou de seus fragmentos), a fim de se conhecer as principais bandas relacionadas à conformação dessas biomoléculas e suas orientações sobre superfícies SERS-ativas.

4.7.1 IgGh

A seguir, é apresentado na Figura 62 o espectro Raman de IgGh 160 mg mL^{-1}.

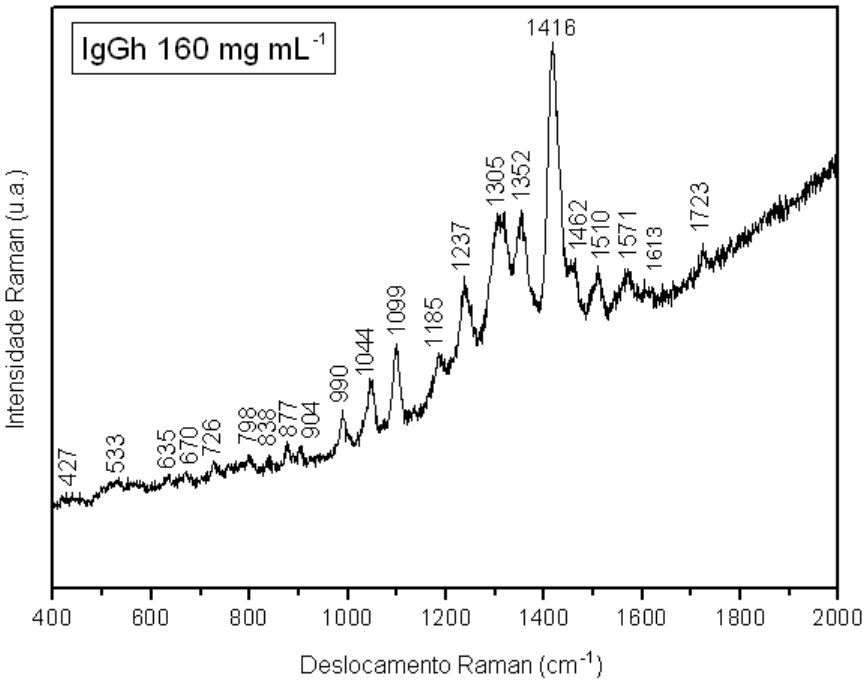

Figura 62 – Espectro Raman de IgGh 160 mg mL^{-1} adquirido utilizando-se laser 632,8 nm.

Na Tabela 17 são apresentadas as atribuições das bandas de IgGh, com base na literatura, para caracterização e posterior comparação com os anticorpos imobilizados sobre as NP-Au.

Tabela 17 – Bandas Raman e atribuições para IgGh concentrada.

Deslocamento Raman (cm^{-1})	Intensidade	Atribuição	Aminoácido
427	mf, ampla	–	–
533	mf, ampla	–	–
635	mf	–	–
670	mf	ν(C–S)[1]	Cys
726	f	$\delta(COO^-)$[2]	Glu, Asp
798	f	ν(anel)[1]	Trp
838	f	fora do plano δ(anel)[2]	Tyr
877	f	ν_s(anel)[1,3,4] ν(indol N–H)[2] ν(C–C)[2]	Tyr, Trp
904	f	–	Trp[5]
990	m	ν(C–C)[2]	Asp, Glu
1044	m	ν(anel)[1]	Trp
1099	m	–	Trp, Tyr[5]
1185	f	δ(anel)[1]	Tyr
1237	m	ν(C–N)[3,4] δ(N–H)[3,4] Anel[2]	Amida III[4], Trp[2]
1305	F	ν(anel)[5]	Trp, Tyr
1352	F	ν(anel) [1,2,3,4] δC–H[4]	Trp
1416	MF	ν(C=O)[1,3]	Asp, Glu
1462	f	$\delta(CH_2)$[5]	Trp
1510	m	ν(anel)[6]	Trp, Tyr
1571	m	ν(anel)[1,6]	Trp, Tyr
1613	mf	ν(anel)[1] em fase ν(C2–C3)[2] em fase ν(C5–C6)[2] N–H[1]	Trp, Tyr
1723	f	ν(C=O)[1]	Asp

mf = muito fraca; f = fraca; m = média; F = forte; MF = muito forte; ν = estiramento; δ = deformação

1 = GRABBE & BUCK, 1989;
2 = STEWART & FREDERICKS, 1999;
3 = AREÂS & KAWANO, 1991;
4 = PEZOLET *et al*., 1976;
5 = ZHANG *et al*., 2008;
6 = COMBS *et al*., 2010.

De acordo com a literatura (ARÊAS & KAWANO, 1991; PEZOLET et al., 1976), um dubleto seria esperado em 830/850 cm^{-1} referente à ressonância de Fermi e a razão entre as intensidades destas bandas, I(850)/I(830), pode indicar a influência das ligações de hidrogênio envolvendo a Tyr. No caso de moderada ligação de hidrogênio, a proporção deve ser 10:8, enquanto que para forte ligação de hidrogênio, deve ser 5:10. Em um estudo feito por Pezolet e colaboradores, IgGh em pH 7 apresentou uma proporção de 10:7, concluindo que as Tyr no interior da proteína poderiam não estar acessíveis ao solvente e, portanto, não poderiam resultar em forte ligação de hidrogênio. No presente estudo, uma banda fraca em 838 cm^{-1} foi identificada. No entanto, uma banda próxima à 850 cm^{-1} não é observada. Sabe-se que a intensidade Raman é proporcional à potência do laser incidida na amostra (Equação 1) (SALA, 2008). Por isso, para inferir a força da ligação de hidrogênio referente às Tyr seria necessário fazer aquisição do espectro Raman de IgGh concentrada, utilizando-se maior potência do laser.

Em relação ao Trp, duas bandas revelam o microambiente onde este aminoácido está inserido. Segundo a literatura (PEZOLET *et al.*, 1976), bandas em 879 e 1359 cm^{-1} têm suas intensidades aumentadas pelo fato do grupo indol, presente na cadeia lateral deste aminoácido, ser protegido da solvatação. No presente estudo, foram identificadas bandas em 877 e 1352 cm^{-1}, sendo atribuídas ao Trp.

Uma banda que ocorre em 1240 $\pm$ 3 cm^{-1} é atribuída à amida III (ARÊAS & KAWANO, 1991; PEZOLET *et al.*, 1976). Neste estudo, esta banda foi identificada em 1237 cm^{-1} com intensidade média, sendo atribuída à estrutura folha-β. Na literatura (PEZOLET *et al.*, 1976), às IgG é atribuída a estrutura folha-β antiparalela.

A banda em 1416 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento C=O (ARÊAS & KAWANO, 1991; GRABBE & BUCK, 1989), referente aos aminoácidos ácidos Arg e Glu (ARÊAS & KAWANO, 1991).

Na Figura 63 são apresentados os espectro SERS de IgGh 160 mg mL^{-1} adquiridos em diferentes pontos da solução. É possível observar que, embora as intensidades das bandas sejam diferentes, os espectros são reprodutíveis, o que é uma vantagem na proposta para construção de sensores. Também, vale destacar que não houve o uso de *link* entre o anticorpo e as NP-Au e que as intensidades do espectro são compatíveis com processos de quimissorção.

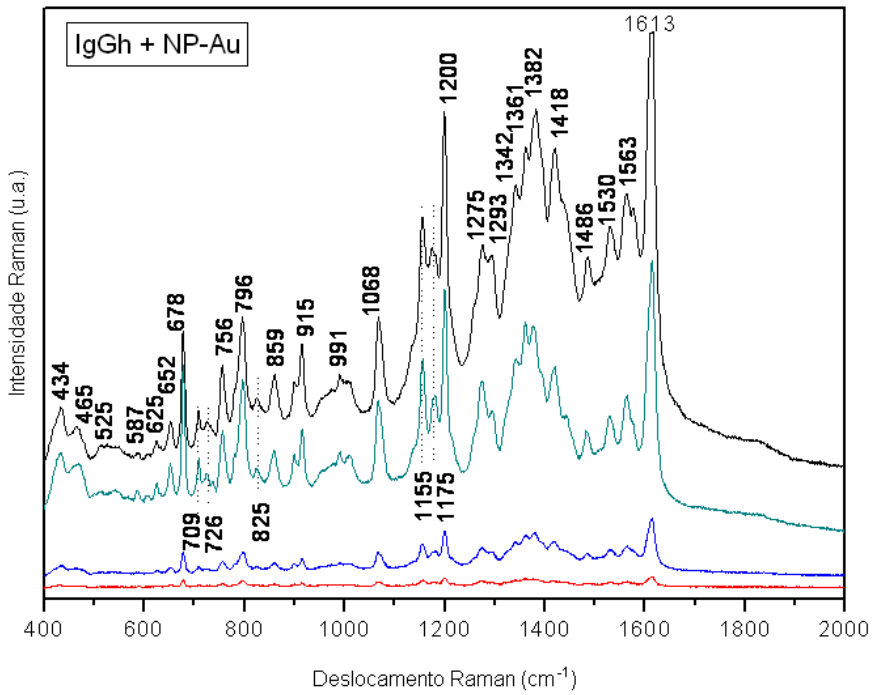

Figura 63 – Espectros SERS de IgGh 160 mg mL^{-1} reprodutíveis (adquiridos em diferentes pontos e utilizando-se laser 632,8 nm).

A partir de dados presentes na literatura, foram feitas atribuições às bandas relacionadas aos modos vibracionais. Na Tabela 18 são apresentadas as bandas Raman e SERS de IgGh para posterior comparação.

Tabela 18 – Bandas Raman e SERS de IgGh 160 mg mL^{-1}.

Bandas Raman Desloc. Raman (cm^{-1})	**Intensidade**	**Bandas SERS Desloc. Raman (cm^{-1})**	**Intensidade**
427	mf, ampla	434	f
		465	f
533	mf, ampla	525	f, ampla
		587	mf
635	mf	625	mf
		652	f
670	mf	678	m
		709	f
726	f	726	mf
		756	m
798	f	796	m
838	f	825	mf
877	f	859	f
904	f	915	m
990	m	991	m, ampla
1044	m	1068	m
1099	m		
1185	f	1155	F
		1175	F
		1200	MF
1237	m	1275	F
		1293	F
1305	F	1342	F
1352	F	1361	F
		1382	MF
1416	MF	1418	F
1462	f	1486	m
1510	m	1530	m
1571	m	1563	m
1613	mf	1613	MF
1723	f	–	–

mf = muito fraca; f = fraca; m = média; F = forte; MF = muito forte

Quando as IgGh interagem com a superfície metálica (NB-Au), a interação (fisissorção ou quimissorção) ocorre por meio de aminoácidos específicos. Um

estudo feito por Grabbe e Buck, utilizando IgGh em contato com um eletrodo de Ag demonstrou, por meio da análise do espectro SERS de IgGh, as possíveis orientações desta proteína de acordo com as bandas associadas aos seus modos vibracionais. Primeiramente, foi atribuída uma banda em 678 cm^{-1} como sendo um estiramento C–S de cistina. Também, apontou-se uma banda em 509 cm^{-1} como sendo deste aminoácido, mas este correspondendo ao estiramento S–S. Baseando-se nisto, a proposta feita sobre a maneira como este aminoácido se orienta sobre a superfície de Ag é ilustrada na Figura 64.

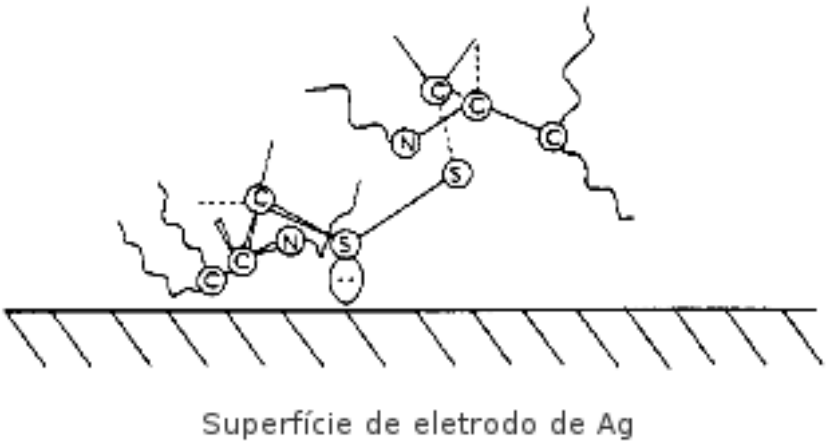

Figura 64 – Provável orientação de cistina presente em IgGh sobre superfície de eletrodo de Ag (-0,5 V e tampão fosfato 0,25 mol L^{-1}) (Adaptado de GRABBE & BUCK, 1989).

Comparando-se os espectros Raman e SERS (Tabela 18) é possível verificar que uma banda muito fraca em 670 cm^{-1} ocorria quando IgGh estava em solução e após interação com os NB-Au uma banda de intensidade mediana aparece em 678 cm^{-1}, sendo-lhe atribuído o estiramento C–S dos aminoácidos Cys e Met. No caso da primeira, se esta estiver ligada perpendicularmente à superfície, terá seu sinal Raman intensificado de maneira mais pronunciada. Como nenhuma banda em torno de 509 cm^{-1} foi identificada, não é possível assumir que nessas condições a

orientação de cistina sobre a superfície de Au se deu da maneira como a proposta por Grabbe e Buck.

Em relação à possível orientação de Trp, indica que esta ocorre por meio do N do grupo indol da cadeia lateral. A base para esta afirmação baseia-se no fato das vibrações associadas à “respiração do anel” em 1487 cm^{-1}, bem como os modos vibracionais associados ao C_4–C_9, C_8–N_1, C_7–C_8 e C_9–C_3 em 1605 cm^{-1}, quando comparados com espetro Raman apresentam intensificação significativa, indicando que a orientação deste aminoácido sobre a superfície metálica se dá como a proposta na Figura 65 (GRABBE & BUCK, 1989).

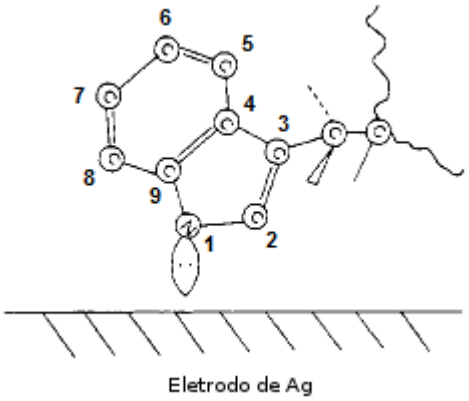

Figura 65 – Provável orientação de Trp presente em IgGh sobre superfície de eletrodo de Ag (-0,5 V, tampão fosfato 0,25 mol L^{-1} e pH 7,2) (Adaptado de GRABBE & BUCK, 1989).

Além do que, a banda em 1562 cm^{-1}, referente ao estiramento C_8–C_9, não é intensificada se estiver paralelo à superfície metálica, o que condiz com a proposta feita por eles. Em relação ao presente estudo, bandas intensas em 1486 e 1613 cm^{-1} ocorrem e pelo fato da solução ter a mesma concentração daquela que gerou o espectro Raman, uma banda em 1571 cm^{-1} e uma em 1563 cm^{-1} no espectro SERS possuem intensidade mediana em ambos os casos. Assim, pode-se inferir que a orientação do Trp está em acordo com a proposta feita na literatura (GRABBE & BUCK, 1989).

Uma proposta da orientação da Tyr também foi feita por Grabbe e Buck e é representada pela Figura 66.

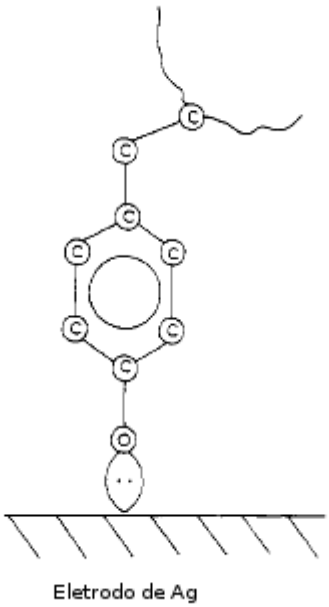

Figura 66 – Provável orientação de Tyr presente em IgGh sobre superfície de eletrodo de Ag (-0,5 V, tampão fosfato 0,25 mol L^{-1} e pH 7,2) (Adaptado de GRABBE & BUCK, 1989).

Os modos vibracionais do anel fenila que estiverem perpendiculares à superfície serão intensificados. Neste caso, as bandas em 1187 e 1487 cm^{-1} foram atribuídas por Grabbe e Buck como as mais intensas, caso este aminoácido se oriente como proposto na Figura 66. De maneira semelhante, no presente estudo, bandas fracas em 1185 e 1462 cm^{-1} tornaram-se forte e média em 1175 e 1486 cm^{-1}, respectivamente. Assim, essa é uma possível orientação da Tyr descrita na literatura (GRABBE & BUCK, 1989).

No espectro SERS de IgGh 160 mg mL^{-1}, os modos vibracionais associados ao anel do aminoácido His em 1175 (deformação N–H), 1200 (deformação do anel imidazol), 1275 (deformação C–H) e 1293 cm^{-1} (deformação C–H) correspondem à bandas intensas (STEWART & FREDERICKS, 1999).

No caso dos aminoácidos ácidos Asp e Glu, uma banda intensa em 1418 cm^{-1} ocorre tanto em espectro Raman quanto em SERS e é atribuída ao estiramento C=O (ARÊAS & KAWANO, 1991; GRABBE & BUCK, 1989). A orientação deste aminoácido sobre a superfície não deve ocorrer por este grupo, visto que uma banda em 726 cm^{-1}, referente à deformação C=O (STEWART & FREDERICKS, 1999), permanece com fraca intensidade em ambos os espectros. No entanto, um estudo feito por Stewart & Fredericks, apresentou bandas fortes em 718 e 721 cm^{-1} para Glu e Asp, respectivamente, pelo fato da orientação de aminoácidos isolados ser diferente daqueles presentes em ligações peptídicas.

Outras bandas que se destacam no espectro SERS com intensidades média e forte podem ser atribuídas ao Trp, referentes à respiração simétrica do anel indol (756 cm^{-1}) e estiramentos do anel em 1342 e 1361 cm^{-1}, respectivamente (STEWART & FREDERICKS, 1999; ZHANG *et al*., 2008; COMBS *et al*., 2010). Uma banda forte em 1155 cm^{-1} associada à deformação de C–H do anel e outra muito intensa em 1382 cm^{-1} relacionada ao estiramento deste foram atribuídas à Tyr (GRABBE & BUCK, 1989; ZHANG *et al*., 2008).

Um experimento envolvendo aquisição de espectro SERS foi feito, porém, utilizando-se IgGh 8,7 mg mL^{-1} no processo de interação entre os NB-Au e a glicoproteína. Essa concentração de IgGh está dentro da faixa deste tipo de anticorpo encontrado no soro humano que é 8–16 mg mL^{-1} (HARLOW & LANE, 1988). A Figura 67 apresenta os espectros SERS obtidos em pontos distintos da solução.

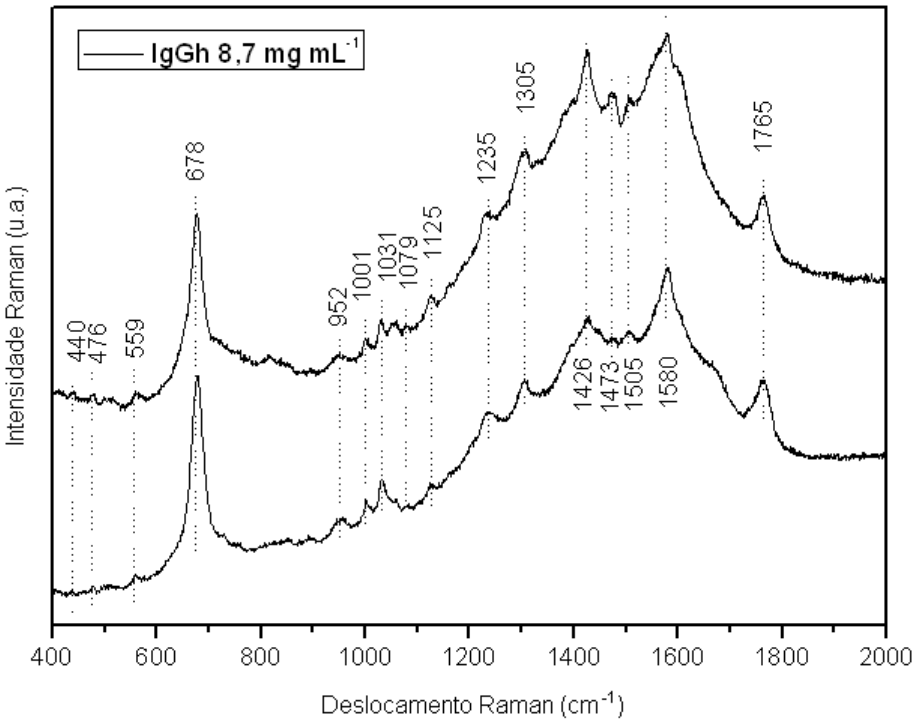

Figura 67 – Espectros SERS de IgGh diluída (8,7 mg mL^{-1}) adquiridos em pontos distintos da solução e utilizando-se laser 632,8 nm.

Observa-se que quando IgGh é diluída e interage com NB-Au, a banda em 678 cm^{-1} torna-se a mais intensa no espectro. Esta se refere ao estiramento C–S e, neste caso, pode-se afirmar que a orientação de Cys e Met em relação à superfície metálica ocorre de maneira perpendicular. A banda em 1418 cm^{-1} pode ter sofrido deslocamento para número de onda maior (1426 cm^{-1}), pois a força das ligações de hidrogênio em soluções diluídas diminui e, portanto, a constante de força de C=O de Asp e Glu pode ser aumentada (COLTHUP, 1990).

Na Figura 68 é apresentado o espectro SERS de fragmentos F(ab)' gerado por meio da protease papaína.

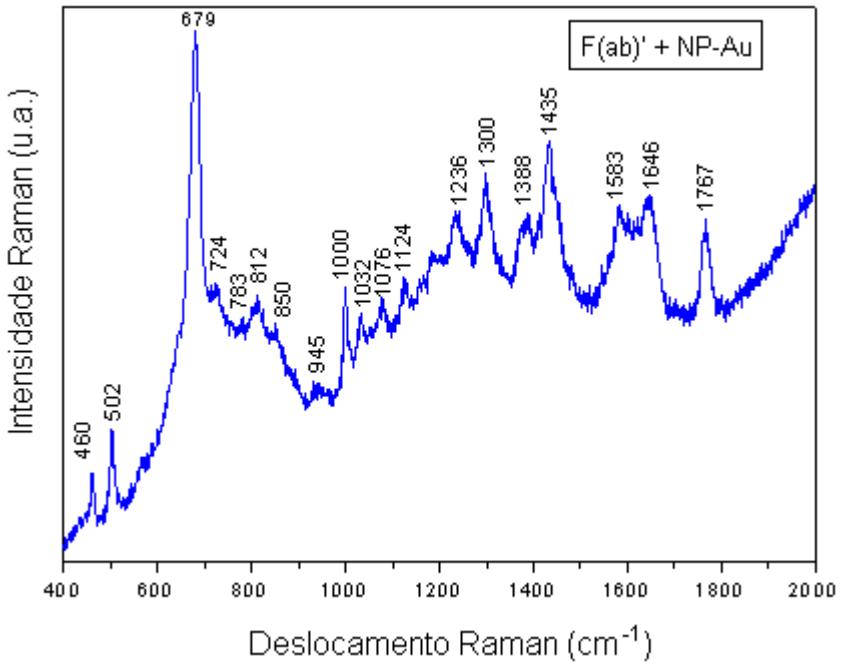

Figura 68 – Espectro SERS de fragmento F(ab)' adquirido utilizando-se laser 632,8 nm.

Observa-se que a banda em 679 cm^{-1}, referente ao estiramento C–S (GRABBE & BUCK, 1989), que pode ocorrer na faixa de 630-790 cm^{-1} (BULKIN, 1991), é intensa e, novamente, pode-se inferir que a orientação de F(ab)', assim como de IgGh, ocorre perpendicularmente à superfície, permitindo a intensificação de tal modo vibracional. Observa-se também que uma banda em 502 cm^{-1} relacionada ao estiramento S–S (GRABBE & BUCK, 1989), que pode ocorrer na faixa de 430-550 cm^{-1} (BULKIN, 1991), é intensificada. Este é um indício de que as pontes de dissulfeto de cistinas em posição oposta ao paratopo do fragmento de IgGh, capazes de manter as cadeias leve e pesada unidas, podem estar disponíveis e interagindo com a superfície como foi proposto por Grabbe e Buck (Figura 64).

Também, que a orientação da IgGh sobre os NB-Au pode ser alterada de acordo com a concentração, tendo em vista que a banda 678 cm^{-1} em IgGh 8,7 mg mL^{-1} torna-se a banda principal. Sugere-se uma nova orientação sobre a superfície pela capacidade dos anticorpos, devido à existência da região de

dobradiça, distanciarem seus parotopos de 60 a 180° (ELGERT, 1996). Assim, esta região rica em ligações C–S poderia conferir uma nova orientação aos anticorpos. No entanto, tal característica estaria presente apenas nas IgG, IgA e IgD. A Figura 69 ilustra as possíveis orientações de IgGh 160 e 8,7 mg mL^{-1}, bem como dos fragmentos F(ab)'.

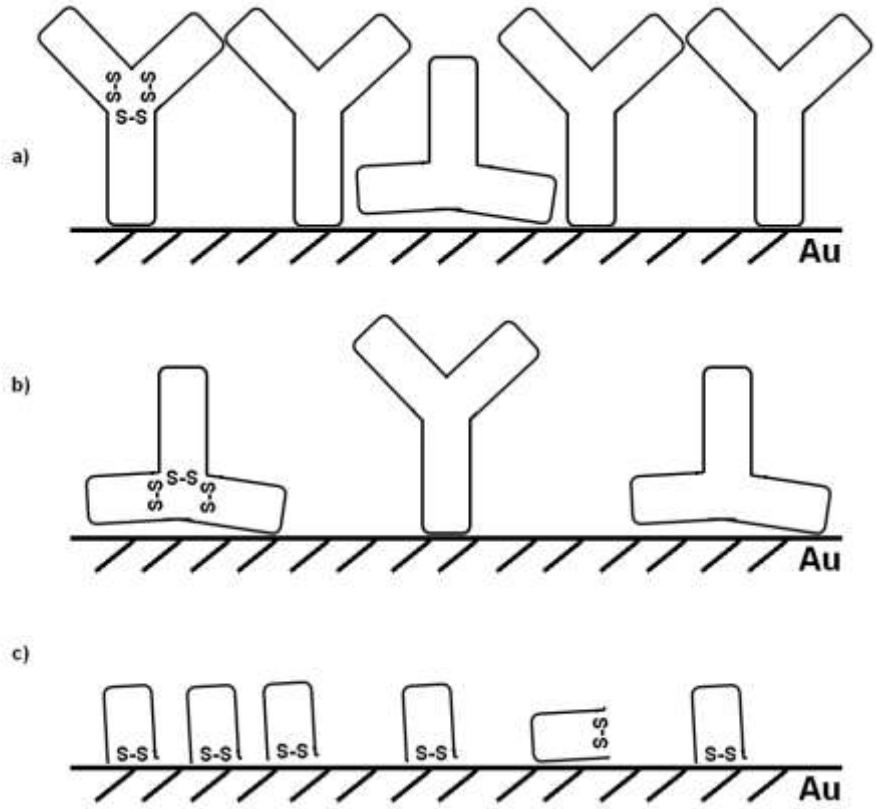

Figura 69 – Ilustração das possíveis orientações de IgGh concentrada (a), diluída (b) e fragmento F(ab)' de IgGh (c), onde S–S correspondem às ligações de dissulfeto na região de dobradiça e entre as cadeias pesada e leve.

Na Figura 70 são apresentados os espectros SERS de fragmentos F(ab)' em tampão de ligação (BB) e IgGh diluída.

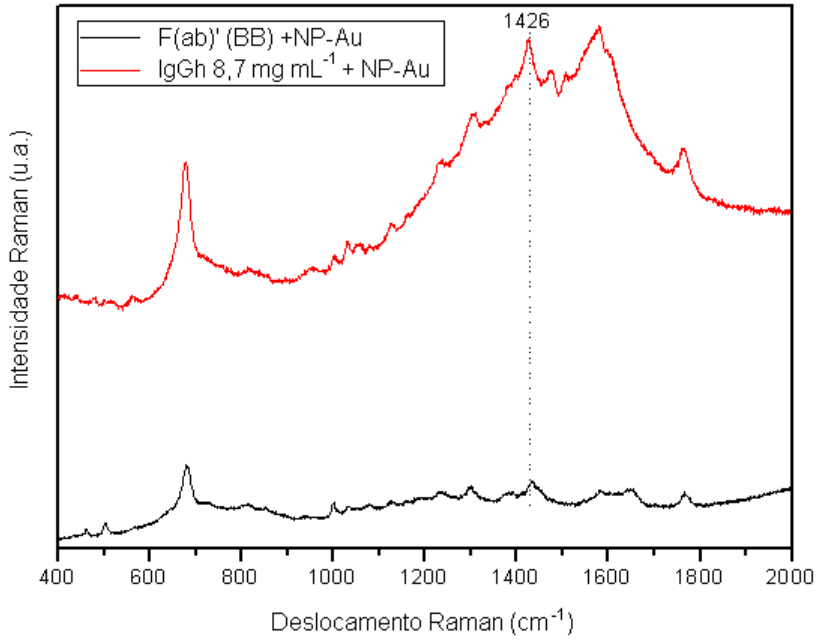

Figura 70 – Espectro SERS de fragmento F(ab)' em tampão de ligação – BB (preto) e de IgGh 8,7 mg mL^{-1} (vermelho) adquiridos utilizando-se laser 632,8 nm.

Observa-se que a banda em 1426 cm^{-1} referente a C=O tem sua intensidade diminuída. Assim, é possível inferir que a contribuição dos modos vibracionais dos aminoácidos Asp e Glu diminui quando se cliva IgGh.

4.7.2 Anti-IgGh (H+L)

Na Figura 71 é apresentado o espectro Raman de anti-IgGh (H+L) 35 mg mL^{-1} e a Tabela 19 com as atribuições das principais bandas Raman.

Em termos de organização da estrutura secundária, a banda em 1639 cm^{-1} pode ser atribuída à Amida I, cujo modo vibracional é decorrente principalmente do estiramento C=O (AREÂS & KAWANO, 1991; FERRARO & NAKAMOTO, 1994).

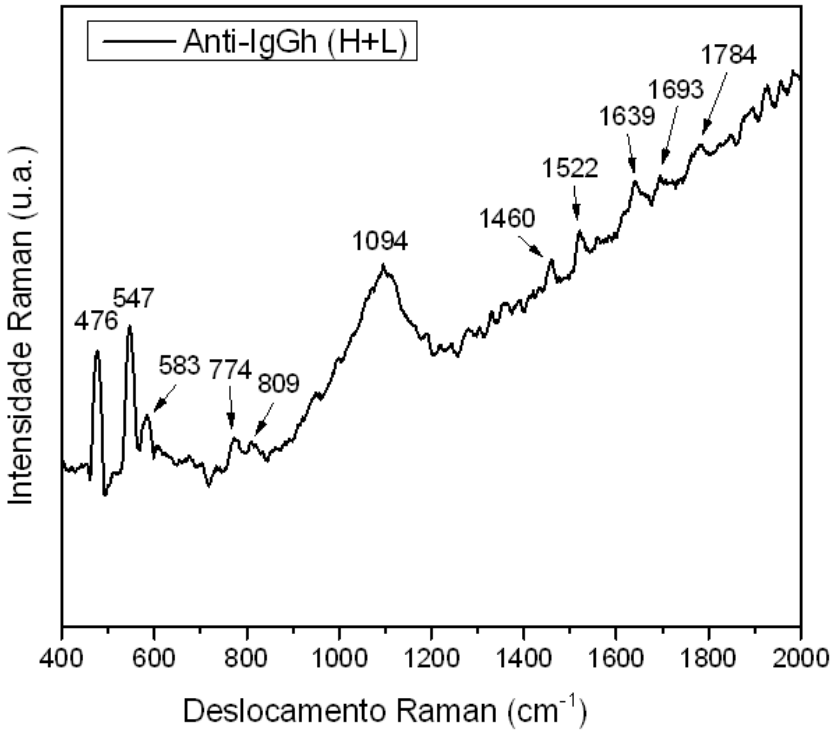

Figura 71 – Espectro Raman de anti-IgGh (H+L) 35 mg mL^{-1} adquirido utilizando-se laser 632,8 nm.

Tabela 19 – Bandas Raman e atribuições para anti-IgGh (H+L) 35 mg mL^{-1}.

Deslocamento Raman (cm^{-1})	Intensidade	Atribuição	Aminoácido
476	F	–	–
547	F	δPO_4^{3-}/[1]νS–S[2]	Met, Cys
583	f		
774	f	$\delta(COO^-)$[3]	Glu, Asp
809	f	ν(anel)[4]	Trp
1094	F, ampla	–	Trp, Tyr[5]
1460	f	$\delta(CH_2)$[5]	Trp
1522	f	ν(anel)[6]	Trp, Tyr
1639	m, ampla	ν(C=O)[7]	Amida I
1693	mf	–	–
1784	f, ampla	–	–

mf = muito fraca; f = fraca; m = média; F = forte; MF = muito forte; ν = estiramento; δ = deformação

1 = COLTHUP, 1990
2 = GNIADECKA *et al*., 1998
3 = STEWART & FREDERICKS, 1999;
4 = GRABBE & BUCK, 1989;
5 = ZHANG *et al*., 2008;
6 = COMBS *et al*., 2010;
7 = FERRARO & NAKAMOTO, 1994.

A banda larga em 1094 cm^{-1} pode ser atribuída à matriz na qual o anticorpo está inserido, isto é, em PBS. Pois, no espectro Raman o estiramento fora de fase do PO_4^{3-} (bandas fortes) ocorre entre 1100-940 cm^{-1}. Também, entre 650-530 cm^{-1} podem ser observados os modos vibracionais correspondentes sua deformação (COLTHUP, 1990). Na região de 1005 cm^{-1} ocorre a banda associada à Phe, porém, a ampla banda no espectro Raman encobriu a informação a respeito desse aminoácido (ARÊAS & KAWANO, 1991).

Considerando-se que há uma banda em 547 cm^{-1} e uma em 583 cm^{-1}, duas hipóteses são levantadas: 1) efeito do PBS; 2) estiramento S–S das ligações de dissulfeto. Considerando-se a segunda, bandas entre 500-550 cm^{-1} são características deste tipo de ligação (GNIADECKA *et al.*, 1998). A tal modo vibracional, as deformações podem ocorrer de acordo com o tipo de conformação C–S–S–C, de modo que bandas em deslocamentos Raman maiores são menos estáveis e correspondem aos estiramentos *gauche-gauche-gauche* e *trans-gauche-trans* (Figura 72). Assim, caso este modo vibracional da anti-IgGh (H+L) seja devido às ligações S–S, o estiramento será do tipo *trans-gauche-trans*.

Figura 72 – Ilustração do modo vibracional de ligação de dissulfeto para as conformações *trans*- e *gauche*- em C–S, S–S e S–C (GNIADECKA *et al.*, 1998).

Considerando-se que a composição majoritária de IgG humana em soro é de IgG_1 (HAMILTON, 1987) e esta possui a menor quantidade de ligações dissulfeto dentre os quatro tipos de subclasses (LIU & MAY, 2012), caso a banda em 547 cm^{-1}

de anti-IgGh (H+L) seja devido às ligações S–S, nota-se nitidamente a diferença entre as duas imunoglobulinas de diferentes espécies de mamíferos. Assim, essas diferenças poderiam ser bastante significativas em estudos que envolvessem o espectro SERS de anti-IgGh (H+L) ou de seus fragmentos F(ab)'.

4.7.3 Anti-IgGh (Fab_2)

A seguir, é apresentado na Figura 73 o espectro Raman de anti-IgGh (Fab_2) 35 mg mL^{-1} e a Tabela 20 com as atribuições das principais bandas Raman.

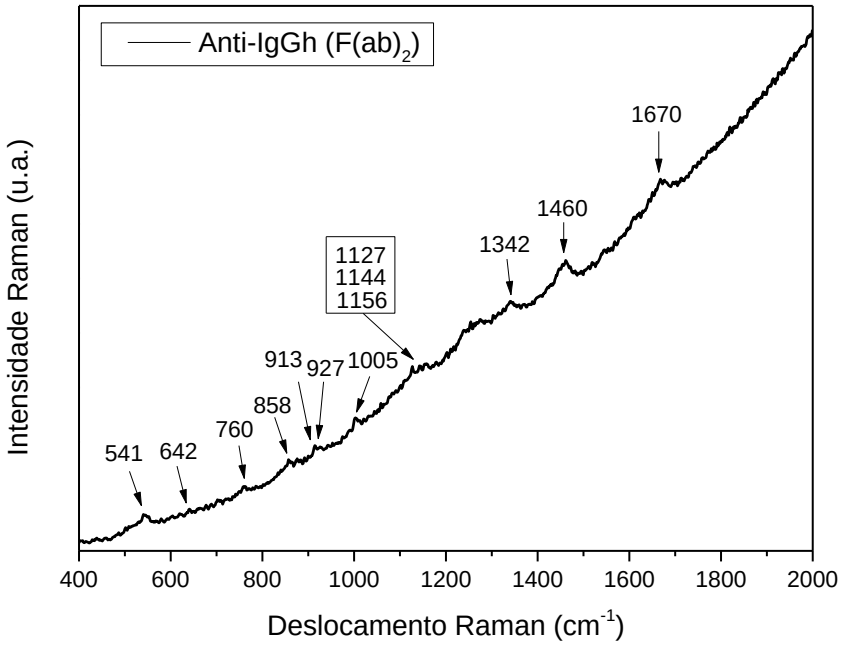

Figura 73 – Espectro Raman de anti-IgGh (Fab_2) 35 mg mL^{-1} adquirido utilizando-se laser 632,8 nm.

Tabela 20 – Bandas Raman e atribuições para anti-IgGh (Fab_2) concentrada.

Deslocamento Raman (cm^{-1})	Intensidade	Atribuição	Aminoácido
541	f, ampla	νS–S[1]	Met, Cys
642	f	–	Tyr[2]
760	f	–	Tyr[2]
858	f	respiração do anel[7]	Tyr
913	f	–	–
927	f	δCH_3[2]	–
1005	m	–	Phe[2]
1127 1144 1156	f f f	ν(C–C) ou ν(C–N) alquil[2]	
1342	f	ν(anel)[3,4,5,6] δC–H[8]	Trp
1460	F	$\delta(CH_2)$[7]	Trp
1670	m	ν(C=O)[1]	Asp

mf = muito fraca; f = fraca; m = média; F = forte; MF = muito forte; ν = estiramento; δ = deformação

1 = GNIADECKA *et al*., 1998
2 = KENGNE-MOMO *et al*., 2012
3 = AREÂS & KAWANO, 1991;
4 = GRABBE & BUCK, 1989;
5 = STEWART & FREDERICKS, 1999;
6 = PEZOLET *et al*., 1976;
7 = ZHANG *et al*., 2008.

Em termos estruturais, pode-se identificar a banda Amida I em 1670 cm^{-1} devido ao estiramento de C=O (80%), correspondente à estrutura secundária folha-β, conforme consta na literatura (AREÂS & KAWANO, 1991).

Assim como foi observado no espectro Raman de anti-IgGh (H+L), uma banda referente ao modo vibracional da conformação C–S–S–C foi identificada em 541 cm^{-1}, sendo atribuído, também, o estiramento *trans-gauche-trans*.

Considerando-se que o estiramento C–S pode ocorrer entre 630-790 cm^{-1} (BULKIN, 1991), à banda em 642 cm^{-1} foi atribuída a este estiramento. Nesse sentido, a imobilização da anti-IgGh (Fab_2) sobre NP-Au pode ser feita por tal região, assim como foi propostas às IgGh.

A contribuição do dubleto em 830/850 cm^{-1}, referente à respiração do anel da Tyr, não é tão pronunciada. Assim, observa-se apenas uma banda em 858 cm^{-1}.

Em 1005 cm^{-1} ocorre uma banda que foi atribuída à Phe (ARÊAS & KAWANO, 1991). Já a banda em 1460 cm^{-1} corresponde à deformação CH_2 do Trp (ZHANG *et al*., 2008; KENGNE-MOMO *et al*., 2012). As bandas em 1127, 1144 e 1156 cm^{-1} correspondem aos estiramentos de C–C ou C–N alquil (KENGNE-MOMO *et al*., 2012). Diferentemente da anti-IgGh (H+L), demonstrou-se que a lavagem pode ser uma etapa significativa para a visualização de bandas nas regiões de 1000-1100 cm^{-1}.

Assim, na eventual construção de imunossensores, aqueles que permitirem a lavagem das superfícies SERS-ativas e/ou o isolamento das NP-Au com os anticorpos imobilizados da solução matriz, terão os efeitos da contribuição dos tampões suprimidos.

Na literatura, há propostas para a construção de imunossensores que se baseiam exclusivamente no conhecimento do espectro SERS de imunoglobulinas ligadas à nanopartículas. Balzerova e colaboradores produziram um sensor do tipo *label-free* para identificar IgGh em sangue de pacientes, utilizando-se nanocompósitos magnéticos de Ag com anti-IgGh imobilizada (BALZEROVA *et al*., 2014). Neste caso, os anticorpos utilizados não foram ligados diretamente à Ag, mas foi feita a modificação da superfície com etilamina, sendo a banda Ag–N identificada em 605 cm^{-1}, com posterior ligação dessas moléculas com as anti-IgGh.

Como foi demonstrado neste trabalho, a IgGh ou seu fragmento F(ab)' pode ser imobilizado diretamente sobre as superfícies de Au, acompanhando-se a banda associada ao modo vibracional de C–S (679 cm^{-1}). Assim, uma etapa na eventual construção de sensores SERS poderia ser suprimida, isto é, o uso de um *link* como

a etilamina. Porém, como foi proposto, o uso dos fragmentos F(ab)' seria o mais adequado, tendo-se em vista a possível orientação do paratopo em região oposta à superfície de Au, o que favoreceria a interação Ab-Ag.

Vale destacar que seria relevante a aproximação do paratopo com a superfície onde o campo elétrico, gerado pela oscilação coletiva dos elétrons (plasmon), é maior e isso seria útil à intensificação do sinal SERS. Como consequência, ter-se-ia a possibilidade de se diminuir o limite detecção em um eventual tipo de imunossensor. No entanto, é necessária uma avaliação sobre a manutenção adequada das conformações dos anticorpos para que a interação Ab-Ag seja mantida, pois a região do paratopo não pode ser afetada.

Considerando-se o favorecimento da aproximação das NP, uma abordagem bastante interessante apresentada por Balzerova e colaboradores corresponde ao uso de nanocompósitos magnéticos. Pois, ao permitir a aproximação das NP por meio da ação do campo magnético, o campo elétrico necessário para que ocorra a intensificação Raman pode ser aumentado (BALZEROVA *et al*., 2014).

Neste trabalho, o favorecimento da aproximação das NP-Au por meio da ação de um campo magnético e sua separação da solução matriz não foi empregado. Na literatura, tal abordagem tem sido utilizada para detectar espécies de interesse clínico como IgGh e anti-peptídeo citrulinado cíclico (diagnóstico de artrite reumatoide) (BALZEROVA, *et al*., 2014; CHON, H. *et al*., 2014). Também, em matriz ambiental para detectar, por exemplo, o antibiótico cloranfenicol em amostras de água (YANG *et al*., 2016). Nesse sentido, observa-se que a separação magnética é uma tendência, pois favorece a aproximação das NP-Au, cujos campos elétricos estão intensificados, mas também têm a capacidade de separar as NP-Au

modificadas da matriz e, consequentemente, concentrando os analitos que interagiram com os anticorpos imobilizados.

Em relação ao conhecimento dos espectros SERS de anticorpos, as bandas (atribuídas às estruturas secundárias) podem ser utilizadas na relação sinal *vs* concentração. Balzerova e colaboradores utilizaram as intensidades absolutas das bandas 1539 e 1650 cm^{-1} para a identificação de IgGh e, realizaram a normalização pela banda 605 cm^{-1} (atribuída a um *link* de etilamina) a fim de minimizar os erros associados ao sistema (variação na composição, estrutura e instabilidade do sinal Raman). Na abordagem deste estudo, quando se utilizou os fragmentos F(ab)' não houve a necessidade de se utilizar um link, tal qual a etilamina, pois a banda em 679 cm^{-1} poderia ser a banda referência para normalização da curva. Em contrapartida, na eventual proposta de construção de um imunossensor com o uso de fragmentos F(ab)', seria necessário avaliar a manutenção do reconhecimento de seu paratopo pelo epitopo, o que reforçaria a tese de que a imobilização dos fragmentos F(ab)' ocorreu, de fato, pela região oposta ao paratopo, isto é, pelas regiões ricas em ligações S–S.

Como pode ser observado, o conhecimento dos espectros de biomoléculas imobilizadas sobre superfícies SERS-ativas permite a eventual construção de imunossensores, cujos limites de detecção podem ser menores, de acordo com a criação de *hot spots*. A seletividade dos anticorpos ou de seus fragmentos é uma vantagem, principalmente, se estiver associada à elevada sensibilidade que a técnica SERS possui.

Outra abordagem para esse tipo de estudo, é a utilização de estruturas com pontas, tais quais os NB-Au que foram apresentados neste trabalho. Pois, ao se utilizar superfícies SERS-ativas, aquelas que apresentarem maior intensificação do

campo elétrico, serão ferramentas vantajosas para a eventual proposta de construção de imunossensores que, além de fornecer uma relação sinal *vs* concentração, poderá fornecer informações a respeito da conformação dos anticorpos imobilizados e orientações adotadas pelo anticorpo/fragmento que refletirão no processo de interação Ab-Ag, avaliando se a imobilização prejudicou a conformação adequada à ligação dessas espécies.

5 CONCLUSÕES

Este trabalho abordou etapas importantes para uma eventual proposta de imunossensor baseado em superfícies SERS-ativas. As etapas consistiram em avaliar a possibilidade de se trabalhar com anticorpos purificados, determinar as condições ideais para a geração de fragmentos F(ab)' dos anticorpos IgGh, anti-IgGh (H+ L) e anti-IgGh (Fab_2) para permitir uma aproximação do paratopo com a região da NP-Au onde ocorre o aumento do campo elétrico (útil à intensificação do sinal Raman), adaptar o preparo de NC-Au para gerar NB-Au que são materiais com potencial para a intensificação do campo elétrico e que poderiam diminuir o limite de detecção de um eventual imunossensor, bem como conhecer os principais modos vibracionais de IgGh e de seus fragmentos F(ab)' a fim de se avaliar de que maneira ocorre a imobilização dessas espécies sobre as superfícies SERS-ativas e como isso afetaria a interação Ab-Ag em uma etapa de construção de imunossensor.

Em relação à primeira abordagem, a etapa de purificação de anticorpos demonstrou que nos processos que envolvem coluna de afinidade (A, G ou A/G) ou separação de imunoglobulinas por meio do pI não permite a total separação de proteínas que estão presentes no soro juntamente com os anticorpos. No entanto, a possibilidade de se construir imunossensores baseados na técnica SERS deve levar em consideração o conhecimento dos espectros obtidos a partir dessas soluções que contém outras proteínas. Também, avaliar se as mesmas poderiam influenciar em interações não específicas entre o antígeno e o imunossensor.

Em relação à fragmentação de imunoglobulinas, demonstrou-se as melhores condições de concentração de protease (papaína) e tempo de incubação para o máximo rendimento na geração de fragmentos F(ab)', visualizados por meio da técnica SDS-PAGE. Para IgGh a melhor condição foi papaína 0,1 mg mL^{-1}, durante

24 h de incubação, a 37 °C. Enquanto para anti-IgGh (H+L) foi com papaína 0,1 mg mL^{-1}, durante 12 h, a 37 °C. Por fim, para anti-IgGh (Fab_2) foi de 0,1 mg mL^{-1}, durante 18 h, a 37 °C. Também, demonstrou-se a vantagem e desvantagem do uso de enzima imobilizada e não imobilizada para tal finalidade.

Sobre as NP-Au, apresentou-se a modificação na preparação de NC-Au para obtenção de NB-Au que, do ponto de vista da técnica SERS, podem ser estruturas com maior potencial para a intensificação dos modos vibracionais, sendo que as extremidades deste tipo de nanoestruturas serão um diferencial para diminuir o limite de detecção em propostas para a construção de imunossensores.

No caso da caracterização espectroscópica de biomoléculas, foram apresentados os espectros Raman e SERS com a atribuição dos seus principais modos vibracionais. Neste sentido, destacou-se a tendência na organização dessas moléculas, no processo de imobilização, quando estão em concentrações altas e baixas. A proposta de imobilização dos anticorpos não clivados foi baseada na existência da região de dobradiça, presente em alguns tipos de imunoglobulinas, que permite o distanciamento dos paratopos entre 60 a 180°. Porém, a melhor abordagem para uma eventual proposta de desenvolvimento de imunossensores consistiu em demonstrar o surgimento da banda principal em 679 cm^{-1} quando os fragmentos de anticorpos foram colocados em contato com as NP-Au. Em termos de eventual construção de imunossensores, uma maior aproximação da região do paratopo dos anticorpos e do epitopo dos antígenos com o campo elétrico local gerado, devido ao *plasmon*, é uma vantagem para que as interações anticorpo-antígeno sejam avaliadas.

Neste sentido, a eventual proposta de construção de imunossensores baseados na técnica SERS deve avaliar, entre os apresentados neste trabalho,

outros como: avaliação da manutenção da conformação dos anticorpos ou de seus fragmentos sobre as NP-Au para que permita a correta orientação do paratopo e, consequente, iteração anticorpo-antígeno e estratégias de criação de regiões de intensificação do campo elétrico (por exemplo, uso de NP-Au magnéticas com pontas).

Assim, a derivatizacão deste trabalho rumo ao desenvolvimento de imunossensores permitiria a quantificação e caracterização espectroscópica das espécies envolvidas, sendo uma abordagem interessante para estudos futuros, dada a grande possibilidade de modulação nas condições para a geração da intensificação do campo elétrico, a aproximação do paratopo-epitodo do campo elétrico, gerado pelos *plasmons,* por meio da clivagem dos anticorpos, o conhecimento das bandas de imobilização sem o uso de *links* e, por fim, a possibilidade de detecção do tipo *label-free* nos casos em que a interação anticorpo-antígeno gere uma banda característica no espectro SERS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGILENT. **Agilent 3100 OFFGEL Fractionator** – **User manual**. Disponível em: < http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G3100-90001_OFFGEL_UserManual_ebook.pdf>. Acesso em: 23 abr. 2012.

ALBANI, J. R. **Principles and applications of fluorescence spectroscopy**. Oxford: Blackwell, p. 1-11; 102-107, 2007.

AMIM JR., J.; PTRI, D. F. S.; MAIA, F. C. B.; MIRANDA, P. B. Filmes ultrafinos de ésteres de celulose: preparo, caracterização e imobilização de proteínas. **Química Nova**, v. 23, n. 10, p. 2064-2069, 2010.

ANDREWS, A. T. **Electrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications**. 2nd ed. New York: Oxford, 1986. p. 241-280.

ANDRUSHCHENKO, V.; MATEJKA, P.; ANDERSON, D. T.; KAMINSKY, J.; HORNICEK, J.; PAULSON, L. O.; BOUR, P. Solvent Dependence of the N-Methylacetamide Structure and Force Field. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 113, 9727–9736, 2009.

ARÊAS, E. P. G.; KAWANO, Y. Aplicações de técnicas espectroscópicas vibracionais ao estudo conformacional de proteínas. **Química Nova**, v. 14, n. 1, p. 31-43, 1991.

AROCA, R. **Surface-enhanced vibrational spectroscopy**. West Sussex: John Wiley & Sons, 2006. Chap, 1, 3, 5 e 6.

BALZEROVA, A.; FARGASOVA, A.; MARKOVA, Z.; RANC, V.; ZBORIL, R. Magnetically-Assisted Surface Enhanced Raman Spectroscopy (MA-SERS) for label-free determination of Human Immunoglobulin G (IgG) in blood using Fe_3O_4@Ag Nanocomposite. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 11107-1114, 2014.

BIO-RAD. **Bio-Rad Protein Assay**. Disponível em <http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9004.pdf>. Acesso em: 13/09/2010.

BONIFACINO, J. S.; DASSO, M.; HARFORD, J. B.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; YAMADA, K. M. (Ed.). **Currente protocols in cell biology**. John Wiley & Sons, 2004. chap. 5, 16.

BRONGERSMA, M. L.; KIK, P. G. (Ed.) **Surface Plasmon Nanophotonics**. Dordrecht: Springer, 2007. chap. 2.

BULKIN, B. J. The Raman effect: an introduction. In: GRASSELLI, J. G.; BULKIN, B. J. (Ed.). **Analytical Raman spectroscopy**. New York: John Wiley & Sons, 1991. p. 9-12.

CAIRES, A. R. L.; COSTA, L. R.; FERNANDES, J. A close analysis of metal-enhanced fluorescence of tryptophan induced by silver nanoparticles: wavelength emission dependence. **Central European Journal of Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 111-115, 2013.

CHEN, C. J.; LAI, C. C.; TSENG, M. C.; LIU, Y. C.; LIN, S. Y.; TSAI, F. J. Simple fabrication of hydrophobic surface target for increased sensitivity and homogeneity in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of peptides, phosphopeptides, carbohydrates and proteins. **Analytica Chimica Acta**, v. 783, p. 31-38, 2013.

CHON, H.; LEE, S.; WANG, R.; BANG, S.; LEE, H.; KIM, B.; CHOO, J. SERS-based immunoassay of anti-cyclic citrullinated peptide for early diagnosis of rheumatoid arthritis. **RSC Advances**, v. 4, p. 32924-32927, 2014.

CHOWDHURY, M. H.; RAY, K.; GRAY, S. K.; POND, J.; LAKOWICZ, J. R. Aluminum nanoparticles as substrates for Metal-Enhanced Fluorescence in the ultraviolet for the label-free detection of biomolecules, v. 81, p. 1397-1403, 2009.

COELHO, J. P. **Interação não covalente entre nanotubos de carbono de paredes múltiplas e a proteína ovalbumina e oligonucleotídeo CpG**. 2013. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais) – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Comissão Nacional de Energia Nuclear, Belo Horizonte, 2013.

COLEMAN, L.; MAHLER, S. M. Purification of Fab fragments from a monoclonal antibody papain digest by Gradiflow electrophoresis. **Protein Expression and Purification**, v. 32, p. 246-251, 2003.

COLTHUP, N. B. **Introduction to Infrared and Raman spectroscopy**. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 1990. p. 210-213, 366.

COMBS, Z. A.; CHANG, S.; CLARK, T.; SINGAMANENI, S.; ANDERSON, K. D.; TSUKRUK, V. V. Label-free Raman mapping of surface distribution of Protein A and IgG biomolecules. **Langmuir**. v. 27, p. 3198-3205, 2010.

CONROY, P. J.; HEARTY, S.; LEONARD, P.; O'KENNEDY, R. J. Antibody production, design and use for biosensor-based applications. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v. 20, p. 10-26, 2009.

COSTA, J. C. S.; ANDO, R. A.; SANT'ANA, A. C.; ROSSI, L. M.; SANTOS, P. S.; TEMPERINI, M. L. A.; CORIO, P. High performance gold nanorods and silver nanocubes in surface-enhanced Raman spectroscopy of pesticides. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, p. 7491-7498, 2009.

COSTA, J. C. S.; ANDO, R. A.; CAMARGO, P. H. C.; CORIO, P. Understanding the effect of adsorption geometry over substrate selectivity in the Surface-Enhanced Raman Scattering spectra of simazine and atrazine. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, p. 4184-4190, 2011.

DIMITRIS, D.; CHIANELLA, I.; GUERREIRO, A.; PILETSKA, E. V.; PILETSKY, S. Development of optical immunosensors for detection of proteins in serum. **Talanta**, v. 103, p. 260-266, 2013.

DORST, B.; MEHTA, J.; BEKAERT, K.; ROUAH-MARTIN, E.; COEN, W.; DUBRUEL, P.; BLUST, R.; ROBBENS, J. Recent advances in recognition elements of food and 1 environmental biosensors: a review. **Biosensor and Bioelectronics**, v. 26, p. 1178-1194, 2010.

DUARTE, S. M. **Produção recombinante e caracterização de uma cisteíno protease (tipo catepsina B) de cana-de-açúcar**. 2008. 69 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

ELGERT, K. D. **Immunology: understanding the immune system**. Wiley-Liss: New York, 1996. cap. 4, p. 58-78.

ESCOSURA-MUÑIZ, A.; PAROLO, C.; MERKOÇI, A. Immunosensing using nanoparticles. **Materials Today**, v. 13, p. 24-34, 2010.

FARIA, D. L. A.; TEMPERINI, M. L. A.; SALA, O. Vinte anos de efeito SERS. **Química Nova**, v. 22, n. 4, p. 541-552, 1999.

FERRARO, J. R.; NAKAMOTO, K. **Introductory Raman spectroscopy**. San Diego: Academic Press, 1994. p. 206-207.

FERRI, R. G.; CALICH, V. L. G.; VAZ, C. A. C. **Imunologia**. Editora Edgard Blücher LTDA, 1977. cap. 2, 3 e 4, p.23-53, 54-116, 117-151.

FUJIMOTO, J.; REIS, E. A. O.; PETRI, D. F. S. Formação de multicamadas de polissacarídeos e proteína. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 757-761, 2002.

GARABAGIU, S. Gold nanorods-hemoglobin bio-conjugate: Spectroscopy studies, v. 1031, p. 216-220, 2013.

GIL, E. S.; KUBOTA, L. T.; YAMAMOTO, Y. I. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 874-881, 1999.

GNIADECKA, M.; FAURSKOV, N.; CHRISTENSEN, D. H.; WULF, H. C. Structure of water, proteins, and lipids in intact human skin, hair, and nail. **The Journal of investigative dermatology**, v. 110, n. 4, p. 993-398, 1998.

GRABBE, E. G.; BUCK, R. Surface-Enhanced Raman Spectroscopic investigation of human immunoglobulin G adsorbed on a silver electrode. **Journal American Chemical Society**. v. 111, p. 8362-8366, 1989.

HAMES, B. D.; RICKWOOD, D. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. 2 nd ed. Oxford University Press: Oxford, 1990. cap. 1, p. 1-147.

HAMILTON, R. G. Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. **Clinical Chemistry**, v. 33, n. 10, p. 1707-1725, 1987.
HAO, E.; SCHATZ, G. C. Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimmers. **Journal of Chemical Physics**, v. 120, n. 1, p. 357-366, 2004.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies – A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. cap. 2 e 15, p. 7-18, 613-633.

HASSAN, N.; HOLZE, R. Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Self-Assembled Monolayers of 2-Mercaptopyridine on gold electrode. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 48, n. 4, p. 401-411, 2012.

HAYNES, C. L.; MCFARLAND, A. D.; DUYNE, R. P. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 1, p. 338A-346A.

INTERCHIM. Agilent Protein 230 Kit Quick Start Guide. Disponível em: <http://www.interchim.fr/ft/C/CB5060.pdf>. Acesso em: 26 abr. 2012.

JANA, N. R. Gram-Scale Synthesis of Soluble, Near-Monodisperse Gold Nanorods and Other Anisotropic Nanoparticles. **Small**, v. 1, n. 8-9, p. 875-882, 2005.

JEYACHANDRAN, Y. L.; MIELCZARSKI, J. A.; MIELCZARSKI, E.; RAI, B. Efficiency of blocking of non-specific interaction of different proteins by BSA adsorbed on hydrophobic and hydrophilic surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 341, p. 136-142, 2010.

KENGNE-MOMO, R.P. K.; DANIEL, P.; LAGARDE, F.; JEYACHANDRAN, Y. L.; PILARD, J. F.; DURAND-THOUAND, M. J.; THOUAND, G. Protein Interactions Investigated by the Raman Spectroscopy for Biosensor Applications. **International Journal of Spectroscopy**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

KERR, M. A. In the blood: The structure of immunoglobulin. Biochemical Journal, v. 28, p. 43-45, 2006.

KUMAR, C. S. S. R. (Ed.) **Metallic Nanomaterials**. Weinheim: Wiley-VCH, v. 1, 2009. Chap 7 e 11.

LI, X.; SHEN, J.; DU, A.; ZHANG, Z.; GAO, G.; YANG, H.; WU, J. Facile synthesis of silver nanoparticles with high concentration via CTAB-induced silver mirror reaction. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 400, p. 73-79, 2012.

LIDE, D. R. (Ed.) **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. 73rd ed. Florida: CRC Press, p. 8-17 a 8-22, 2000.

LIU, H.; MAY, K. Disulfide bond structures of IgG molecules Structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function. **mAbs**, v. 4, n. 1, p. 17-32, 2012.

LUCARINI, A. C.; KILIKIAN, B. V. Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances. **Biotechnology Techniques**, v. 13, p. 149–154, 1999.

LUO, Q.; MAO, X.; KONG, L.; HUANG, X.; ZOU, H. High performance affinity chromatography for characterization of human immunoglobulin G digestion with papain. **Journal of Chromatography B**, v. 776, p. 139-147, 2002.

LUZ, C.; BAUDET, L.; TROGER, F. Comparação de métodos diretos para determinação do teor de água de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 15, n. 2, p. 157-163, 1993.

MURPHY, C. J.; GOLE, A. M.; STONE, J. W.; SISCO, P. N.; ALKILANY, A. M.;. GOLDSMITH, E. C; BAXTER, S. C. Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, p. 1721-1730, 2008.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. Trad. TABORDA, C. P. 7ª ed. Rio De Janeiro: Elsevier, 2009. cap. 9.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4th ed. New York: W.H. FREEMAN AND CO., p. 78-80, 2004.

OKAJIMA, T.; TANABE, T.; YASUDA, T. Nonurea sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with high-molarity buffers for the separation of proteins and peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 211, p. 293-300, 1993.

OSHOKOYA, O. O.; JIJI, R. D. Parallel factor analysis of multi-excitation ultraviolet resonance Raman spectra for protein secondary structure determination. **Analytica Chimica Acta**, v. 892, p. 59-68, 2015.

PAN, B.; CUI, D.; XU, P.; LI, Q.; HUANG, T.; HE, R.; GAO, F. Study on interaction between gold nanorod and bovine serum albumin. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 295, p. 217-222, 2007.

PEZOLET, M.; PIGEON-GOSSELIN, M.; COULOMBE, L. Laser Raman investigation of the conformation of human immunoglobulin G. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 453, p. 502-512, 1976.

PRASANNA, R. R.; KAMALANATHAN, A. S.; VIJAYALAKSMI, M. A. Development of L-histidine immobilized CIM® monolithic disks for purification of immunoglobulin G. **Journal of Molecular Recognition**, v. 28, p. 129–141, 2015.

PRIN, C.; BENE, M. C.; GOBERT, B.; MONTAGNE, P.; FAURE, G. C. Isoelectric restriction of human immunoglobulin isotypes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 243, p. 287-290, 1995.

SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2. ed. São Paulo: Editora UNESP, 2008. p. 37-42.

SAJANLAL, P. R.; SREEPRASAD, T. S.; SAMAL, A. K.; PRADEEP, T. Anisotropic nanomaterials: structure, growth, assembly, and functions. **Nano Reviews**, v. 2, p. 1-62, 2011.

SANT'ANA, A. C.; CORIO, P. TEMPERINI, M. L. A. O efeito SERS na análise de traços: o papel das superfícies nanoestruturadas. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 805-810, 2006.
SELA-CULANG, I.; KUNIK, V.; OFRAN, Y. The structural basis of antibody-antigen recognition. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 1-13, 2013.

SKOOG, D. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, p. 275-318 e 322-339, 2002.

SNOECK, V.; PETERS, I. R.; COX, E. The IgA system: a comparison of structure and function in different species. **Veterinary Research**, v. 37, p. 455-467, 2006.

STEWART, S.; FREDERICKS, P. M. Surface-enhanced Raman spectroscopy of amino acids adsorbed on an electrochemically prepared silver surface. **Spectrochimica Acta Part A**. v. 55, p.1641-1660, 1999.

SUN, J.; GUAN, M. SHANG, T.; GAO, C.; XU, Z. ZHU, J. Selective synthesis of gold cuboid and decahedral nanoparticles regulated and controlled by Cu^{2+} ions. **Crystal Growth & Design**, v. 8, n. 8, 906-910, 2008.

SZMACINSKI, H.; RAY, K.; LAKOWICZ, J. R. Metal-enhanced fluorescence of tryptophan residues in proteins: Application toward label-free bioassays. **Analytical Biochemistry**, v. 385, p. 358-364, 2009.

THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. **Pierce® Fab Preparation Kit**. Disponível em < https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011651_Pierce_Fab_Prep_UG.pdf>. Acesso em 27 de fev. 2011.

TRILLING, A. K.; BEEKWILDER, J.; ZUILHOF, H. Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview. **Analyst**, v. 138, p. 1619–1627, 2013.

UNIVERSITY OF IOWA CARVER COLLEGE OF MEDICINE. **Fast Silver Staining Protocol Used by the Price Lab**. Disponível em: <http://www.medicine.uiowa.edu/uploadedfiles/laboratories/price_laboratory/content/fastsilverstaining.pdf>. Acesso em: 27 de fev. 2013.

VIKHOLM, I. Self-assembly of antibody fragments and polymers onto gold for immunosensing. **Sensors and Actuators B**, v. 106, p. 311-316, 2005.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 3 ed. Tradução de Veiga, A. B. G. et. al. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 65-78, 142-150.

WALKER, J. M. Isoelectric focusing of proteins in ultra-thin polyacrylamide gels. In: WALKER, J. M. (Ed.). **Basic protein and peptide protocols**. Totowa: Human Press, 1994. p. 59-65.

YANG, K.; HU, Y., DONG, N. A novel biosensor based on competitive SERS immunoassay and magnetic separation for accurate and sensitive detection of chloramphenicol. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 80, p. 373–377, 2016.

YU, D.; YAM, V. W. W. Hydrothermal-induced assembly of colloidal silver spheres into various nanoparticles on the basis of HTAB-modified silver mirror reaction. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, p. 5497-5503, 2005.

XU, X.; LIU, X.; LI, Y.; YING, Y. A simple and rapid optical biosensor for detection of aflatoxin B1 based on competitive dispersion of gold nanorods. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 47, p. 361-367, 2013.

ZHANG, M. L.; YI, C. Q.; FAN, X.; PENG, K. Q.; WONG, N. B.; YANG, M. S.; ZHANG, R.Q.; LEE, S. T. A surface-enhanced Raman spectroscopy substrate for highly sensitive label-free immunoassay. **Applied physics letters**. v. 92, p. 043116-1 – 043116-3, 2008.

ZHOU, C.; FRIEDT, J-M; ANGELOVA, A.; CHOI, K-H; LAUREYN, W.; FREDERIX, F.; FRANCIS, L. A.; CAMPITELLI, A.; ENGELBORGHS, Y.; BORGHS, G. Human Immunoglobulin Adsorption Investigated by Means of Quartz Crystal Microbalance Dissipation, Atomic Force Microscopy, Surface Acoustic Wave, and Surface Plasmon Resonance Techniques. **Langmuir**, v. 20, p. 5870-5878, 2004.