

## Espectroscopia de Infravermelho Aplicada em Diagnóstico

Ana Elisa Pereira Filetti

Jessica Crivalero Pacheco

Prof. Dr. Frank Nelson Crespilho

Universidade de São Paulo

anafiiletti@usp.br

### Objetivos

O objetivo deste trabalho é estudar a interação entre as proteínas do vírus SARS-CoV-2 e as imunoglobulinas humanas por meio da técnica de espectromicroscopia ( $\mu$ -FTIR) de infravermelho por transformada de Fourier. Para isso, foram utilizadas nanopartículas de ouro (AuNP) conjugadas à proteína Spike, domínio S1 e subdomínio receptor-obrigatório (RBD - Receptor-Binding Domain) do vírus SARS-CoV-2. Através da análise dos estiramentos da amida I (aproximadamente  $1650\text{ cm}^{-1}$ ) e da amida II (aproximadamente  $1540\text{ cm}^{-1}$ ), pretende-se investigar a interação entre o RBD e a imunoglobulina G humana (IgG) em diferentes concentrações e como essa interação ocorre ao longo do tempo.

### Métodos e Procedimentos

As nanopartículas esféricas de ouro foram sintetizadas a partir do método de Turkevich (KIMLING et al., 2006).

Para a conjugação das AuNP com o RBD, foi adicionado 1 mL da solução de AuNP, 100  $\mu\text{L}$  de tampão borato pH 8,5 e 10  $\mu\text{L}$  de RBD 1 mg/mL em um eppendorf. Em seguida, o eppendorf foi inserido no agitador rotor por 30 minutos. Após a agitação, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de etanolamina 1 mmol/L, pH 8. O microtubo foi levado para a centrifuga por 20 minutos em temperatura  $4^\circ\text{C}$  e rotação

10.000 rpm. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e foi adicionado 1 mL da solução de lavagem, composta por PBS 5 mmol/L. A solução foi centrifugada por mais 20 minutos em 10.000 rpm. Após o descarte do sobrenadante, adicionou-se a solução de redispersão contendo tampão borato 2 mmol/L pH 8,5 e 50  $\mu\text{L}$  de etanolamina 1% glicose.

Para o estudo de interação bioconjugado/IgG por espectromicroscopia, foi utilizado o espectrômetro FTIR Bruker Vertex 70V com microscópio Hyperion 3000 acoplado em modo reflectância.

### Resultados

Os bioconjugados AuNP/RBD foram caracterizados por espectroscopia de absorção UV-Vis e exibiram o espectro apresentado na Figura 1.

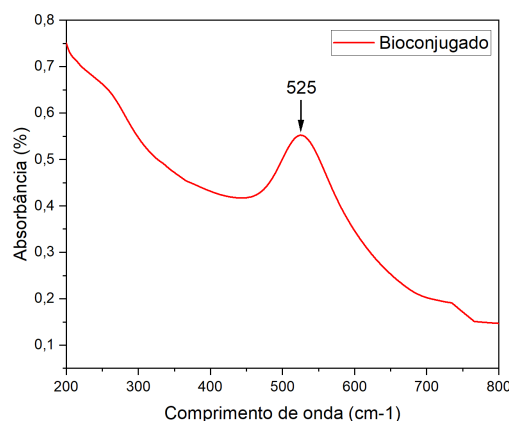


Figura 1: espectro de absorção UV-VIS do bioconjugado de AuNP/RBD.

A banda SPR das AuNPs puras é no comprimento de onda de extinção máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) de 520 nm (NATH; CHILKOTI, 2004). Uma vez que o bioconjugado apresentou  $\lambda_{\text{máx}}$  de 525 nm (Fig. 1), houve um deslocamento de 5 nm da banda SPR para a região do vermelho indicando que a bioconjugação foi bem sucedida (ROBERT T. BUSCH, et al. 2019). O bioconjugado foi também caracterizado por  $\mu$ -FTIR em modo reflectância. 1  $\mu$ L do material foi depositado sobre uma placa de ouro e obteve-se espectros característicos do RBD com as bandas amida I e amida II em 1645 e 1530  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Do mesmo modo, as bandas amidas I e amida II para o IgG puro foram analisadas, sendo estas observadas em 1540 e 1650  $\text{cm}^{-1}$  (ELIF BURCU AYDIN, et al).

Para estudar a interação entre AuNP/RBD e IgG, foram preparadas 3 soluções com as respectivas concentrações de IgG: 0,05 mg/mL, 0,025 mg/mL e 0,001 mg/mL. Foi adicionada uma alíquota de 1  $\mu$ L de bioconjugado para 19  $\mu$ L de cada solução de IgG. Após 30 minutos, uma alíquota de 1  $\mu$ L de cada solução foi depositada em uma placa de ouro. A placa foi colocada em um dessecador e deixou-se secar em vácuo por 30 min. Após a secagem, cada amostra foi analisada por  $\mu$ -FTIR separadamente.

Na figura 2 é possível observar o espectro obtido para cada amostra contendo diferentes concentrações de IgG. O sinal das bandas amida I e amida II deslocou para aproximadamente  $\sim 1705 \text{ cm}^{-1}$ , sendo um sinal diferente dos obtidos nas alíquotas de IgG e RBD. No entanto, a amostra contendo a concentração 0,05 mg/mL de IgG foi a que gerou o melhor sinal espectral e a concentração de 0,001  $\mu$ L foi insuficiente para obtenção de um sinal satisfatório.

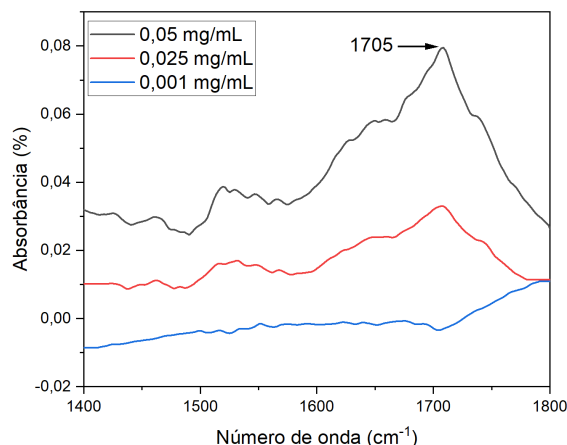


Figura 2: espectro de infravermelho obtido para o bioconjugado na presença de diferentes concentrações de IgG.

## Conclusões

A técnica de espectromicroscopia de infravermelho por transformada de Fourier mostrou-se eficiente na detecção da interação entre a proteína RBD de SARS-CoV-2 e as imunoglobulinas humanas IgG. Foi possível observar que, através dos espectros obtidos por  $\mu$ -FTIR, houve um deslocamento das bandas amida I e amida II do bioconjugado na presença de IgG humano. Vale ressaltar que a técnica também se mostra promissora para o diagnóstico e estudo de interação de proteínas determinantes de outras doenças virais, consolidando-se como maneira versátil para este propósito.

## Referências Bibliográficas

1. KIMLING, J. et al. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. **The Journal of Physical Chemistry B**, ago. 2006.
2. ROBERT T. BUSCH, et al. Optimization and Structural Stability of Gold Nanoparticle-Antibody Bioconjugates. **ACS Omega**, ago 2019.
3. ELIF BURCU AYDIN, et al. New Impedimetric Sandwich Immunosensor for Ultrasensitive and Highly Specific Detection of Spike Receptor Binding Domain Protein of SARS-CoV-2. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, 2021.
4. NATH, N.; CHILKOTI, A. Optimization of Nanoparticle Size. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 18, p. 5370–5378, set. 2004.