

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO PERFIL ELETROSTÁTICO DO LUME AQUOSO DO NANOPORO FORMADO PELA ALFATOXINA

Júlio Cesar Avelino da Silva¹; Claudio Gabriel Rodrigues²

¹Estudante do Curso de Biomedicina- CCB – UFPE; E-mail: juliocesaravelinos@hotmail.com,

²Docente/pesquisador do Depto de Biofísica e Radiologia – CCB – UFPE. E-mail: cgrufpe@gmail.com.

Sumário: A água é um recurso natural imprescindível em todas as áreas da raça humana. O aumento da população humana e a intensificação das atividades industrial e agrícola, juntamente com a falta de saneamento tem gerado contaminação das reservas de água, principalmente por meio da eutrofização desses aquíferos. No Brasil, um dos países com maior capacidade hídrica do planeta, os agentes contaminantes comumente encontrados em aquíferos advêm de resíduos orgânicos caseiros e industriais tratados inadequadamente, propiciando a floração de cianobactérias produtoras de microcistinas (MCs). As MCs são heptapeptídeos monocíclicos com mais de 80 variantes estruturais. A Organização Mundial de Saúde estabeleceu que concentrações de MCs da variante LR (MC-LR) superiores a 1 µg/L inviabiliza a água à ingestão humana. Dentre os principais métodos atualmente empregados para a detecção de MCs, destacam-se a cromatografia líquida de alta performance (HPLC), a espectroscopia de massa (EM) e o ensaio imunoenzimático (ELISA). Estes além de se limitarem apenas a MC-LR, ainda são demorados e onerosos. O nanoporo protéico da alfatoxina vem se destacando como elemento de reconhecimento molecular no desenvolvimento de biossensores, espectrômetros de massa e sequenciador molecular. O mecanismo de funcionamento consiste na interação entre uma MC com o nanoporo proteico individual. Esta interação gera flutuações discretas no fluxo iônico através do nanoporo resultando em uma série temporal destas flutuações, que é característica da molécula que entrou no nanoporo. O nanoporo proteico da alfatoxina permite a discriminação de até três variantes de microcistinas presentes simultaneamente em solução. O tempo de residência das MC LR e YR no interior do nanoporo é bem menor que o tempo da MC-RR. Essa diferença pode estar relacionada ao perfil de carga negativa da região troncular do nanoporo, devido à presença de resíduos de ácido aspártico. Teoricamente sabe-se que o lítio reage com os resíduos de ácido aspártico, reduzindo o perfil de carga elétrica residual negativa da região troncular do nanoporo. Neste contexto analisamos como a blindagem dos resíduos de ácido aspártico pode influenciar na capacidade do nanoporo em discriminar MCs, visando aumentar sua sensibilidade para detecção destas moléculas. Demonstramos que a alteração do perfil de carga negativa residual influenciou no tempo de permanência de algumas microcistinas diminuindo sua velocidade de translocação através do nanoporo e conseqüentemente possibilitando melhorias na sua sensibilidade para estas cianotoxinas.

Palavras-chave: nanoporo; biossensor, microcistinas, membranas

INTRODUÇÃO

O aumento da população humana e a intensificação das atividades industrial e agrícola, juntamente com a falta de saneamento tem gerado contaminação das reservas de água, principalmente por meio da eutrofização desses aquíferos. No Brasil, um dos países com maior capacidade hídrica do planeta, os agentes contaminantes comumente encontrados em aquíferos advêm de resíduos orgânicos caseiros e industriais tratados inadequadamente, que propiciam, devido às condições climáticas, a floração de várias espécies de

cianobactérias produtoras de cianotoxinas, principalmente microcistinas (SANT'ANNA et al, 2008). As microcistinas (MCs) são heptapeptídeos cíclicos produzidos por espécies de cianobactérias do gênero *Microcystis*. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabelece que concentrações de MCs superiores a 1 µg/L inviabiliza o uso d'água para a ingestão humana (WHO, 1997). O nanoporo protéico da alfatoxina vem se destacando pelo seu potencial nanobiotecnológico, principalmente, como elemento de reconhecimento molecular para o desenvolvimento de dispositivos sensores, espectrômetro de massa e sequenciador molecular (STANFORD et al., 2010). Recentemente demonstramos que o nanoporoprotéico da alfatoxina é um promissor elemento de reconhecimento para a detecção e quantificação de MCs em meios aquosos (RODRIGUES et al, 2013), uma vez que é possível diferenciar simultaneamente até três variantes de microcistinas. Neste contexto demonstramos que o tempo de residência das MCs LR e YR no interior do nanoporo é aproximadamente 7 vezes menor, relativamente à MC-RR. Isso pode estar diretamente relacionado ao fato de que o domínio da região troncular do nanoporo é negativamente carregado, devido à presença de resíduos de ácido aspártico. Resultados preliminares obtidos através de dinâmica molecular demonstram que as MCs-LR e YR são negativamente carregadas em meio aquoso de elevada força iônica (KCl 4M) e em pH 7.5; indicativo de que o menor tempo de residência das microcistinas LR e YR, deva-se a uma forte repulsão eletrostática entre estas MCs e a região troncular do nanoporo. Estudos recentes demonstram que o lítio reage com os resíduos de ácido aspártico, reduzindo o perfil de carga elétrica residual negativa da região troncular do nanoporo (BHATTACHARYA et al, 2011). Isto pode melhorar a capacidade de discriminação do nanoporo, possibilitando então a diferenciação de um maior número de microcistinas. Neste trabalho utilizamos a mesma abordagem objetivando esclarecer o mecanismo molecular de interação MCs-nanoporo, através da utilização da solução banhante de cloreto de lítio para alteração do perfil eletrostático do nanoporo, visando encontrar as condições adequadas que aumentem a sensibilidade do nanoporo para discriminar maior número de microcistinas em meio aquoso

MATERIAIS E MÉTODOS

Todas as bicamadas lipídicas planas utilizadas neste trabalho foram confeccionadas de acordo com a técnica de MONTAL & MUELLER, 1972. Esta técnica consiste basicamente na formação de uma bicamada lipídica, por aposição de dois filmes monomoleculares de lipídeo, em um orifício (~50 µm de diâmetro) de uma película (~15 µm de espessura) de Teflon (Politetrafluoretileno) que separa dois compartimentos de uma câmara, também de Teflon, contendo soluções aquosas. Os filmes monomoleculares de lipídeo foram obtidos a partir da deposição de 10 µl de uma solução de diftanoilfosfatidilcolina (Avanti Polar Lipids) 1% (p/v) em hexano (Merck) sobre as soluções aquosas. Depois de 10 minutos, com a evaporação do hexano, há a formação espontânea dos filmes lipídicos na superfície da solução aquosa de cada compartimento. A etapa de formação da membrana propriamente dita tem início com a injeção de mais solução sob o filme lipídico, elevando-se o nível do líquido no compartimento do lado de trás ou "trans", até que o menisco atinja o orifício, depositando o primeiro filme. Posteriormente aplica-se o mesmo procedimento para o compartimento frontal ou lado "cis", até ocorrer à deposição do segundo filme. Todos os experimentos foram realizados sob as seguintes condições: temperatura ambiente de 24±1 °C. O protocolo experimental para determinação da condutância nas diversas soluções consistiu em aplicar um potencial transmembrana de 40 mV e acrescentar pequenas alíquotas de alfatoxina ao lado CIS e registramos a incorporação de aproximadamente 300 canais. Determinamos o valor médio de condutância através de um ajuste Gaussiano do histograma de distribuição dos valores

de condutância de vários canais iônicos. Na realização dos experimentos de detecção de MCs pelo nanoporo banhado por soluções de diferentes concentrações de LiCl, o procedimento consistiu em após a construção da bicamada lipídica; adicionou-se uma pequena alíquota de alfatoxina para a incorporação de um único nanoporo, posteriormente, adicionou-se as MCs LR, YR e RR no lado TRANS.

RESULTADOS

Na figura 1 demonstramos o registro típico da corrente iônica através do nanoporo da alfatoxina na presença de cloreto de lítio em 2 e 3 M.

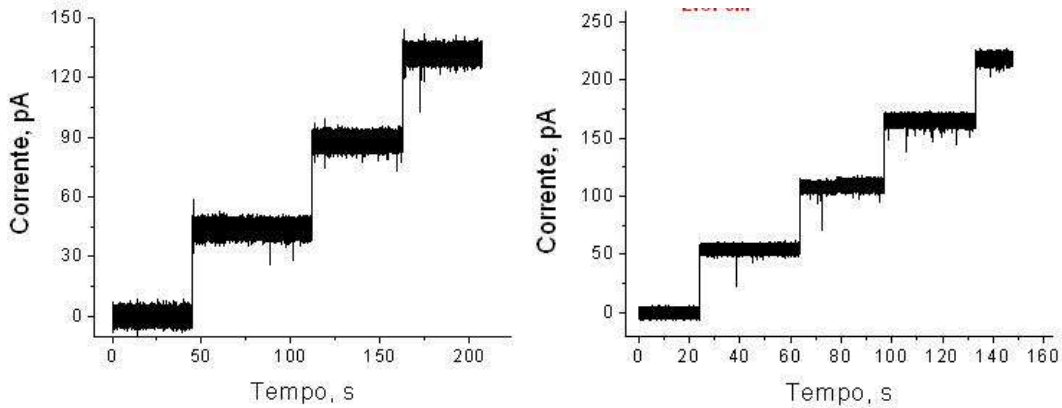


Figura 1. Registro da corrente iônica através do nanoporo da alfatoxina na presença de cloreto de lítio 2 e 3 M.

Na figura 2 demonstramos a condutância do nanoporo na presença de LiCl 1, 2 e 3 M.

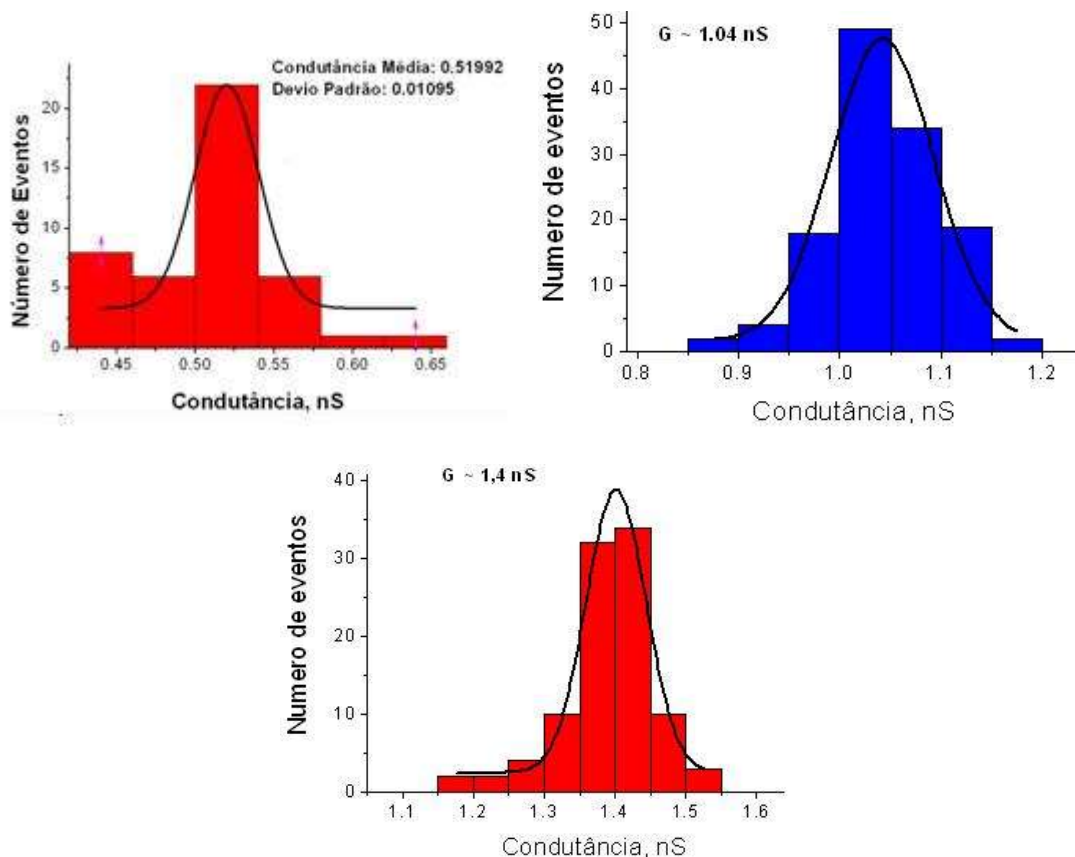


Figura 2. Condutância do nanoporo da alfatoxina nas soluções de LiCl 1, 2 e 3 M.

A Figura 3 mostra a diferença no tempo característico de residência da microcistina RR 1 μM , na presença de KCl 4M e LiCl 4M

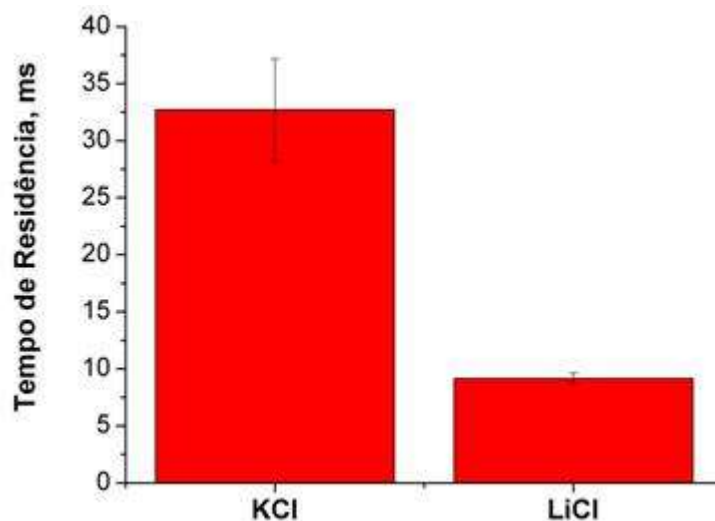


Figura 3: Tempo de residência para a Microcistina RR, na presença de KCl 4M e LiCl 4M. Os resultados representam a média de três experimentos

DISCUSSÃO

Nossos resultados relativos ao aumento do tempo de residência corroboram com os dados de dinâmica molecular (BHATTACHARYA, et al, 2011). Em relação aos dados de condutância do nanoporo indicam claramente que os íons de cloreto e lítio estão totalmente livres em solução mesmo em concentrações mais elevadas, também corroborando os dados de dinâmica molecular presentes na única referência na literatura que trata da interação de lítio com o nanoporo da alfatoxina (BHATTACHARYA, et al, 2011). A solução de KCl é considerada como um padrão para análise da interação de analitos com o nanoporo (RODRIGUES et al, 2011), neste, contexto, no caso da microcistina é aconselhável usar a solução de cloreto de lítio, uma vez que esta diminui o tempo de residência desta molécula no interior do nanoporo.

CONCLUSÕES

O cloreto de lítio diminui o tempo de permanência da microcistina RR no interior do nanoporo formado pela alfatoxina de *Staphylococcus aureus*.

AGRADECIMENTOS

CNPq, UFPE

REFERÊNCIAS

- BHATTACHARYA S., MUZARD J., PAYET L., MATHÉ J., BOCKELMANN U., AKSIMENTIEV A., AND VIASNOFF V. Rectification of the current -hemolysin pore depends on the cation type: the alkali series probed by molecular dynamics simulations and experiments. J. PHYS. CHEM. C. 115, 4255–4264. 2011.
- RODRIGUES, C.G. TRANSPORTE DE MOLÉCULAS ORGÂNICAS ATRAVÉS DE POROS NANOSCÓPICOS UNITÁRIOS. TESE DE DOUTORADO. UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, RECIFE. 2006.
- RODRIGUES, C.G.; MACHADO, D.C.; DA SILVA, A.M.B.; SILVA JÚNIOR, J.J.; KRASILNIKOV, O.V.. BIOPHYSICAL Hofmeister effect in confined spaces: halogen ions and single molecule detection JOURNAL, V. 100, P. 2929-2935, 2011.
- RODRIGUES, C. G.; CHEVTCHEENKO, S. F.; KRASILNIKOV, O. V.; MACHADO, D. C.; PEREIRA, D.E.A.J.; DA SILVA, J.J.J. Use of a protein nanopore for the detection, identification, quantification and real-time monitoring of microcystins in aqueous systems. PATENT WO2013026123 A1. FEBRUARY 28. 2013.
- STANFORD, V.M.; KASIANOWICZ, J.J.; ROBERTSON, J.W.F.; RODRIGUES, C.G.; KRASILNIKOV, O.V. Single molecule mass and size spectrometry in solution using a solitary nanopore. US 2010/0122907 A1, 20 MAIO 2010. 20P