



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

SHEILA DE MELO BARROS

**ESTUDO DOS EFEITOS DA ESTRUTURA QUÍMICA DE MOLÉCULAS
POLIMÉRICAS NA INTERAÇÃO COM O NANOPORO PROTÉICO UNITÁRIO**

Recife
2012

SHEILA DE MELO BARROS

**ESTUDO DOS EFEITOS DA ESTRUTURA QUÍMICA DE MOLÉCULAS
POLIMÉRICAS NA INTERAÇÃO COM O NANOPORO PROTÉICO UNITÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues.

Prof. Dr. Oleg Vladimirovich Krasilnikov (*in Memoriam*)

Recife
2012

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Barros, Sheila de Melo

Estudo dos efeitos da estrutura química de moléculas poliméricas na interação com nanoporo protéico unitário / Sheila de Melo Barros. – Recife: O Autor, 2014.

56 f.: il.

Orientador: Cláudio Gabriel Rodrigues

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2014.

Inclui referências e apêndices

1. Polímeros 2. Ionização 3. Bioquímica I. Rodrigues, Cláudio Gabriel (orient.) II. Título.

572.33

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-297

Sheila de Melo Barros

“Estudo dos efeitos da estrutura química de moléculas poliméricas na interação com o nanoporo proteico unitário”

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco

Aprovado por:

Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues
Presidente

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Prof. Dr. Reginaldo Pereira da Silva

Data: 29 / 02 / 2012

Dedico este trabalho à minha querida mãe Rosilda, tantas vezes usurpada da minha presença, mas não do meu amor e à minha vó Luiza “duplamente mãe” pra mim. Vocês são os maiores presentes de Deus para a minha vida!

Dedicação especial ao professor Dr. Oleg Vladimirovich Krasilnikov, “*In memorian*”, por me ensinar a dar o melhor de mim em tudo. Um grande exemplo de líder e pesquisador, mas acima de tudo um “verdadeiro educador”. Impossível tê-lo conhecido e não querer imitá-lo em algo. Louvo a Deus por tê-lo tido como mestre.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, razão de tudo o que tenho, tudo o que sou e do que virei a ser.

À minha amada família, pela compreensão em momentos de ausência e pelo apoio na busca pelos meus ideais.

Ao professor Dr. Oleg Vladimirovich Krasilnikov, “*In memorian*”, por me guiar em meus primeiros passos no âmbito da pesquisa científica.

Ao professor Cláudio Gabriel Rodrigues, por me acolher e me orientar em meio a momentos de tantas mudanças, pelo exemplo de “rigor científico” e dedicação diária. Meus sinceros agradecimentos e admiração!

À professora Liliya Yuldasheva, pelos ensinamentos e pela constante presença mesmo em momentos tão adversos.

À minha “little crazy” e melhor amiga Mary, por me suportar em meio às crises e me entender como ninguém, sem a qual eu não chegaria aonde cheguei. Você faz parte da minha história!

Aos meus amados irmãos Emerson e Jhonathan, “ossinho dos meus ossos” e “carne da minha carne”, por tornarem a minha vida por vezes maluca, mas ao mesmo tempo tão especial.

À Dijanah Machado, nossa adorável Dijinha, por ser um forte pilar em nossa equipe nos ajudando em todos os setores, sempre com uma doçura e paciência admiráveis. Um verdadeiro modelo de “pequena” grande mulher.

À minha querida amiga Darlene Paiva (Leninha), companheira de pesquisas durante dias, noites e madrugadas, a quem posso de fato chamar de amiga “para todas as horas”.

À Aldenize Lizandra, por compartilhar comigo a alegria de cada canal incorporado.

Ao Sérgio Chevtchenko, pelo apoio e compreensão durante os momentos difíceis e pelas longas horas a mim dedicadas.

A Janilson Júnior, por estar sempre pronto a ajudar e pelo amigo e irmão que é. Juízo!

Às minhas queridas companheiras Ju e Nina, por me ajudarem a registrar eventos eletrofisiológicos no P’clamp e momentos de amizade na alma.

Ao Diego Martins, pelo apoio em diversos momentos e por aquela “dose de energia” que nos ajuda a ficar de pé.

Ao meu querido amigo Iranildo Cruz por sua dedicação e presença sempre que possível.

Às garotas da cultura Layse Malagueta, Gisely Albertim, Jéssica Varão e Manuela Andrade, por seu apoio e amizade.

À Universidade Federal de Pernambuco, especificamente ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, pela acolhida e pelo interesse demonstrado na execução e conclusão deste trabalho, e por todo o apoio recebido por parte dos integrantes da sua secretaria, em especial ao Djalma Gomes da Silva pela prontidão e dedicação no atendimento prestado aos alunos.

Ao Laboratório de Nanotecnologia do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste-CETENE e em especial à Júlia Campos pelo suporte técnico e análises realizadas com o MALDI-TOF.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

À equipe do Laboratório de Biofísica das Membranas e a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

Atualmente, um grande número de técnicas encontra-se disponível para a caracterização de polímeros sintéticos, tais como a cromatografia por exclusão molecular (CEM), ressonância magnética nuclear (RMN) e técnicas de caracterização por massa como a ionização/dessorção a laser assistida por matiz (MALDI-TOF). Para a maioria dos polímeros sintéticos com elevada polidispersidade, no entanto, estas técnicas necessitam de outros métodos complementares ou de um tratamento prévio da amostra. Recentemente, foi demonstrado que poros de α -hemolisina podem ser usados como um espectrômetro de massas em solução para moléculas de polietilenoglicol (PEG), baseado na interação entre um poro de escala nanométrica e moléculas do analito, onde moléculas poliméricas de diferentes tamanhos no interior do nanoporo promovem diferentes estados de condutância com média característica dos tempos de residência. Neste trabalho a interação entre a Polivinilpirrolidona (PVP) e canais de α -hemolisina na presença de elevada corrente iônica foi utilizada para o desenvolvimento de um novo modelo de espectrômetro de massas para polímeros em espaço confinado, baseado em poros de escala nanométrica. Em nossos experimentos, foi utilizada uma solução banhante de (4M KCl, Tris 5 mM, pH 7,5) e uma amostra polidispersa de PVP de peso médio de 10KDa como analito polimérico. A confecção da bicamada lipídica plana e a inserção do nanoporo unitário na membrana, bem como os registros de correntes iônicas através dos poros, foram obtidos em condições de fixação de voltagem. Os resultados demonstram que poros de α -HL são capazes de detectar a polidispersidade do PVP e discriminar as cadeias moleculares com diferentes tamanhos. Os resultados obtidos com o nanoporo sensor apresentaram dados similares aos obtidos nas análises com o MALDI-TOF convencional. Fornecendo as bases científicas para o desenvolvimento de um espectrômetro de massas a partir do canal unitário uma caracterização em tempo real de polímeros sintéticos em solução.

Palavras-chave: Nanoporo proteico. Alfa-hemolisina. PVP. PEG. Caracterização polimérica.

ABSTRACT

Nowadays a large number of techniques are available for characterizing synthetic polymers, such as size-exclusion chromatography (SEC), nuclear magnetic resonance (NMR) and MS techniques like the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI TOF). On the other hand, for the most of the synthetic polymers with wide polydispersity, these techniques need combining with other complements methods or make a previous treatment of the sample. Recently was demonstrated that α -hemolysin (α -HL) pores can be used as a mass spectrometry in solution for poly(ethylene glycol) (PEG) molecules, based on the interaction between a nanometer-scale pore and molecules of analyte, where polymeric molecules of different sizes inside of nanopore cause distinct mass-dependent conductance states with characteristic mean residence times. In this work, the interaction between poly(vynipirrolidone) (PVP) and the α -hemolysin channel in a high ionic strength electrolyte was used to develop a new model of polymers confined mass spectrometry based in nanometer scale pores. In our experiments, it was used as membrane bath solution (4M KCl, Tris 5 mM, pH 7,5) and polydisperse PVP with mean weigh of 10KDa as polimeric analyte. The preparation of planar lipid bilayer, and single nanopore insertion into membrane, and records of ionic currents were conducted in conditions of voltage clamp. The results demonstrate that α -HL pore is able to detect the molecular polydispersity of PVP and discriminating the molecular chains with different sizes. The results obtained with nanopore sensor was found similar to data obtained with conventional (MALDI-TOF) analysis, providing the scientific basis for single-channel mass spectrometry in a real time mass characterization of synthetic polymers in solution.

Keywords: Nanopore. α -hemolysin. PVP. PEG. Polymeric characterization.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Variação das propriedades poliméricas em função de sua massa molar. Observe que a variação de uma dada propriedade é mais influenciada em cadeias oligoméricas com tendência à estabilidade a partir de um ponto determinado de crescimento da molécula do polímero. Extraído de CANEVAROLO JR, 2006	16
FIGURA 2: Curva de distribuição de massa molar (DMM) resultante de uma amostra com cadeias de tamanhos variados ante a um valor médio dessas massas molares (MM). Extraído de CANEVAROLO JR, 2006	17
FIGURA 3: Princípio da ionização MALDI. A matriz que envolve as moléculas da amostra, ao absorver a energia do laser irradiado promove a transferência de prótons para as moléculas analisadas que uma vez protonadas seguem em direção ao tubo de voo. Modificado de OKAMOTO, 2006	20
FIGURA 4: Esquema geral de um espectrômetro de massas MALDI-TOF, ilustrando suas partes componentes que vão desde a placa de aplicação da mostra, sobre a qual ocorrerá o pulso do laser passando pelo campo de aceleração das partículas até chegar ao detector, onde os íons serão detectados em função de sua m/z. Extraído de SARAIVA, 2008	21
FIGURA 5: Estrutura química da molécula de PVP. Adaptado de TRIMPIN et al., 2001.....	22
FIGURA 6: Caráter Básico do PVP em sistemas aquosos. A base conjugada do PVP é estabilizada pela ressonância no anel lactama. Devido ao seu elevado efeito indutivo negativo (-I), o oxigênio atrai os elétrons para si, aumentando a sua densidade eletrônica e facilitando a “captura” de íons H^+ . Retirado de TAKAGISHI; KUROKI, 1973.....	23
FIGURA 7: Estrutura química da molécula de PEG	23
FIGURA 8: Esquema geral dos componentes de um biossensor. Adaptado de LECHUGA, 2011.....	25
FIGURA 9: Modelo do nanoporo formado pela α -HL com suas dimensões e domínios (troncular, copal e anelar), com visão lateral e de cima da região	

copal. A região troncular fica inserida na membrana (STEM), a região copal (CAP) prolonga-se para a superfície formando um canal hidrofílico e a região anelar (RIM) recobre a parte inferior do topo podendo ter alguma interação com a membrana. Adaptado de SONG et al, 1996 26

FIGURA 10: Funcionamento do nanoporo como sensor. Com a aplicação de um potencial elétrico (1), na ausência de qualquer molécula, a corrente iônica que flui pelo canal é máxima e estável. Ao adicionarmos um analito (2) por difusão, a molécula chega ao interior do canal e interage com o poro modulando a sua corrente de específica de acordo com as propriedades da molécula, resultando em sua assinatura digital molecular definida pelo conjunto de sua profundidade de bloqueio (A) e tempo de residência (B). Adaptado de MERSTORF et al., 2012 28

FIGURA 11: Modelo de um nanoporo adaptado. a) Visão lateral do poro de alfa-hemolisina projetado na bicamada lipídica onde os pontos em azul indicam os locais da mutação. Neste caso, os resíduos do aminoácido 113, com a troca de uma metionina por uma fenilalanina. b) visão interna do nanoporo evidenciando os resíduos substituídos. Adaptado de LIU et al., 2010..... 30

FIGURA 12: Representação esquemática do sequenciamento com o nanoporo. Com um modelo da passagem do DNA pelo lúmen do poro em A, em B e C esquema de registros atuais e, em D previsão de registros futuros alcançados pela modulação de corrente de forma independente por parte de cada base nitrogenada. Adaptado de KING; GOLOVCHENKO, 2005..... 32

FIGURA 13: Distribuição de massa obtida com nanoporo unitário formado pela α -hemolisina (figura superior) comparada com o convencional espectro de massas MALDI-TOF (parte inferior da figura) para o PEG polidisperso ($M_r=1,500$ g/mol). Maiores valores de I / I_{open} correspondem a massas inferiores de PEG. Retirado de ROBERTSON et al. 2007 33

LISTA DE ABREVIATURAS

CAP	Copal
DMM	Distribuição de massa molar
FDA	Do inglês, Food and Drug Administration
KDa	Quilodalton
Koff	Constante de dissociação
Kon	Constante de associação
MALDI	Do inglês Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)
MM	Massa molar
Mr	Massa relativa
nS	Nanosiemens
PEG	Polietilenoglicol
PEO	Poli (óxido de etileno)
PVP	Poli N-vinil-2-pirrolidona
STEM	Troncular
TOF	Do inglês, time-of-flight
α -HL	α -hemolisina de <i>Staphylococcus aureus</i>
τ_{on}	Tempo característico entre os bloqueios
τ_{off}	Tempo de permanência do analito no interior do nanoporo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Aspectos Históricos da Ciência dos Polímeros	15
2.2 Distribuição de Massa Molar Polimérica	16
2.3 Caracterização Polimérica	17
2.4 Espectrometria de Massas	18
2.4.1 Espectrometria de Massas com ionização MALDI	19
2.5 Poli N-vinil-2-pirrolidona (PVP)	21
2.6 Polietilenoglicol (PEG)	23
2.7 Nanoporo proteico da alfa-hemolisina como biossensor, sequenciador molecular ou espectrômetro de massas	24
2.7.1 Princípio de Funcionamento do sensor estocástico.....	27
2.7.2 Princípio de funcionamento do sequenciador e espectrômetro baseado no nanoporo unitário	31
3 OBJETIVOS	35
4 MANUSCRITO	36
5 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	47
APÊNDICES	53
APÊNDICE A – ANÁLISE DA AMOSTRA DE POLIVINILPIRROLIDONA COM O SENSOR ESTOCÁSTICO FORMADO POR NANOPORO PROTÉICO UNITÁRIO	53
APÊNDICE B - NANOPORO PROTÉICO EM ELEVADAS CONCENTRAÇÕES DE SAIS HALOGÊNIOS: A CONDUTÂNCIA	54
APÊNDICE C - STOCHASTIC SENSOR FORMED BY SINGLE PROTEIN NANOPORE IN CHARACTERIZATION OF POLYVINYLPYRROLIDONE	55
APÊNDICE D - SOLUBILITY OF POLYETHYLENE GLYCOL AND POLYVINYLPYRROLIDONE IN SOLUTIONS OF ALKALI CHLORIDES	56

1 INTRODUÇÃO

Muitas propriedades físicas dos polímeros são dependentes do comprimento de suas cadeias, ou seja, de sua massa molar. Como polímeros normalmente envolvem uma larga faixa de valores de massa molar é de se esperar grande variação nas propriedades de uma amostra polimérica (CANEVAROLO JR, 2006).

Existem atualmente inúmeras técnicas analíticas destinadas à análise e caracterização destes compostos tais como a cromatografia, osmometria, viscosimetria e espectroscopia. Tais métodos, embora comumente utilizados para a caracterização de compostos orgânicos, apresentam como problema comum, a incapacidade de revelar detalhes importantes sobre a composição intrínseca dos polímeros, de modo que, na maioria dos casos não são capazes de fazer diferenciação entre os oligômeros, não distinguindo impurezas ou aditivos presentes na amostra (ÇAL, 2008).

Recentemente foi demonstrada a utilização de nanoporos protéicos unitários, atuando como um espectrômetro de massas em solução, baseado na interação entre o nanoporo inserido em uma bicamada lipídica, banhada por solução iônica, e moléculas poliméricas de tamanhos variados, resultando em assinaturas moleculares características, capazes de promover a distinção destes compostos com base na modulação da corrente iônica em função das massas molares de suas cadeias (ROBERTSON et al., 2007; STANFORD et al., 2010).

Nesse contexto, nanoporos aquosos formados pela alfa-hemolisina de *Staphylococcus aureus* (α -HL) podem atuar como elemento de reconhecimento para detectar moléculas orgânicas e inorgânicas em meio aquoso, pois oferecem condições de alterações em sua estrutura molecular (uso de mutantes), possibilitando o seu remodelamento para produzir nanoporos adaptados à detecção de analitos com características físico-químicas diversas (MOVILEANU et al., 2009).

Estudos recentes (RODRIGUES et al., 2008) mostraram que o aumento da concentração do KCl melhora qualitativamente as características do sensor formado pela α -HL em bicamada lipídica plana. Além da evidência de que a composição iônica da solução que banha o sensor nanoscópico também pode alterar a energia de interação do analito com o nanoporo, provavelmente, pelo efeito salting-out (GURNEV et al., 2009; RODRIGUES et al., 2008). Deste modo, neste trabalho estudamos o transporte do polímero sintético poli

N-vinil-2-pirrolidona (PVP) através do nanoporo unitário formado pela alfa-hemolisina (α -HL) incorporada em bicamadas lipídicas, visando utilizar este nanoporo para análise da polidispersidade de amostras poliméricas e assim possibilitar a utilização deste dispositivo para a caracterização de polímeros sintéticos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A atual revisão bibliográfica vem fazer uma abordagem teórica dos conceitos referentes à pesquisa em questão, com base nas publicações recentes envolvendo o tema abordado.

2.1 Aspectos Históricos da Ciência dos Polímeros

Embora os materiais poliméricos tenham revolucionado o desenvolvimento tecnológico deste século, seu surgimento, do ponto de vista científico, veio a ocorrer de fato, na segunda metade do século XIX (CANEVAROLO JR, 2006).

O termo polímero foi proposto inicialmente pelo famoso químico alemão Jöns Jacob Berzelius em 1832. Na realidade Berzelius tentou criar um termo para diferenciar moléculas orgânicas que possuíam os mesmos elementos químicos, mas não necessariamente as mesmas propriedades químicas, como por exemplo, os gases etileno e buteno. Inicialmente estas moléculas foram chamadas de isoméricas e posteriormente Berzelius esclareceu que as moléculas de buteno, seriam o estado polimérico das moléculas de etileno, que em sua opinião possuíam 1 átomo de carbono e 2 átomos de hidrogênio. Assim, o termo polímero foi utilizado, a princípio, para representar as moléculas de buteno como sendo constituídas de muitas (poli) unidades (meros) de etileno. Vale a pena ressaltar que nesta época não se conhecia o conceito de macromoléculas, que só veio a ser estabelecido em meados do século XX através de Hermann Staudinger, um jovem pesquisador e professor de química orgânica do Instituto Federal de Tecnologia (ETH) em Zurique que decidiu dedicar-se a estudos de macromoléculas para compreender melhor o comportamento dos compostos orgânicos conhecidos até então como “high molecular compounds”. De modo que o termo “polímero” só veio a ser usado como é conhecido hoje após 1922 (MORAWETZ, 1985).

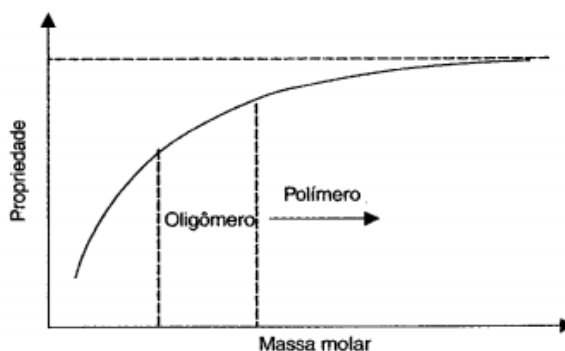
A tese mencionada pela primeira vez em 1917 por Staudinger, na qual os compostos orgânicos como a borracha natural, a celulose e o amido possuíam cadeias poliméricas como moléculas, foi muito contestada pelos pesquisadores da época. Em 1922 Staudinger utilizou polímeros sintéticos tal como poliformaldeído, ou melhor, poli (óxido de metileno) para simular o comportamento das macromoléculas de amido. Sua contribuição tornou-se mais significativa quando previu que as moléculas poliméricas poderiam se cristalizar, mesmo possuindo elevados pesos moleculares. Mas apesar de

mostrar evidências experimentais sobre as características moleculares das substâncias poliméricas, Staudinger foi, muitas vezes, severamente criticado por importantes pesquisadores da época. De modo que a importância do trabalho sobre o conceito de polímeros realizado por Staudinger só foi reconhecido muitos anos mais tarde quando este recebeu o Prêmio Nobel de Química em 1953 (ÇAL, 2008).

2.2 Distribuição de Massa Molar Polimérica

O material polimérico se diferencia dos demais por possuir uma cadeia longa, isto é, de elevada massa molar, o que influenciará em suas propriedades físico-químicas de tal modo, que o seu conhecimento e controle são de fundamental importância tanto para os setores de síntese, quanto para o mercado de aplicação destes compostos. Normalmente as mudanças da massa molar (MM) de um polímero afetam suas propriedades físico-químicas de maneira assintótica, isto quer dizer que uma dada variação de massa molar, provocará maiores alterações nas propriedades quando ocorrer em moléculas de baixa MM, quando comparadas com sua influência em moléculas de alta MM, conforme ilustrado na figura 1.

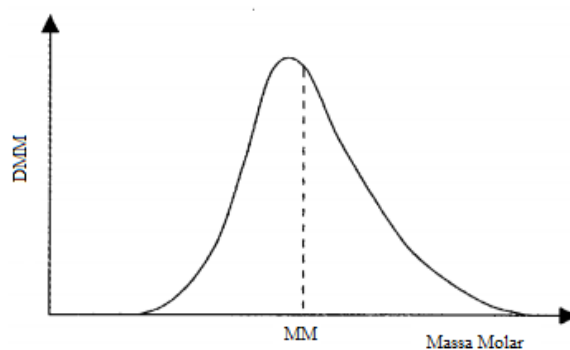
Figura 1 - Variação das propriedades poliméricas em função de sua massa molar. Observe que a variação de uma dada propriedade é mais influenciada em cadeias oligoméricas com tendência à estabilidade a partir de um ponto determinado de crescimento da molécula do polímero.



Fonte: CANEVAROLO JR, 2006.

Durante a etapa de polimerização, o crescimento da cada cadeia polimérica ocorre de modo independente, de forma que durante a propagação, a um dado momento o centro ativo se instabiliza e desaparece. Tal instabilização ocorre de maneira independente e diferente para cada cadeia, produzindo cadeias com comprimentos diferentes, variando em torno de um valor médio. Esse fato gera a distribuição de massa molar (DMM), mostrada na figura 2, outro dado importante para a previsão do comportamento e, portanto, utilização prática do polímero (CANEVAROLO JR, 2006).

Figura 2. Curva de distribuição de massa molar (DMM) resultante de uma amostra com cadeias de tamanhos variados ante um valor médio dessas massas molares (MM).



Fonte: CANEVAROLO JR, 2006.

2.3 Caracterização Polimérica

Devido às dificuldades de controle como resultado do método de polimerização, os polímeros podem apresentar uma mistura de cadeias poliméricas com diferentes tamanhos. Levando em conta que as propriedades dos polímeros apresentam alta dependência do peso médio das moléculas que compõem a mistura (CANEVAROLO JR, 2006), a caracterização destes compostos quanto à dispersão de massa, estrutura química e ordenação molecular são muito importantes para estabelecer uma correlação entre as propriedades químicas, físicas e mecânicas dos produtos obtidos (BOVEY; MIRAU, 1996).

O desenvolvimento de novas técnicas de caracterização a partir da segunda metade do século XIX pôde elucidar de uma forma mais convincente alguns aspectos sobre

a Ciência de Polímeros, fato que tornou possível um maior domínio sobre as técnicas de polimerização (MORAWETZ, 1985). Existem atualmente inúmeras técnicas analíticas destinadas à análise e caracterização destes compostos tais como a cromatografia, osmometria, viscosimetria e espectroscopia. Tais métodos, embora comumente utilizados para a caracterização de compostos orgânicos, apresentam como problema comum, a incapacidade de revelar detalhes importantes sobre a composição intrínseca dos polímeros, de modo que, na maioria dos casos não são capazes de fazer diferenciação entre os oligômeros, não distinguindo impurezas ou aditivos presentes na amostra (BOHN; HEERMANN, 2009; CHEN et al., 2002; ÇAL, 2008).

2.4 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas é uma ferramenta analítica utilizada para a medida da massa molecular de substâncias químicas (que devem estar eletricamente carregadas). Permite também identificar, quantificar e elucidar as propriedades estruturais de moléculas, e, atualmente constitui-se em uma técnica de extrema importância e aplicabilidade em diferentes áreas, como química, biologia, ciências médicas, tecnológicas e inúmeras outras.

O princípio básico da espectrometria de massas consiste em gerar íons a partir de compostos (orgânicos ou inorgânicos) através de um método de ionização apropriado e assim separá-los através de sua relação massa-carga (m/z) em um analisador de massas, e detectar qualitativamente e/ou quantitativamente os compostos a partir da relação massa-carga (m/z) dos íons e suas respectivas abundâncias por meio de um detector, que “conta” os íons e converte o sinal em corrente elétrica. A magnitude do sinal elétrico em função da relação m/z é convertida por um processador de dados, que gera o espectro de massas correspondente (GROSS, 2004).

Inicialmente, a aplicação da espectrometria de massas era restrita a análise de gases, substâncias voláteis e termicamente estáveis, pois as primeiras técnicas de ionização empregadas (impacto de elétrons e química) são processos constituídos por duas etapas, nas quais o analito é vaporizado com aquecimento e a ionização ocorre uma vez que a molécula esteja na fase gasosa (KINTER; SCHERMAN, 2000).

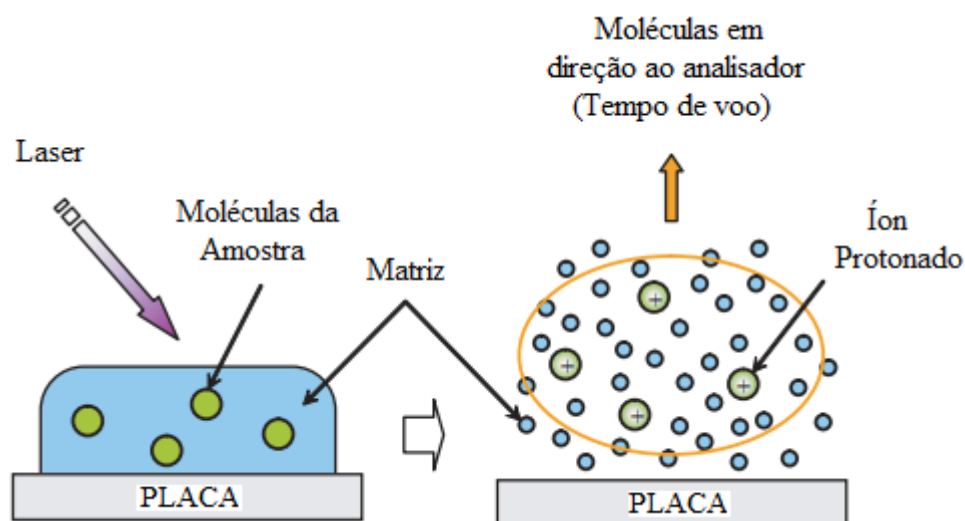
2.4.1 Espectrometria de Massas com ionização MALDI

O desenvolvimento de novas técnicas de ionização foi uma mudança fundamental, pois permitiu a produção de íons a partir de compostos de alta massa molecular e não voláteis. Dentre essas novas técnicas destaca-se a técnica de MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization) que desde a década de 80 vem juntamente com outros métodos aliados, estendendo a análise de espectrometria de massas a um vasto número de diferentes moléculas. (KARAS; HILLENKAMP, 1988; SARAIVA, 2008).

A técnica de ionização/dessorção a laser assistida por matriz, usualmente chamada de MALDI foi descrita por Karas e Hillenkamp em 1988. Nesta técnica, a amostra contendo a espécie de interesse e uma matriz (composto necessário para a ionização da amostra) são solubilizadas em solvente orgânico e/ou água e uma pequena quantidade de cada solução (normalmente 1µL) é depositada sobre uma placa. Com a evaporação do solvente, a matriz se cristaliza e as moléculas da amostra ficam envolvidas pelo material cristalino dessa matriz.

A matriz utilizada (geralmente ácidos orgânicos aromáticos) deve absorver no comprimento de onda utilizado no experimento. Deste modo, um pulso de laser, com comprimento de onda na região do ultravioleta, incide sobre essa mistura e a energia do laser é absorvida pela matriz (Figura 3), o que promove a sua sublimação. As moléculas do analito, inclusas na matriz, são arrastadas para a fase gasosa e a formação dos íons ocorre através da transferência de carga (ex: transferência de prótons) das moléculas da matriz para o composto analisado que é detectado na forma protonada (GROSS, 2004; KENDRICK, 2008; MONTAUDO et al., 2006;).

Figura 3 - Princípio da ionização MALDI. A matriz que envolve as moléculas da amostra, ao absorver a energia do laser, promove a transferência de prótons para as moléculas analisadas que uma vez protonadas seguem em direção ao tubo de voo.



Fonte: OKAMOTO, 2006.

Em grande parte das aplicações, a técnica de MALDI está acoplada com analisadores de massas do tipo tubo de voo, a exemplo do modelo ilustrado pela figura 4, denominados TOF (time-of-flight).

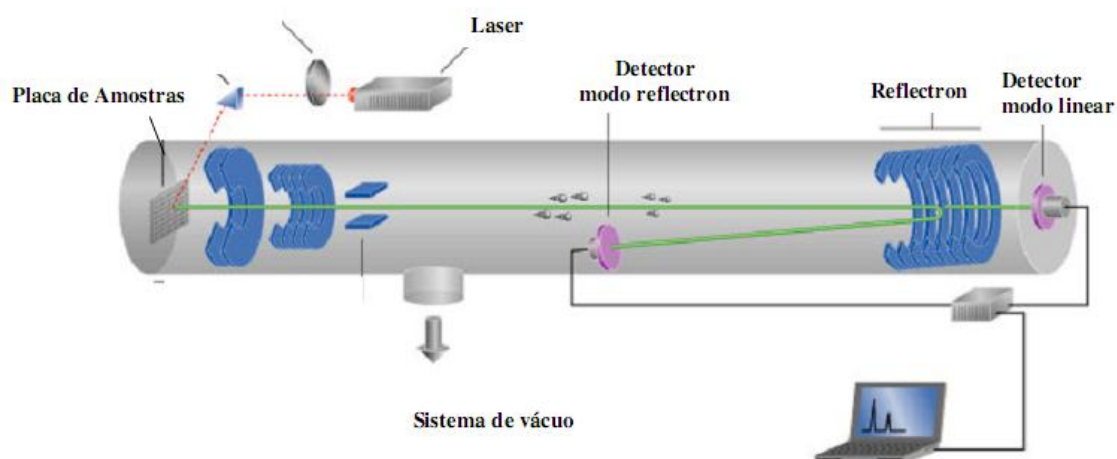
Os íons formados durante o pulso de laser são continuamente extraídos e acelerados em direção ao analisador de massas (tubo de voo) por um campo elétrico (tipicamente entre 10-30 kV) aplicado entre a placa de amostragem e a grade de aceleração. Quando deixam esta região de aceleração, os íons de diferentes m/z são separados de acordo com o seu tempo de voo em um tubo, cujo caminho percorrido tem comprimento conhecido. Sob a condição que todos os íons iniciaram a sua jornada ao mesmo tempo ou no mínimo, dentro de um intervalo de tempo suficientemente curto, os íons mais leves chegarão mais rapidamente ao detector do que os mais pesados, uma vez que a energia cinética das espécies ionizadas é teoricamente a mesma (SARAIVA, 2008).

O analisador TOF pode operar em dois modos: linear e refletor. O modo linear é utilizado para moléculas de massa molecular elevada, como as proteínas, peptídeos e polímeros e o modo refletor para moléculas de massa de até aproximadamente 5000 Da.

O modo refletor faz uso de um espelho eletrostático composto por uma série de lentes (reflectron) com diferença de potencial crescente, utilizado para corrigir dispersões de energia e posição dos íons formados que ocorrem no campo de aceleração do TOF. Essas dispersões resultam numa falta de homogeneidade de energia cinética, de maneira

que íons com mesma relação massa/carga tenham energias iniciais diferentes. Deste modo, após atravessarem a primeira região do tubo de voo, os íons penetram na região do reflectron e são desacelerados até atingirem energia cinética nula, quando são expelidos em direção oposta. Os íons com excesso de energia cinética penetram mais no campo elétrico de desaceleração e gastam mais tempo na região do reflectron do que os íons com menos energia. O emprego do reflectron promove uma correção no tempo de voo, de modo que os íons com mesma relação (m/z) cheguem simultaneamente no detector promovendo, assim, um aumento na resolução (SARAIVA, 2008).

Figura 4 - Esquema geral de um espectrômetro de massas MALDI-TOF, ilustrando suas partes componentes que vão desde a placa de aplicação da mostra, sobre a qual ocorrerá o pulso do laser passando pelo campo de aceleração das partículas até chegar ao detector, onde os íons serão detectados em função de sua m/z .

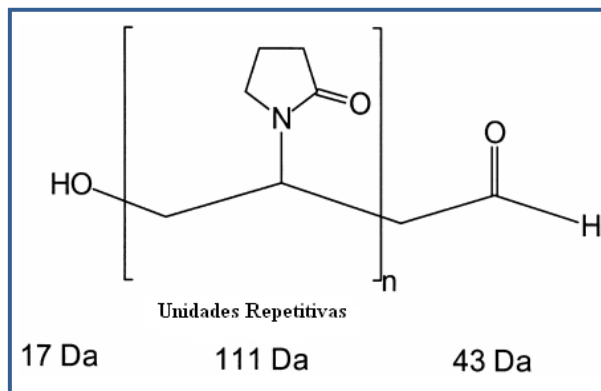


Fonte: SARAIVA, 2008.

2.5 Poli N-vinil-2-pirrolidona (PVP)

A Poli N-vinil-2-pirrolidona (PVP), também chamada de polivinilpirrolidona ou povidona (Figura 5), é um homopolímero de N-vinil-2-pirrolidona contendo um grupamento amida altamente polar e grupamentos apolares de metileno. Devido à natureza de seus grupamentos químicos a PVP apresenta característica anfótera, ou seja, além da dissolução em água também é capaz de se dissolver em alguns solventes orgânicos, tais como ácido acético, ácido fórmico, etanol, etilenoglicol, metanol, cloreto de metileno entre outros (TRIMPIN et al., 2001).

Figura 5. Estrutura química da molécula de PVP.



Fonte: TRIMPIN et al., 2001.

A PVP constitui-se em um composto higroscópico, chegando a absorver uma média de 20% do seu peso em umidade do ar, com propriedades adesivas e coesivas. Quando em solução, apresenta excelentes propriedades de umidificação e formação de filmes poliméricos, fato que torna possível sua utilização no desenvolvimento de películas de revestimento ou como aditivo para revestimento (SHELANSKI et al., 1965, TAKAGISHI; KUROKI, 1973).

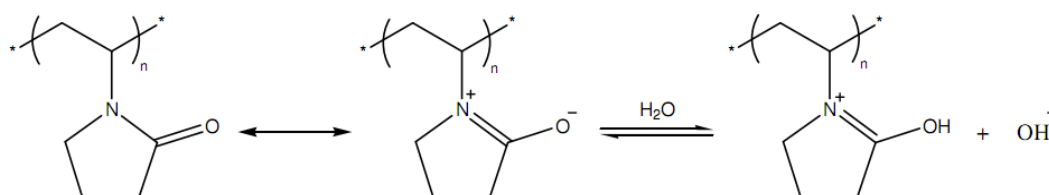
Na indústria farmacêutica seu principal uso tem sido no revestimento de comprimidos, retardando e conseqüentemente controlando a liberação do princípio ativo do fármaco. Além disso, descobriu-se que este polímero é capaz de formar um complexo com o iodo, que foi apresentado para o mercado farmacêutico nos anos de 1950 e é usado até hoje como anti-séptico de uso tópico ou oral (ISP TECHNOLOGIES, 2004).

Após seu desenvolvimento na Alemanha, em meados dos anos de 1930, foi proposta como componente do plasma sanguíneo artificial, muito utilizado durante o período da segunda guerra mundial. Devido a todas as suas propriedades, como a baixa toxicidade, biocompatibilidade, relativa inércia química, formação de filmes e resistência à degradação, encontrou usos em praticamente todos os ramos industriais, principalmente nos da indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos (ROBINSON, 1990).

Em sistemas aquosos, o átomo de oxigênio do anel lactama é fortemente hidratado uma vez que não se encontra protegido por grupamentos apolares. Os grupos hidrocarbonetos vizinhos, por sua vez, protegem o átomo de nitrogênio, impossibilitando sua hidratação. Dessa forma a PVP é capaz de formar ligações de hidrogênio com as

moléculas de água, além de apresentar interações intramoleculares das próprias cadeias de PVP e de exibir um caráter básico (figura 6) (TAKAGISHI; KUROKI, 1973).

Figura 6 - Caráter Básico do PVP em sistemas aquosos. A base conjugada do PVP é estabilizada pela ressonância no anel lactama. Devido ao seu elevado efeito indutivo negativo (- I), o oxigênio atrai os elétrons para si, aumentando a sua densidade eletrônica e facilitando a “captura” de íons H^+ .

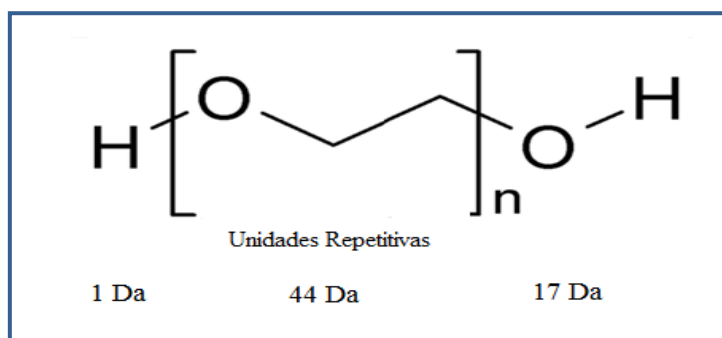


Fonte: TAKAGISHI & KUROKI, 1973.

2.6 Polietilenoglicol (PEG)

O PEG (Polietilenoglicol), também conhecido como PEO poli (óxido de etileno) (Figura 7) é um composto higroscópico de caráter anfipático e fórmula molecular $H(OCH_2CH_2)_nOH$, com pesos moleculares característicos que variam de 500 a 20.000 Daltons, solúvel tanto em água quanto na maioria dos solventes orgânicos dentre eles benzeno e tolueno, não solubilizando na presença de éter etílico e hidrocarbonetos alifáticos.

Figura 7. Estrutura química da molécula de PEG.



Fonte: Laboratório de Biofísica das Membranas e Células Tronco Dr. Oleg Krasilnikov (LBM-CT/UFPE)

A designação Polietilenoglicol é comumente utilizada para se referir a compostos de baixa massa molar (abaixo de 20.000 Da), enquanto que a designação poli(óxido de etileno) é restrita a compostos de altas massas molares (maiores que 20.000 Da) (RIBEIRO, 2001).

O PEG é uma substância de baixa viscosidade, com uma gama variada de massas molares e, conseqüentemente variadas propriedades, que de um modo geral se tornam significativamente pertinentes para aplicações industriais, dentro as quais encontram-se sua insolubilidade em água a elevadas temperaturas, formação de complexos com cátions metálicos, alta mobilidade com grande poder de volume excluído em água, além de atuar como agente precipitante de proteínas e ácidos nucléicos. Tais propriedades conferem ampla utilização deste polímero como agente emulsificante, umectante, lubrificante, plastificante e detergente e em diversos setores como médico, farmacêutico, odontológico, cosmético, têxtil e alimentício tendo inclusive aprovação reconhecida para consumo interno pelo Food and Drug Administration (FDA) (GARAY; LABAUNE, 2011).

A utilização do PEG apresenta, ainda, um grande interesse por parte da biotecnologia e ciências biomédicas e de biomateriais, uma vez que por ser um composto biodegradável e atóxico, pode ser utilizado como segurança em sistemas biológicos e sem problemas de agressão ao meio ambiente. Além disso, devido a sua baixa imunogenicidade e capacidade de promover fusão entre células, o PEG tem sido amplamente utilizado em pesquisas envolvendo cultura celular e junções neuromusculares (MAGGIO et al. 1976; OSHIMA, 2008).

2.7 Nanoporo protéico da alfa-hemolisina como biossensor, sequenciador molecular ou espectrômetro de massas

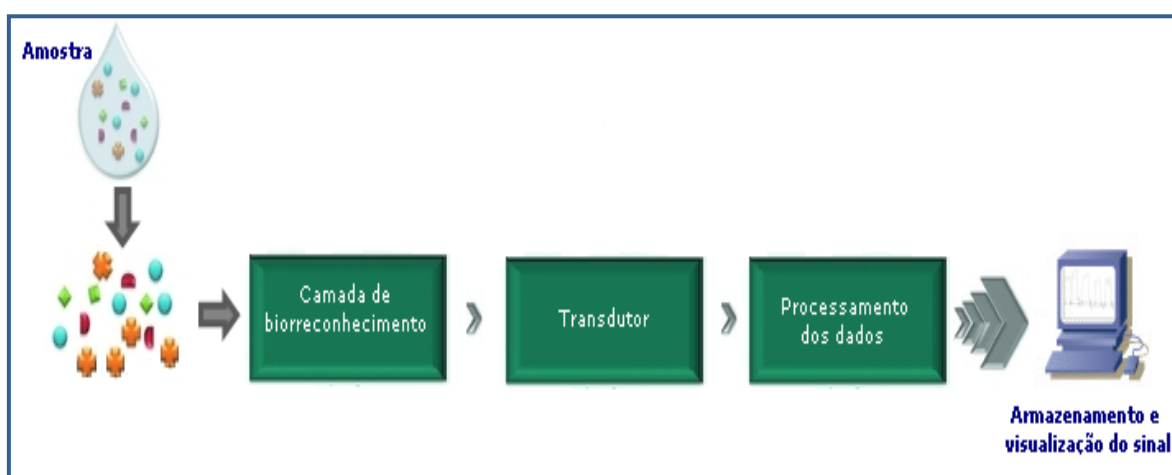
Um biossensor pode ser definido como um dispositivo analítico, constituído por um material biológico (enzima, anticorpo, proteína, DNA, etc.) ou derivado de um material biológico (biomimético), intimamente associado ou integrado a um transdutor físico-químico (FISHMAN et al. 1998; RODRIGES, 2006; WARSINKE et al., 2000; WILSON; GIFFORD, 2005,), capaz de detectar analitos químicos e/ou biológicos qualitativa e quantitativamente (KIRSCH et al., 2013).

Tal dispositivo pode ser representado esquematicamente por três partes constituintes como ilustrado na figura 8. A primeira parte é formada pelo elemento biológico ou elemento sensor (camada de biorreconhecimento) que possui a propriedade de

reconhecer seletivamente e interagir com o analito. Essa interação por sua vez, resulta na alteração de uma ou mais propriedades físico-químicas (modificação de pH, transferência de elétrons, variação de massa, transferência de calor, liberação de gases ou íons) que são detectadas e medidas por meio de um transdutor óptico, eletroquímico, termoeletrônico, piezoeletrônico ou magnético.

O transdutor, que representa a segunda parte do biossensor, atua interpretando os eventos biológicos, ocorridos na etapa de detecção, transformando-os em sinais eletrônicos proporcionais em magnitude e/ou frequência à concentração de um determinado analito ou grupo de analitos que interagem com o elemento sensor. A terceira parte (processamento), por fim, diz respeito à saída de dados que processa os sinais eletrônicos do transdutor, tornando-os legíveis no nível de uma interface humana qualquer como um medidor, um display ou monitor de computador (FURTADO et al., 2008; RODRIGUES, 2006).

Figura 8. Esquema geral dos componentes de um biossensor.



Fonte: LECHUGA, 2011.

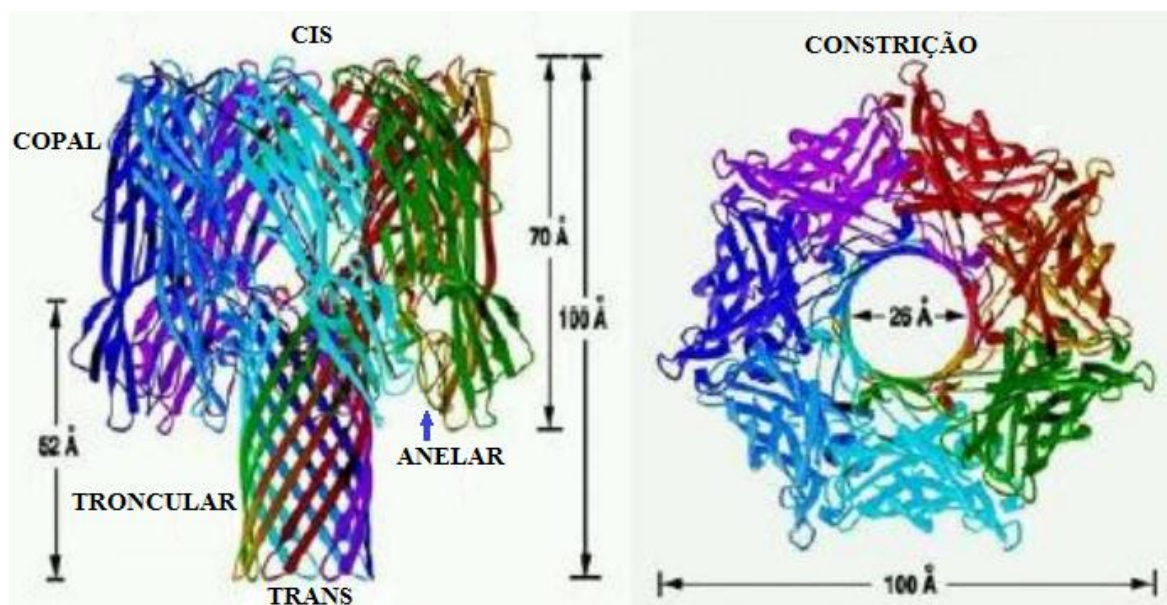
Poros protéicos de escala nanométrica têm sido bastante investigados para várias aplicações na nanobiotecnologia, principalmente, como sensores estocásticos para diversas moléculas biológicas, que vão desde cátions e ânions inorgânicos, pequenas moléculas orgânicas até macromoléculas poliméricas (MOVILEANU, 2009; ZHAO et al., 2008).

Dentre os poros protéicos mais utilizados, os nanoporos formados pela alfa-hemolisina de *Staphylococcus aureus*, incorporados em bicamadas lipídicas planas têm sido largamente estudados mostrando-se, nos últimos anos, como eficiente ferramenta no desenvolvimento de sensores estocásticos (ZHAO, 2008).

A alfa-hemolisina (α -HL) também chamada alfatoxina, secretada pela bactéria *Staphylococcus aureus*, é uma citolisina dotada da capacidade de formar poros aquosos tanto em membranas biológicas quanto em bicamadas lipídicas artificiais (KRASILNIKOV et al, 2000). É uma proteína com peso molecular em torno de 33 kDa, liberada na forma de monômeros de polipeptídeos de 293 aminoácidos (GRAY; KEHOE, 1984) solúveis em água, os quais se inserem em membranas e então se oligomerizam para formar um poro heptamérico transmembrana que permite a passagem de água e a interação de diversas moléculas com seu interior (GU et al., 1999; NOSKOV et al., 2004).

O nanoporo formado pela α -HL (figura 9) apresenta três domínios bem definidos, o copal (CAP) com diâmetro de 4,6 nm que fica praticamente fora da membrana; o troncular (STEM) que se insere na membrana e tem diâmetro de aproximadamente 2 nm, sendo composto por 14 folhas β -barril, e, o anelar (RIM) que repousa sobre a membrana. Os domínios copal e troncular estão separados por uma constrição de aproximadamente 1,4 nm de diâmetro, o que torna esse canal, uma ferramenta altamente promissora para aplicações biotecnológicas, uma vez que, apresenta diâmetro compatível com diversos analitos (ASTIER et al., 2006; BAYLEY; CREMER, 2001;).

Figura 9 - Modelo do nanoporo formado pela α -HL com suas dimensões e domínios (troncular, copal e anelar), com visão lateral e de cima da região copal. A região troncular fica inserida na membrana, a região copal prolonga-se para a superfície formando um canal hidrofílico e a região anelar recobre a parte inferior do topo podendo ter alguma interação com a membrana.



Fonte: SONG et al., 1996.

Estudos realizados nas áreas de proteômica e biologia estrutural revelam que a maioria das proteínas β -barril deste tipo de poro, dobram-se formando poros aproximadamente cilíndricos com cadeias laterais hidrofílicas no interior do lúmen aquoso e resíduos hidrofóbicos externos que interagem com a bicamada lipídica. De forma que a disposição estrutural das ligações de hidrogênio entre as fitas β adjacentes conferem a estabilidade termodinâmica necessária às proteínas constituinte do poro (MOVILEANU, 2009).

O conhecimento da estrutura tridimensional em alta resolução do poro formado pela α -HL (SONG et al., 1996), sua elevada condutância (~ 4 nS em 4 M KCl) (KRASILNIKOV et al., 2006) e sua estabilidade em soluções aquosas com $\text{pH} > 7.0$ (KRASILNIKOV et al., 1988) torna o registro e análise dos eventos moleculares com esse nanoporo relativamente simples, permitindo sua utilização como elemento de reconhecimento na construção de um biossensor para a detecção de diversas substâncias em meio aquoso.

2.7.1 Princípio de funcionamento do sensor estocástico

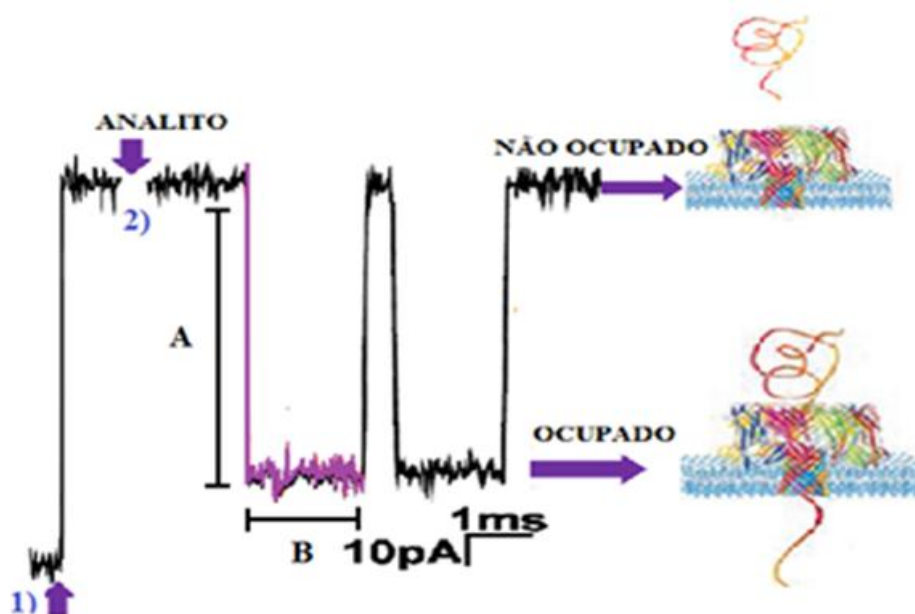
O princípio de funcionamento do sensor estocástico, baseado no nanoporo protéico de α -HL, está na detecção e quantificação de moléculas unitárias em solução aquosa (CHELEY et al., 2002), com base na alteração transitória da corrente iônica que atravessa o lúmen do nanoporo (MERSTORF et al., 2012).

Diversos estudos têm destacado os nanoporos unitários como hábeis ferramentas para a caracterização de uma ampla faixa de moléculas, uma vez que a escala de tais nanoporos é compatível com o diâmetro das macromoléculas de interesse, permitindo que as moléculas que entram no poro possam ser caracteristicamente identificadas (MOVILEANU, 2009; ZHAO et al., 2008). A alteração da corrente iônica dos nanoporos por parte dos analitos ocorre de modo similar ao processo envolvido no funcionamento do Coulter counter, um método de contagem utilizado para detectar partículas micrométricas, como células biológicas. Neste método, as partículas suspensas em solução são conduzidas através de um capilar com um diâmetro micrométrico, onde as medidas das mudanças da resistência elétrica no capilar permitem obter informações sobre a quantidade e o tamanho destas partículas (COULTER, 1953). Assim sendo, nanoporos protéicos com diâmetro

interno na faixa de 1-3 nm, se adequam perfeitamente à concepção do Coulter counter molecular (BEZRUKOV et al., 1994).

Em linhas gerais, o poro unitário incorpora-se em uma bicamada lipídica plana a qual separa dois compartimentos com solução salina. Quando um potencial elétrico é aplicado, uma corrente iônica flui através do poro, carregada pelos íons da solução e à medida que o analito ocupa o lúmen do nanoporo, a interação do analito com o poro acaba por induzir uma modulação característica (Figura 10), diminuindo a corrente iônica máxima que fluía pelo poro na ausência do analito (LIU et al., 2010).

Figura 10 - Funcionamento do nanoporo como sensor. Com a aplicação de um potencial elétrico (1), na ausência de qualquer molécula, a corrente iônica que flui pelo canal é máxima e estável. Ao adicionarmos um analito (2) por difusão, a molécula chega ao interior do canal e interage com o poro modulando a sua corrente de maneira específica de acordo com as propriedades da molécula, resultando em sua assinatura digital molecular definida pelo conjunto de sua profundidade de bloqueio (A) e tempo de residência (B).



Fonte: MERSTORF et al., 2012.

A frequência da ocorrência dos eventos encontra-se intimamente relacionada com a concentração do analito, enquanto que a “assinatura digital de corrente”, ou seja, os tempos característicos de duração e a profundidade de bloqueio permitem a identificação

do analito em estudo. Dessa forma, o elemento sensor pode apresentar-se em dois estados de conformação, um estado fechado ou ocupado (pelo analito) e outro aberto ou não ocupado, além de uma saída característica associada a cada um dos respectivos estados.

No caso de um equilíbrio simples, ($k_{\text{off}} = 1/\tau_{\text{off}}$), onde τ_{off} é o tempo característico de permanência do analito no interior do nanoporo e k_{off} a constante de dissociação do complexo analito-nanoporo; enquanto que ($k_{\text{on}} = 1/(\tau_{\text{on}} \times [A])$), onde τ_{on} é o tempo característico entre os eventos de ligação, k_{on} a constante de associação e $[A]$ é a concentração do analito.

A partir destas informações é possível calcular a constante de associação e a constante de dissociação do complexo analito-nanoporo, obtendo-se informações sobre dados cinéticos que são extremamente úteis à caracterização molecular.

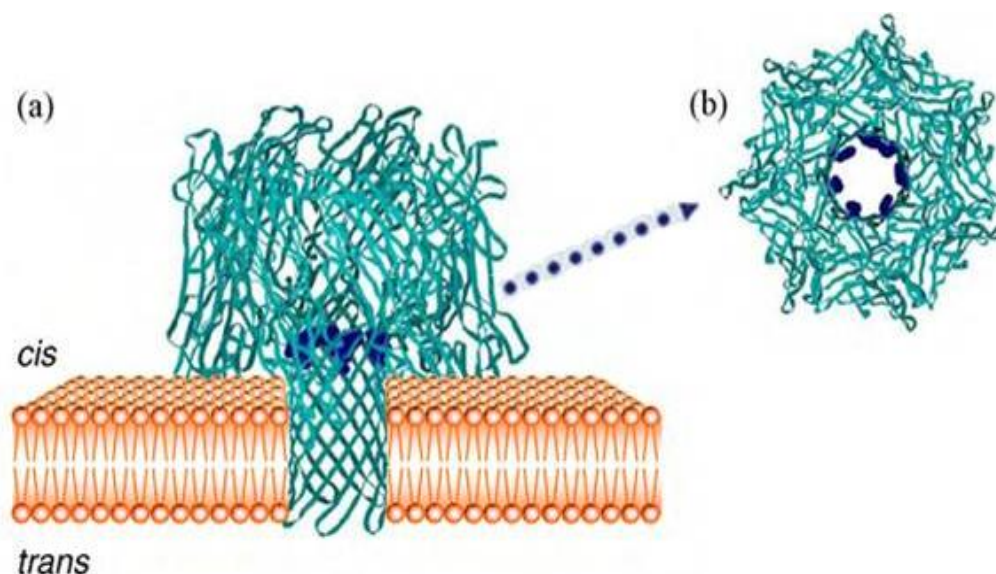
A capacidade de detecção de mais de um analito é explicada pela ligação mutuamente exclusiva do analito, graças à restrição de confinamento ao lume aquoso do nanoporo. Portanto, mesmo que dois analitos se liguem ao mesmo sítio no lume aquoso, apenas um deles terá acesso por vez, e podem ser identificados por gerarem “assinaturas moleculares” específicas. Assim sendo, uma grande variedade de substâncias pode ser identificada e quantificada por este dispositivo, incluindo cátions e ânions (CHELEY et al., 2002), moléculas orgânicas (GU et al., 1999), enantiômeros de fármacos (KANG et al., 2006), peptídeos (ZHAO et al., 2009), proteínas (ROTEM et al., 2012), ácidos nucleicos (CLARKE et al., 2009; WEN et al., 2011), organofosforados (WANG et al., 2009) entre outros tipos de analitos.

Além de apresentar alta sensibilidade e proporcionar rapidez de análise (KASIANOWICZ et al., 2007), os biossensores estocásticos apresentam vantagens óbvias em relação aos sensores baseados em outros princípios de detecção, dentre as quais se destacam o fato de que o analito não precisa, necessariamente, ser marcado (por sonda fluorescente por exemplo) para ser detectado como uma entidade unitária; a molécula não sofre degradação ao interagir com o dispositivo e a técnica permite a detecção multianalítica, ou seja, com detecção de mais de um analito presente na solução simultaneamente (KANG et al., 2006; KASIANOWICZ et al., 2001;).

Outra vantagem bastante significativa dos nanoporos de alfa-hemolisina é a sua versatilidade, uma vez que podem ser utilizados tanto em sua forma nativa, quanto genética ou quimicamente modificados, dando origem aos chamados nanoporos protéicos adaptados, conforme exemplificado na figura 11.

Os nanoporos protéicos podem ser adaptados por meio da técnica de mutagênese sítio-dirigida onde um aminoácido ou um grupo de aminoácidos que compõe a estrutura protéica do nanoporo pode ser substituído por outros aminoácidos gerando uma variedade de cadeias laterais de diferentes tamanhos, formas, polaridade e reatividade. Já na modificação química um aminoácido da cadeia lateral, geralmente cisteína, é seletivamente modificado com um reagente químico permitindo uma diversidade de funcionalidades para o poro (BAYLEY et al., 2004; LIU et al., 2010).

Figura 11 - Modelo de um nanoporo adaptado. a) Visão lateral do poro de alfa-hemolisina projetado na bicamada lipídica onde os pontos em azul indicam os locais da mutação. Neste caso, os resíduos do aminoácido 113, com a troca de uma metionina por uma fenilalanina. b) visão interna do nanoporo evidenciando os resíduos substituídos.



Fonte: LIU et al., 2010.

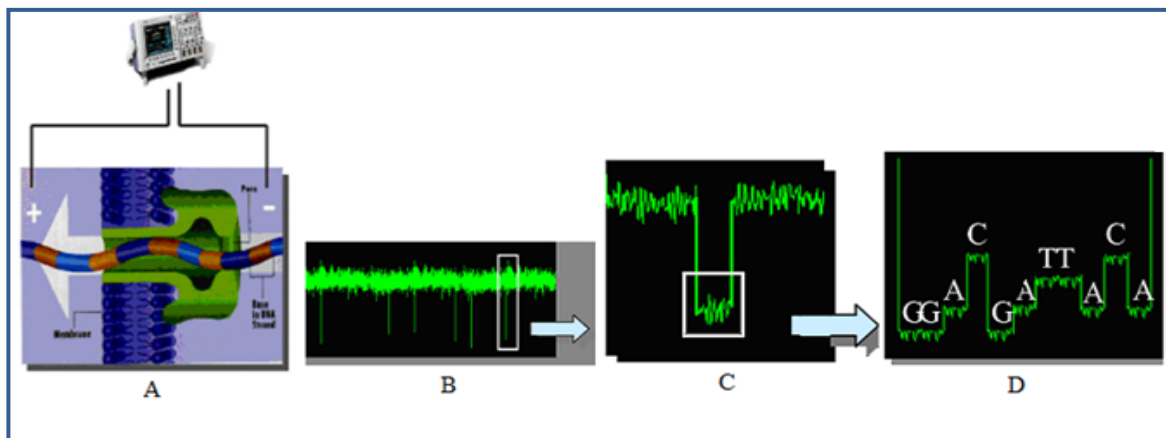
Além disso, há estudos para modular a seletividade do poro, com o uso de adaptadores moleculares (modificação não covalente) introduzidos no lúmen do poro formado pela α -HL tornando ainda mais estreita a constrição presente no interior do nanoporo, e desse modo, favorecendo uma seletividade específica com intuito de facilitar a identificação e a quantificação do analito (GU et al, 1999; KANG et al, 2006).

2.7.2 Princípio de funcionamento do sequenciador e espectrômetro baseado no nanoporo unitário

O nanoporo protéico formado pela α -HL tem-se mostrado como um potencial sequenciador de ácidos nucleicos em tempo real. Moléculas eletricamente carregadas em meio aquoso como os ácidos nucleicos também podem ser detectadas pelo nanoporo, levando à possibilidade do surgimento de uma nova técnica para sequenciamento de ácidos nucleicos, com maior rapidez de análise e sem a necessidade de marcação ou amplificação (DEAMER, 2010; MAGLIA et al., 2010). Nesta metodologia, uma única fita simples de DNA é translocada eletroforéticamente através do lúmen nanoporo unitário de α -HL banhado por solução iônica. Neste contexto as bases podem ser discriminadas por induzirem padrões característicos na série temporal da corrente iônica durante a passagem. Essa tecnologia do nanoporo possibilitará medidas da estrutura dos ácidos nucleicos, com uma precisão no nível de Angstrom (Å). A técnica promete ser rápida, sem reagentes ou marcadores químicos, e de menor custo, se comparada aos métodos convencionais (DEAMER, 2010; MAGLIA et al., 2010; STODDART et al., 2010).

O atual problema enfrentado no uso do nanoporos como sequenciador, diz respeito ao insuficiente nível de reconhecimento das bases durante a passagem da molécula do DNA via poro, devido à elevada velocidade de translocação da molécula de DNA através do poro ($\leq 10\mu\text{s}$ por base). Este valor está no limite atingível experimentalmente e insuficiente para detectar individualmente, um nucleotídeo. De fato, a velocidade desejável para o sequenciamento com o nanoporo é de 1 ms por base, quando então será possível deduzir a sequência de nucleotídeos com precisão, analisando a corrente residual. (MUTHUKUMAR, 2007). O design experimental e registros esquematizados (atuais e desejados) estão apresentados na figura 12.

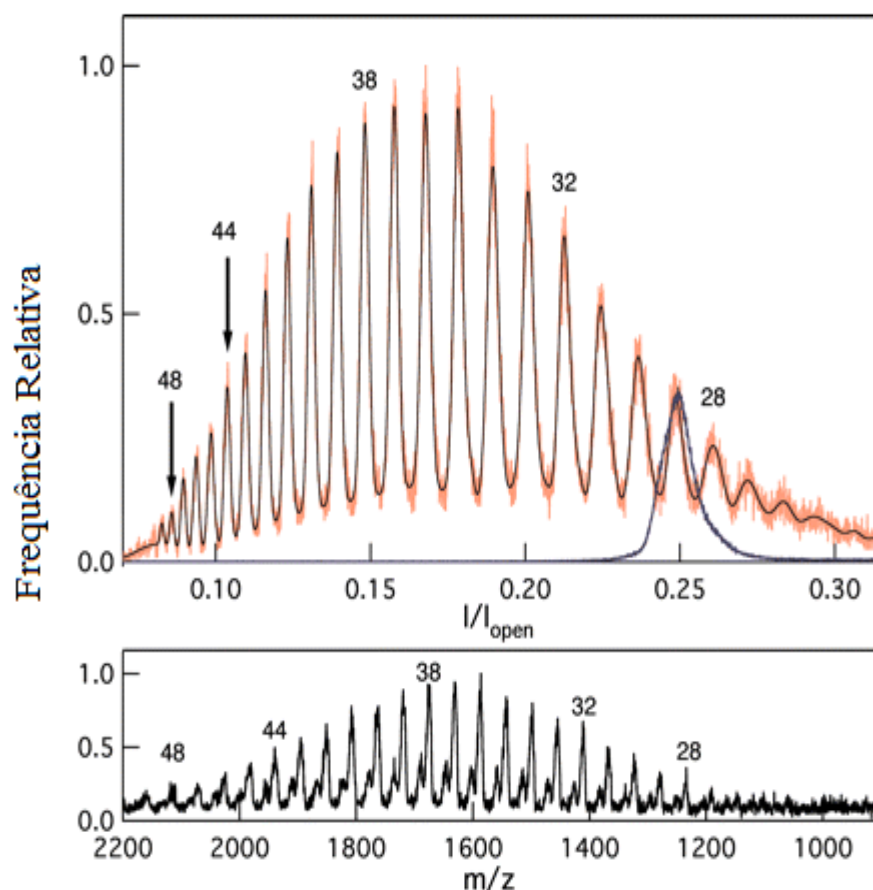
Figura 12. Representação esquemática do sequenciamento com o nanoporo. Passagem do DNA pelo lúmen do poro em A, em B e C esquema de registros atuais e, em D previsão de registros futuros alcançados pela modulação de corrente de forma independente por parte de cada base nitrogenada.



Fonte: KING & GOLOVCHENKO, 2005.

Recentemente foi demonstrada outra aplicação extremamente significativa deste nanoporo. Tal aplicação é referente à sua utilização como um espectrômetro de massas, baseado na interação entre o nanoporo formado pela alfa-hemolisina e moléculas poliméricas de tamanhos variados, que resulta numa descrição da profundidade de bloqueio e tempos de residência causados por moléculas individuais de uma amostra polidispersa de polietileno glicol (PEG) (Figura 13) em função dos comprimentos de suas cadeias poliméricas ou massa molecular, resultando numa espécie de espectrometria de massa em solução (ROBERTSON et al. 2007; STANFORD et al., 2010).

Figura 13 - Distribuição de massa obtida com nanoporo unitário formado pela alfa-hemolisina (figura superior) comparada com o convencional espectro de massas MALDI-TOF (parte inferior da figura) para o PEG polidisperso ($M_r=1,500$ g/mol). Maiores valores de I / I_{open} correspondem a massas inferiores de PEG.



Fonte: ROBERTSON et al. 2007.

A fim de solucionar os problemas de sequenciamento do DNA e ampliar a capacidade de caracterizar outros polímeros, a partir de seus espectros de massas, diversos pesquisadores têm se voltado para o estudo de substâncias que alteram o grau de estruturação da água em torno do analito e que, potencialmente possam modificar alguns parâmetros tais como, viscosidade e energia de interação, diminuindo a velocidade de translocação destas moléculas durante o seu curso pelo interior do nanoporo e aumentando a sensibilidade e resolução para as etapas de caracterização molecular.

Em estudos realizados por Rodrigues e cols. (2008), demonstrou-se que o aumento de 1M para 4M na concentração do KCl utilizado na solução banhante, melhora qualitativamente a sensibilidade e poder da identificação das moléculas do Polietilenoglicol (PEG) de diferentes massas moleculares.

Outros estudos têm mostrado ainda, que a composição iônica da solução que banha o sensor nanoscópico, também pode alterar a energia de interação do analito com o nanoporo, provavelmente, pelo efeito salting-out (GURNEV et al., 2009; RODRIGUES et al., 2008).

Estudos recentes (RODRIGUES et al., 2011) mostram que a substituição do KCl por KF diminui a solubilidade do PEG ao mesmo tempo que promove uma melhoria significativa nas características do sensor. Estes dois importantes achados permitem-nos levantar a hipótese, que o estudo da solubilidade dos analitos pode nos fornecer informações cruciais para a seleção das condições ótimas necessárias para um melhor funcionamento deste dispositivo sensor.

Deste modo estabeleceu-se uma forte relação proporcional entre, o aumento do nível de resolução do sensor para moléculas unitárias e o tipo e concentração da solução salina utilizada, levando a necessidade de novos estudos que verifiquem o potencial de novas soluções capazes de aumentar a energia de interação do complexo analito- nanoporo e que permitam a utilização deste biossensor como um espectrômetro de massas para outras moléculas poliméricas além do polietilenoglicol.

3 OBJETIVOS

As análises com o nanoporo foram realizadas com os seguintes objetivos:

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os mecanismos de interação entre moléculas poliméricas e o biossensor formado pelo nanoporo de α -hemolisina (α -HL), objetivando sua utilização como um espectrômetro de massas para analitos poliméricos diversos.

3.2 Objetivos específicos

- a) avaliar os efeitos da interação entre moléculas do polímero polivinilpirrolidona (PVP) e o nanoporo de α -HL;
- b) analisar comparativamente, a detecção dos polímeros sintéticos polivinilpirrolidona (PVP) e polietilenoglicol (PEG) por meio do nanoporo de α -HL;
- c) validar o nanoporo como espectrômetro de massas através da análise comparativa entre os espectrogramas obtidos com o nanoporo da α -HL com os obtidos pela técnica de Ionização/Dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF).

4 MANUSCRITO

Manuscrito a ser submetido ao periódico “The Journal of Chemical Physics”.

STOCHASTIC SENSOR FORMED BY SINGLE PROTEIN NANOPORE AS NEW METHOD TO CHARACTERIZATION FROM POLYVINYLPIRROLIDONE

Sheila M. Barros¹, Dijanah C. Machado¹, Janilson J. S. Júnior¹, Juliana P. Aguiar¹, Maria C. A. Melo¹, Cláudio G. Rodrigues^{1, a)}

¹*Department of Biophysics and Radiobiology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.*

Nanometer scale pores as the nanopore formed by α -hemolysin of *Staphylococcus aureus* (α -HL), can be used to detect and quantify organic molecules, nucleic acids, proteins, and polymers in aqueous environment. The analyte recognition occurs by interaction of its molecules with the nanopore. The binding of analytes to nanopores is random and reversible, and it causes characteristic fluctuations in the ionic current. For this reason, single nanopores inserted in bilayer membranes have recently been referred to as stochastic sensors. Recently, we established the use of nanopore sensor as a mass spectrometry for poly (ethylene)glycol polymer. This application may be extended to identify other types of polymers, in this study, Polyvinylpyrrolidone (PVP) in particular. PVP was chosen because it has wide applicability in pharmaceutical, cosmetic and food industries. We found that α -HL nanopore sensor is able to detect PVP and could be used as molecular mass spectrometer to this polymer. The application of the nanopore sensor for both molecular mass measurement and monitoring different polymer molecules in aqueous solutions may be important for industrial, pharmaceutical and medical area.

I. INTRODUCTION

Synthetic high-molecular mass polymers are widely applied in biochemistry, biology and medicine. Many of these applications require a detailed understanding of the structure, morphology and chemical interactions of these compounds under confinement and in aqueous solution¹. Poly-N-vinylamides such as poly (vinylpyrrolidone) are highly water soluble synthetic polymers with a broad mass distribution². These main physicochemical parameters distinguish the area of their applications such as pharmaceutical, cosmetic and

food industries³. Polyvinylpyrrolidone (PVP) is a versatile polymer with innate surface activity. It is very difficult to accurately assay due to its wide molecular weight range and amphiphilic nature⁴.

There are a number of analytical available for the analysis of synthetic polymers. But analysis of these molecules has some difficulty. The classical methods lose individual composition details that are intrinsic to polymers. In most cases, they don't differentiate between unique oligomers present in a sample, and don't distinguish impurities and/or additives⁵.

Recent studies have demonstrated that nanometer scale pore formed by α -hemolysin of *Staphylococcus aureus* (α -HL), can be used to detect and quantify specific organic molecules,^{6,7} nucleic acids,^{8,9} proteins¹⁰, and polymers^{11,12}. Recently, in adequate experimental condition, we had demonstrated that number and quantity of individual polymers in polydisperse polyethyleneglycol (PEG1500) sample is achievable with a single protein nanopore. The results are similar to conventional mass spectrometry¹³. This study aims to apply the nanopore-based method to other types of polymers, Polyvinylpyrrolidone (PVP) in particular. PVP was chosen because it wide applicability in pharmaceutical, cosmetic and food industries¹⁴.

II. EXPERIMENTAL

The wild type of *Staphylococcus aureus* α -hemolysin was purchased from (List Biological Laboratories, Campbell, CA). 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). The high quality (>99,99%) of KCl salt was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Monodisperse poly(ethylene glycol), PEG1294, was purchased from Polypure (Oslo, Norway). Polydisperse poly(vinylpyrrolidone) (PVP) 10 KDa was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris) and citric acid was from Schwarz/Mann Biotech (Cleveland, OH) and Fluka (Buchs, Switzerland) correspondingly.

Solvent-free planar bilayer lipid membrane was formed on an ~ 90 - μm diameter hole in the 25- μm Teflon film that separates two identical Teflon chambers by the lipid monolayer apposition technique, using DPhPC in hexane (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) at 25 ± 1 °C. The hole was pretreated with a solution of 1% hexadecane in hexane (Aldrich,

St. Louis, MO). We have established that the elevated KCl concentrations considerably improve single molecule identification by unitary protein nanopore¹⁶ in the experiment presented herein the membrane-bathing aqueous solutions contained 4 M of KCl, 5 mM TRIS-citric acid, pH 7.5.

α HL is the protein most frequently used to create nanopores for the development of stochastic sensing elements. In our study α HL (Calbiochem, USA) was added from the “cis” side of the membrane in concentration sufficient to form unitary protein nanopore in planar lipid bilayer. The data were obtained with an applied potential of 40mV using two silver/silver chloride (Ag/AgCl) electrodes. After, it was added PEG1294 or PVP to the “trans” compartment of the experimental chamber.

Single α HL nanopore incorporation and the measuring of parameters of the molecular signature (mean duration and amplitude of the blockage), transition rate and kinetic constants of the polymeric analyte-nanopore interaction were done essentially as described elsewhere¹⁵. In short, the on-rate constant, k_{on} , was defined as $1/(C_{analyte} \times \tau_{on})$. The characteristic time, τ_{on} , was obtained from the collected time intervals between the end of one blockade event and the onset of the next. The off-rate constant, k_{off} , was defined as $1/\tau_{off}$, where τ_{off} is the characteristic residence time of polymeric analyte in the pore. The constant of analyte α HL pore complex formation, K_f , was calculated by using the on-rate

and off-rate constants as k_{on}/k_{off} .

Experiments were done using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) in voltage clamp mode. Membrane potential was maintained using Ag/AgCl electrodes in 3M KCl 2% agarose bridges assembled within standard 200- μ L pipette tips. Currents were filtered by a low-pass eight-pole Bessel filter (Model 9002, Frequency Devices, Haverhill, MA) at 15 kHz and directly saved into the computer memory with a sampling frequency of 50-250 kHz. For data analysis, Origin version 8.0 (Microcal, Northampton, MA) was used for curve fitting and graph presentation. In addition, we used a software developed in our laboratory for distribution mass and adjusted peaks of blockade analysis.

B. MALDI-TOF Analysis of PVP Samples

In order to analysis of PVP with MALDI-TOF was used 3 β -Indole acrylic acid (IAA) as matrix and sodium trifluoroacetate as cationizing agent, both purchased from Aldrich (St. Louis, MO, USA). The employed solvent methanol (99.9%) was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland) and PVP 10 KDa purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The organic matrix (3 β -Indole acrylic acid - IAA) was dissolved in methanol. This matrix was used for all MALDI-TOF experiments. The sample was prepared using 10mg/ml of PVP (in methanol), 10mg/ml (in methanol) of the MALDI matrix 3b-indole acrylic acid (IAA) and 3m g/m l (in methanol) of the cationizing agent sodium trifluoroacetate (Na salt). A 10 μ l volume of the IAA solution, 10 μ l of the PVP solution and 1 μ l of the salt solution were added together, mixed and a volume of $\sim$ 0.5 μ l was applied to the MALDI target, with 384 spots from Bruker (Bremen, Germany).

After evaporation of the liquid phase the formed crystals, necessary for ionization of the sample molecules, in the MALDI spot were observed with a magnifying glass. The measurements were performed on Autoflex MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (BrukerDaltonics, Billerica, MA, USA). Mass spectra were acquired in linear delayed extraction mode using an acceleration voltage of 20 kV. Detection range was between 2,000 Da and 15,000 Da and ions with mass inferior to 2,000 Da were suppressed. For desorption of the components, a pulsed Nd:YAG (neodymium-doped yttrium aluminium garnet; Nd:Y3Al5O12) laser operating at 355 nm was focused on the template with intensity of 48%. The frequency used was 100 Hz, and at least 2,000 shots were accumulated for each spectrum.

For spectra acquisition, the software FlexControl Version 3.0 (BrukerDaltonics, Billerica, MA, USA) was used and the mass spectra obtained were analyzed in the software FlexAnalysis (BrukerDaltonics, Billerica, MA, USA). Mass lists were compared in the software Excel 2010 (Microsoft, CA, USA).

III. EXPERIMENTAL RESULTS AND DICUSSION

Initially, we performed experiments to analyze the effect of both PEG and PVP on the α HL conductance. Figure 2 shows the effect of trans-side addition of PEG or PVP to

membrane-bathing solutions on α -toxin nanopore. Figure 2A and 2B shows the PEG and PVP decrease conductance of the nanopore, respectively. The maximal blocking effect was observed at 40 ± 10 mV. This behavior is consistent with the findings of Rodrigues et al,¹⁹. Figure 2C and 2D shows spikes appear in the current upon addition of PEG and PVP polymers, respectively. Each (blocking events) represents a single PEG or PVP molecule translocating through the pore. The effectiveness of such inhibition was very similar for all polymers and comprised 70–80% of the maximal ionic current. As expected, high resolution recordings of PEG or PVP/ α HL interactions in the presence KCl revealed a huge difference in the frequency and duration of well-defined current blockades (Figure 2 C and D). Results obtained in KCl solutions indicate that the frequency of events is high in the presence of PEG. Additionally in PVP, observed quickly blocked events, not resolvedly, possibly in function of structural PVP-complexity.

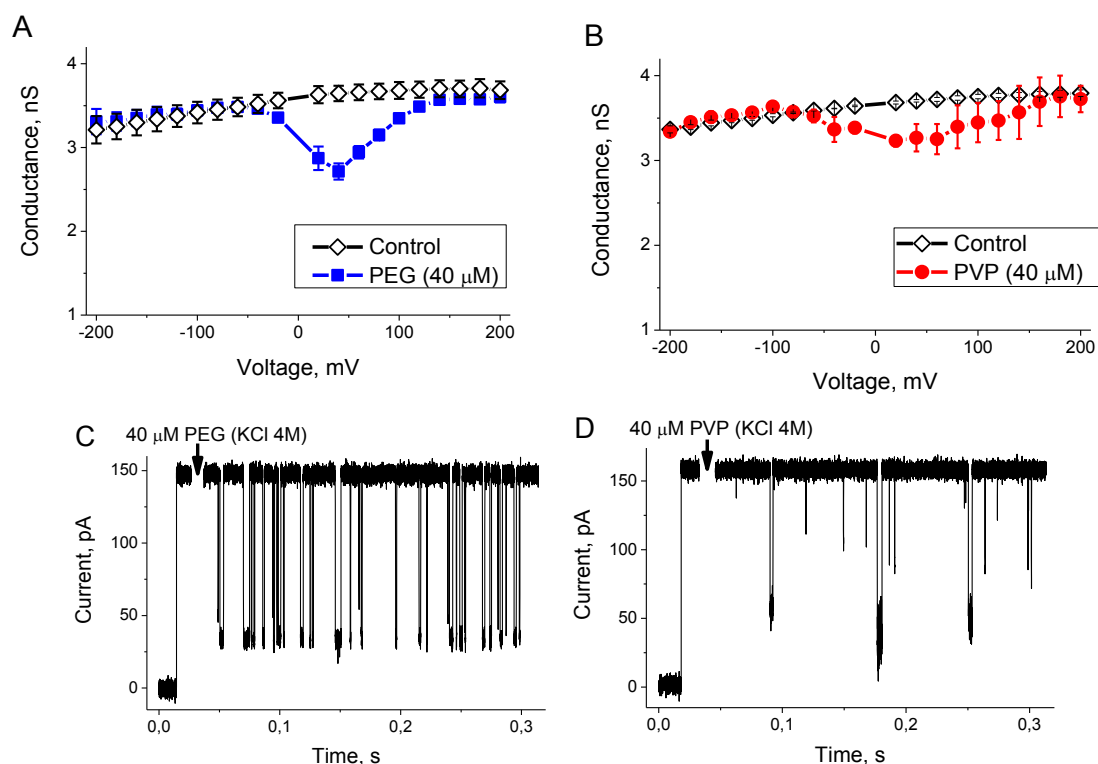


Figure 2. Effect of PEG (A) and PVP (B) on the α HL nanopore conductance. The result of at least three independent experiments (mean $\pm$ SE) is presented in each case. The typical traces of the ion current through α HL nanopore in the presence of PEG (C) and PVP (D) in the bath solution at a time resolution of 0.1 ms. Bath solution: KCl 4M, Tris 5 mM, pH 7.5. Applied potential = 40 mV.

Figure 3 shows voltage dependence at polymeric analyte-nanopore interaction. The PEG-nanopore complex formation constant is maximal in 40 mV and is practically linear at PVP. The behavior is a typically of complexation PEG or PVP with ion, resulting in polymer, acting as molecule electrically charged ^{19,20}.

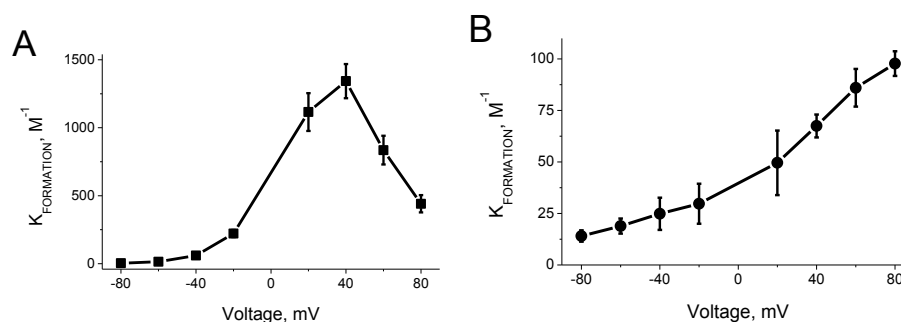


Figure 3. Voltage dependence the polymer-nanopore complex constant formation to (A) α PEG and (B) PVP. The dependence is maximum at 40 mV to PEG. On the other hand, in PVP case, the dependence is practically linear.

Additionally, we performed the analysis of polydisperse PVP sample by conventional MALDI-TOF and α HL nanopore as spectrometer (Figure 4). The nanopore was able to detect molecules of PVP. The entry of the PVP molecules into the single nanopore causes distinct mass-dependent conductance fluctuations. The conductance-based mass spectrum obtained discriminates the PVP polymeric molecules with different molecular masses. In Figure 4A, it could see several peaks at the event probability histogram. Each peak represents one component of the polydisperse PVP, however, we have got a reasonable spectrum resolution. Recently, our group got a great molecular mass spectrum for polydisperse PEG 1500 sample (Robertson et al., 2007; Stanford et al., 2010) by using a single nanopore. This technique has allowed clearly to determine the mass all the components of polydisperse PEG 1500. To improve the PVP spectrum resolution, we need to find the optimal conditions to obtain a better the PVP molecular mass discrimination resolution. One alternative could be the change of the physicochemical conditions of bath solution. It has already demonstrated that the type of ion composition the electrolytic solution can alter the sensibility of the nanopore-sensor improving its resolution, and consequently, the identification of the molecules analyte (Rodrigues et al., 2008; Rodrigues et al., 2011).

On the other hand, we also had difficulties to analyze a PVP sample by conventional MALDI-TOF method (Figure 4B). For most synthetic polymers with wide polydispersity,

as PVP, it is necessary a previous sample treatment or the use of other complementary techniques before starting the analysis by MALDI-TOF. Moreover the determination of the molecular weight distribution of polymers with high polydispersity and wide mass distribution is a hard task, such that the molecular weight distribution cannot be obtained accurately ²¹.

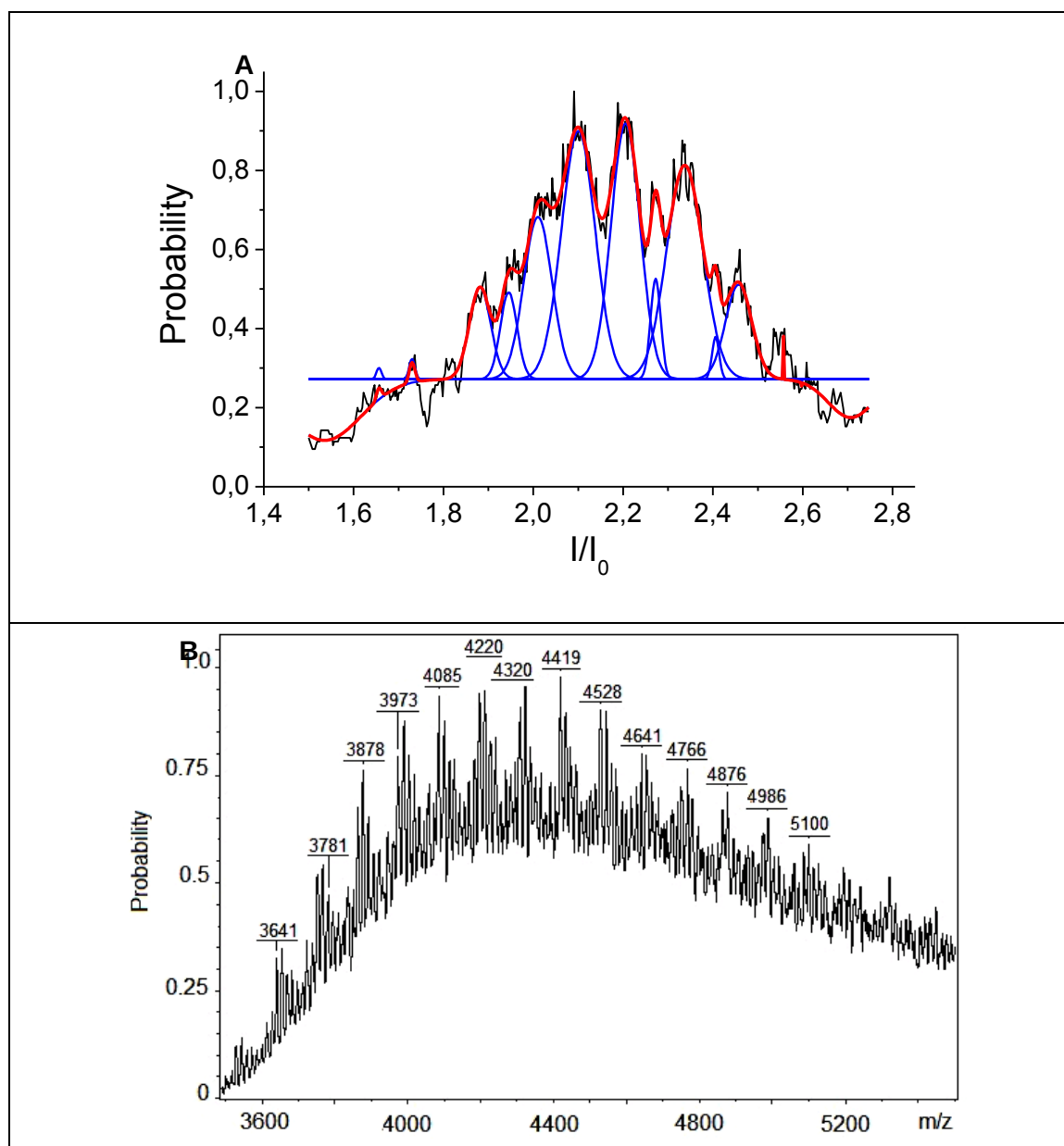


Figure 4. Mass spectrum by nanopore (A) and MALDI-TOF (B) at polydisperse PVP sample (10 KDa). The mass distributions obtained with a single nanopore, shown that the interaction between α HL nanopore and PVP causes distinct mass-dependent conductance states with characteristic mean residence times represented by their mean current values. The spectrum obtained from these currents values easily resolves PVP molecules of various sizes s , where each peak corresponds to different size of polymer.

IV. CONCLUSION

α HL nanopore-based sensor is able to detect PVP and could be used as molecular mass spectrometer to this polymer. We propose the use of nanopore for molecular mass measurement and/or monitoring diverse polymer molecules in aqueous solutions that may be important for industrial, pharmaceutical and medical area.

ACKNOWLEDGEMENTS

We dedicate this work to Dr. Oleg Vladimirovich Krasilnikov (*in memorian*). This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes); Rede de Nanotecnologia Molecular e Interfaces (RENAMI); Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Nanotecnologia para Marcadores Integrados (INCT-INAMI); Laboratório de Nanotecnologia do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Brazil.

REFERENCES

1. Granick S, et al. (2003) Macromolecules at surfaces: Research challenges and opportunities from tribology to biology. *J Polym Sci Pol Phys* 41:2755–2793.
2. Trimpin, S., Eichhorn, P., Räder, H. J., Mullen, K., Knepper, T. P., Recalcitrance of Poly(Vinylpyrrolidone): Evidence Through Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2001;938:67.
3. Rodrigues, C. G., D. C. Machado, S. F. Chevtchenko, and O. V. Krasilnikov. 2008. Mechanism of KCl Enhancement in Detection of Nonionic Polymers by Nanopore Sensors. *Biophys. J.* 95: 5186-5192.
4. Brown, M.B., S.A. Jones, G.P. Martin. Determination of polyvinylpyrrolidone using high-performance liquid chromatography. 2004.
5. Chen, R., 2002. Mass spectrometry for polymer characterization, Thesis of Doctor of Philosophy, university of Alberta, Department of Chemistry, Alberta, Canada, pp:2-35.
6. Sergey M. Bezrukov, Oleg V. Krasilnikov, Liliya N. Yuldasheva, Alexander M. Berezhkovskii, Claudio G. Rodrigues. 2007. *Biophys. J.* 87: 3162-3171
7. Li-Qun Gu, Orit Braha, Sean Conlan, Stephen Cheley & Hagan Bayley. 1999. Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter. *Nature*. 398:686–690.

8. John J. Kasianowicz, Eric Brandin, Daniel Branton, David W. Deamer. 1996. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *PNAS*. 93 (24) 13770-13773.
9. Daniel Branton, David W Deamer, Andre Marziali, Hagan Bayley, Steven A Benner, Thomas Butler, Massimiliano Di Ventra, Slaven Garaj, Andrew Hibbs, Xiaohua Huang, Stevan B Jovanovich, Predrag S Krstic, Stuart Lindsay, Xinsheng Sean Ling, Carlos H Mastrangelo, Amit Meller, John S Oliver, Yuriy V Pershin, J Michael Ramsey, Robert Riehn, Gautam V Soni, Vincent Tabard-Cossa, Meni Wanunu, Matthew Wiggin, Jeffery A Schloss. 2008. The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nature Biotechnology* 26:1146–1153.
10. Liviu Movileanu, Jason P. Schmittschmitt, J. Martin Scholtz, Hagan Bayley. 2005. Interactions of Peptides with a Protein Pore. *Biophys. J.* 89:1030–1045.
11. S.M. Bezrukov, I. Vodyanoy, R.A. Brutyan, and J.J. Kasianowicz. Dynamics and free energy of polymers partitioning into a nanoscale pore. *Macromolecules*, 1996, 29:8517-8522.
12. Robertson, J. W., C. G. Rodrigues, V. M. Stanford, K. A. Robinson, O. V. Krasilnikov, and J. J. Kasianowicz. 2007. Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 8207-8211.
13. Patent Number(s): US2010122907-A1. Title: Nanopore conductance measurement system for delineating segments of conductance time series into regions, comprises electrically resistive barrier, and unit for measuring ionic current and unit for recording its time course as time series. Inventors: Kasianowicz J J; Krasilnikov O V; Robertson J W F; Rodrigues C G; Stanford V M.
14. Robinson, B.V. PVP: A critical review of the kinetics and toxicology of polyvinylpyrrolidone (Povidine). Lewis Publishers (Chelsea, MI), 1990, 232 pp.
15. Krasilnikov, O. V., C. G. Rodrigues, and S. M. Bezrukov. 2006. Single polymer molecules in a protein nanopore in the limit of a strong polymer-pore attraction. *Phys Rev. Lett.* 97: 018301.
16. Orlik, F., B. Schiffler, and R. Benz. 2005. Anthrax toxin protective antigen: Inhibition of channel function by chloroquine and related compounds and study of binding kinetics using the current noise analysis. *Biophys. J.* 88: 1715-1724.
17. Rodrigues, C. G., D. C. Machado, O. V. Krasilnikov. 2008. Mechanism of KCl enhancement in detection of nonionic polymers by nanopore sensors. *Biophys. J.* 95:5186–5192.
18. Krasilnikov, O. V., C. G. Rodrigues, and S. M. Bezrukov. 2006. Single polymer molecules in a protein nanopore in the limit of a strong polymer-pore attraction. *Phys. Rev. Lett.* 97:018301)
19. Rodrigues, C.G. Dijanah C. Machado, Annielle M. B. da Silva, Janilson J. S. Junior, Oleg V. Krasilnikov. 2011. Hofmeister Effect in Confined Spaces: Halogen Ions and Single Molecule Detection. *Biophysical Journal*, 100, 2929-2935.

20. Stefan W. Kowalczyk, David B. Wells, Aleksei Aksimentiev, Cees Dekker. 2012. Slowing down DNA translocating through a nanopore in lithium chloride. *Nano Lett.*, 12 (2), pp 1038–1044.
21. Okamoto, Kazuo. 2006. MALDI mass spectrometry of syntetic polymers. *R&D Review of Toyota CRDL*, 41. N.3.
22. Montal M & Mueller P. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc Nat Acad Sci USA* (1972) 69(12):3561-3566.

5 CONCLUSÕES

O sensor estocástico do nanoporo formado pela alfa-hemolisina de *Staphylococcus aureus* permitiu estabelecer a polidispersidade da amostra de polivinilpirrolidona (PVP) e discriminar suas cadeias moleculares de tamanhos variados, promovendo sua distinção mediante os perfis característicos de bloqueio de corrente, evidenciando assim, sua aplicabilidade como uma ferramenta auxiliar no processo de identificação e caracterização polimérica, uma vez que os espectros gerados pelo nanoporo se mostraram muito similares aos espectros gerados pelo MALDI – TOF.

REFERÊNCIAS

- BAYLEY, H.; BRAHA, O.; CHELEY, S.; GU, L.Q. Engineered Nanopores. *In*: Nanonotechnology. Editores: NIEMEYER, C. & MIRKIN, C. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim. p. 93-112, 2004.
- BEZRUKOV, S.M.; VODYANOY, I.; PARSEKIAN, V.A. Counting polymers moving through a single ion channel. **Nature**, v. 370, p. 279-281, 1994.
- BOHN, M. & HEERMANN, D.W. Conformational properties of compact polymers. **The Journal of Chemical Physical**, v. 130, p. 174901, 2009.
- BOVEY, F.A. & MIRAU, P.A. NMR of polymers. New York: Academic Press, 1996.
- ÇAL, A. Investigation of poly(vinylpyrrolidone) with low molecular weight by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Dissertação de mestrado. HACETTEPE University, Turquia. 2008.
- CANEVAROLO JR., S.V. Ciências dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. São Paulo: Artliber Editora. 2ª edição, 2006.
- CHELEY, S.; GU, L.Q.; BAYLEY, H. Stochastic sensing of nanomolar inositol 1,4,5-trisphosphate with an engineered pore. **Chemistry & Biology**, v. 9, p. 829-838, 2002.
- CHEN, R.; YU, X.; LI, L. Characterization of poly(ethylene glycol) esters using low energy collision-induced dissociation in electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 13, p. 888-897, 2002.
- CLARKE, J.; WU, H.C.; JAYASINGHE, L.; PATEL, A.; REID, S.; BAYLEY, H. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. **Nature Nanotechnology**, v.4, p. 265-270, 2009.
- COULTER, W.H. Means for counting particles suspended in a fluid. U.S.Patent nº. 2.656.508, Issued 20, October 1953.
- DEAMER, D. Nanopore Analysis of Nucleic Acids Bound to Exonucleases and Polymerases. **Annual Review of Biophysics**, v. 39, p. 79-90, 2010.
- FISHMAN, H.A.; GREENWALD, D.R.; ZARE, R.N. Biosensors in Chemical Separations. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 27, p. 165–198, 1998.
- FURTADO, R.F.; DUTRA, R.A.F.; ALVES, C.R.; PIMENTA, M.G.R.; GUEDES, M.I.F. Aplicações de Biossensores na Análise da Qualidade de Alimentos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. ISSN 1677-1915. Novembro, 2008.
- GARAY, R.P. & LABAUNE, J.P. Immunogenicity of Polyethylene Glycol (PEG). **The Open Conference Proceedings Journal**, v. 2, p. 104-107, 2011.

GRAY, G.S. & KEHOE, M. Primary sequence of the alpha-toxin gene from *Staphylococcus aureus* Wood 46. **Infection and Immunity**, v. 46, p. 615-618, 1984.

GROSS, J.H. **Mass Spectrometry – A Textbook**. Berlin: Springer, 2004.

GU, L.Q.; BRAHA, O.; CONLAN, S.; CHELEY, S.; BAYLEY, H. Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter. **Nature**, v. 398, p. 686-690, 1999.

GURNEV, P.A.; HARRIES, D.; PARSEKIAN, V.A.; BEZRUKOV, S.M. The Dynamic Side of the Hofmeister Effect: A Single-Molecule Nanopore Study of Specific Complex Formation. **ChemPhysChem**, v. 10, p. 1445-1449, 2009.

HENG, J.B.; AKSIMENTIEV, A.; HO, C.; MARKS, P.; GRINKOVA, Y.V.; SLIGAR, S.; SCHULTEN, K.; TIMP, G. The electromechanics of DNA in a synthetic nanopore. **Biophysical Journal**, v. 90, p. 1098-1106, 2006.

ISP TECHNOLOGIES, PVP-Iodine-Povidone Iodine antiseptic Agent. International Speciality Products Technologies, 2004.

KANG, X.F.; CHELEY, S.; GUAN, X.; BAYLEY, H. Stochastic detection of enantiomers. **Journal of the American Chemical Society**, v.128, p.10684-10685, 2006.

KANG, X.F.; CHELEY, S.; RICE-FICHT, A.C.; BAYLEY, H. A storable encapsulated bilayer chip containing a single protein nanopore. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p. 4701-4705, 2007.

KARAS, M.L. & HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, v. 60, p. 2299-2301, 1988.

KASIANOWICZ, J.J.; HENRICKSON, J.E.; WEETALL, H.H.; ROBERTSON, B. Simultaneous multianalyte detection with a nanometer-scale pore. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 2268-2272, 2001.

KASIANOWICZ, J.J.; HENRICKSON, S.E.; MISAKIAN, M.; LERMAN, J.C.; PANCHAL, R.G.; HALVERSON, K.M.; BAVARI, S.M.; GUSSIO, R.; NGUYEN, T.; SHENOY, D.K.; STANFORD, V.M. The Detection and Characterization of Ions, DNA and Proteins Using Nanometer-Scale Pores. *In Handbook of Biosensors and Biochips*. R.S. Marks, D.C. Cullen, I. Karube, C.R. Lowe, and H.H. Weetall, editors. John Wiley & Sons. p. 1-20, 2007.

KENDRICK, J. The Supporting Role of Molecular Modelling and Computational Chemistry in Polymers Analysis. In: *Comprehensive analytical chemistry: Molecular characterization and analysis of polymers*. Editores: CHALMERS, J.M. & MEIER, R.J. Oxford: Elsevier, 2008.

KING, G.M. & GOLOVCHENKO, J.A. Probing nanotube-nanopore interactions. **Physical Review Letters**, v. 95, p. 216103. 2005.

KINTER, M. & SCHERMAN, N.E. Protein Sequence and Identification using Tandem Mass Spectrometry. New York: John Wiley & Sons, 2000.

KIRSCH, J.; SILTANEN, C.; ZHOU, Q.; REVZIN, A.; SIMONIAN, A. Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 8733-8768, 2013.

KRASILNIKOV, O.V.; MERZLYAK, P.G.; SABIROV, R.Z.; TERNOVSKY, V.I.; ZARIPOVA, R.K. Influence of pH on the Potential-Dependence of Staphylococcal Toxin Channels Functioning in Phosphatidylcholine Bilayer. **Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal**, v. 60, p. 60-66, 1988.

KRASILNIKOV, O.V.; MERZLYAK, P.G.; YULDASHEVA, L.N.; RODRIGUES, C.G.; BHAKDI, S.; VALEVA, A. Electrophysiological evidence for heptameric stoichiometry of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin in planar lipid bilayers. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1372-1378, 2000.

KRASILNIKOV, O.V.; RODRIGUES, C.G.; BEZRUKOV, S.M. Single polymer molecules in a protein nanopore in the limit of a strong polymer-pore attraction. **Physical Review Letters**, v. 97:018301, 2006.

LECHUGA, L.M. Biosensor. In: *Encyclopedia of Astrobiology*. Editor: GARGAUD, M. Springer, 2011.

LIU, A.; ZHAO, Q; GUAN, X. Stochastic nanopore sensors for the detection of terrorist agents: Current status and challenges. **Analytica Chimica Acta**, v. 675, p. 106-115. 2010.

MAGGIO, B.; AHKONG, Q.F.; LUCY, J.A. Poly(ethylene glycol), surface potential and cell fusion. **The Biochemical Journal**, v. 158, p. 647-650, 1976.

MAGLIA, G.; HERON, A.J.; STODDART, D.; JAPRUNG, D.; BAYLEY, H. Analysis of single nucleic acid molecules with protein nanopores. **Methods in Enzymology**, v. 475, p. 591-623, 2010.

MERSTORF, C.; CRESSIOT, B.; PASTORIZA-GALLEGO, M.; OUKHALED, A.; BETTON, J.M.; AUVRAY, L.; PELTA, J. Wild Type, Mutant Protein Unfolding and Phase Transition Detected by Single-Nanopore Recording. **ACS Chemical Biology**, v. 7, p. 652-658, 2012.

MONTAUDO, G.; SAMPERI, F.; MONTAUDO, M.S. Characterization of synthetic polymers by MALDI-MS. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 277-357, 2006.

MORAWETZ, H. Polymers: The Origins and Growth of a Science. Editor John Wiley & Sons, New York, 1985.

MOVILEANU, L.; CHELEY, S.; BAYLEY, H. Partitioning of individual flexible polymers into a nanoscopic protein pore. **Biophysical Journal**, v. 85, p. 897-910, 2003.

MOVILEANU, L. Interrogating single proteins through nanopores: challenges and opportunities. **Trends in Biotechnology**, v. 27, p. 333-341, 2009.

MULERO, R.; PRABHU, A.S.; FREEDMAN, K.J.; KIM, M.J. Nanopore-Based Devices for Bioanalytical Applications. **Journal of the Association for Laboratory Automation**, v.15, p. 243-252, 2010.

MUTHUKUMAR, M. Mechanism of DNA transport through pores. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 36, p. 435-450, 2007.

NOSKOV, S.Y.; IM, W.; ROUX, B. Ion permeation through the α -Hemolysin channel: theoretical studies based on brownian dynamics and poisson-nernst-planck electrodiffusion theory. **Biophysical Journal**, v. 87, p. 2299-2309, 2004.

OKAMOTO, K. MALDI Mass Spectrometry of Synthetic Polymers. **R&D Review of Toyota CRDL**, v.41, p.29-34, 2006.

OSHIMA, M. Efeitos farmacológicos e morfológicos do polietilenoglicol (PEG 400) em preparações neuromusculares. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 2008.

RIBEIRO, M.Z. Extração de glicose-6-fosfato desidrogenase em sistemas de duas fases aquosas. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 2001.

ROBERTSON, J.W.; RODRIGUES, C.G.; STANFORD, V.M.; RUBINSON, K.A.; KRASILNIKOV, O.V.; KASIANOWICZ, J.J. Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 8207-8211, 2007.

ROBINSON, B.V.; SULLIVAN, F.M.; BORZELLECA, J.F.; SCHWARTZ, S.L. PVP: A critical review of the kinetics and toxicology of polyvinylpyrrolidone (Povidine). Chelsea: Lewis Publishers, 1990.

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.; CHEVTCHENKO, S.F.; KRASILNIKOV, O.V. Mechanism of KCl Enhancement in Detection of Nonionic Polymers by Nanopore Sensors. **Biophysical Journal**, v.95, p. 5186-5192, 2008.

RODRIGUES, C.G.; MACHADO, D.C.; DA SILVA, A.M.B.; SILVA JÚNIOR, J.J.; KRASILNIKOV, O.V. Hofmeister effect in confined spaces: halogen ions and single molecule detection. **Biophysical Journal**, v. 100, p. 2929-2935, 2011.

ROTEM, D.; JAYASINGHE, L.; SALICHO, M.; BAYLEY, H. Protein detection by nanopores equipped with aptamers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, p. 2781-2787, 2012.

SARAIVA, S.A. Caracterização de matérias-primas e produtos derivados de origem graxa por espectrometria de massas. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 2008.

SHELANSKI, M. V.; MILLS, G.; LEVENDSON, T. Reaction Products of Polyvinylpyrrolidone Compounds and Polyisocyanates. US 1965/3216983 A, 3 p., 9 dezembro 1965.

SONG, L.; HOBAUGH, M.R.; SHUSTAK, C.; CHELEY, S.; BAYLEY, H.; GOUAUX, J.E. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. **Science**, v. 274, p. 1859-1866, 1996.

STANFORD, V.M.; KASIANOWICZ, J.J.; ROBERTSON, J.W.F.; RODRIGUES, C.G.; KRASILNIKOV, O.V. Single molecule mass or size spectrometry in solution using a solitary nanopore. US 2010/0122907 A1, 20 p., 20 maio 2010.

STODDART, D.; HERON, A.J.; KLINGELHOEFER, J.; MIKHAILOVA, E.; MAGLIA, G.; BAYLEY, H. Nucleobase recognition in ssDNA at the central constriction of the alpha-hemolysin pore. **Nano Letters**, v. 10, p. 3633-3637, 2010.

TAKAGISHI, T. & KUROKI, N. Interaction of polyvinylpyrrolidone with methyl orange and its homologs in aqueous solution: Thermodynamics of the binding equilibria and their temperature dependences. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 11, p. 1889-1901, 1973.

TRIMPIN, S.; EICHHORN, P.; RÄDER, H.J.; MÜLLEN, K.; KNEPPER, T.P. Recalcitrance of poly(vinylpyrrolidone): evidence through matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 938, p. 67-77, 2001.

WANG, D.; ZHAO, Q.; ZOYSA, R.S.S.; GUAN, X. Detection of nerve agent hydrolytes in an engineered nanopore. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.139, p. 440-446, 2009.

WARSINKE, A.; BENKERT, A.; SCHELLER, F.W. Electrochemical immunoassays. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 366, p. 622-634, 2000.

WEN, S.; ZENG, T.; LIU, L.; ZHAO, K.; ZHAO, Y.; LIU, X.; WU, H.C. Highly sensitive and selective DNA-based detection of mercury (II) with α -hemolysin nanopore. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, p. 18312-18317, 2011.

WILSON, G.S. & GIFFORD, R. Biosensors for real-time in vivo measurements. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p.2388-2403, 2005.

ZHAO, Q.; WANG, D.; JAYAWARDHANA, D.A.; GUAN, X. Stochastic sensing of biomolecules in a nanopore sensor array. **Nanotechnology**, v. 19, p.1-8, 2008.

ZHAO, Q.; JAYAWARDHANA, D.A.; WANG, D.; GUAN, X. Study of Peptide Transport through Engineered Protein Channels. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, p. 3572-3578, 2009.

APÊNDICES

Resumos de trabalhos publicados em Congressos

APÊNDICE A- ANÁLISE DA AMOSTRA DE POLIVINILPIRROLIDONA COM O SENSOR ESTOCÁSTICO FORMADO POR NANOPORO PROTÉICO UNITÁRIO

XXV Reunião Anual da FeSBE - FeSBE 2010

ResumoID: 1477-1

BARROS, S. M.; MACHADO, D. C.; MELO, M. C. A.; KRASILNIKOV, O. V.
 Depto. de Biofísica, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE

Palavras-chaves: ALFATOXINA, NANOPORO, MEMBRANAS, IOSENSOR, POLIVINILPIRROLIDONA

OBJETIVOS:

Os nanoporos protéicos unitários têm se mostrado ferramentas preferenciais para o desenvolvimento de biossensores (Trends. Biotech 27; 333, 2009). Nesta perspectiva, nanoporos formados pela alfa-hemolisina de *Staphylococcus aureus* projetados em bicamadas lipídicas planas têm sido largamente estudados, uma vez que, possuem como principais características a detecção estocástica e multianalito servindo como modelo no estudo do mecanismo de permeação e particionamento de polímeros naturais e também sintéticos solúveis em água (Nat. Biotech 26; 1146, 2008). Recentemente demonstramos a utilização do nanoporo como base de um espectrômetro de massa (Proc. Natl. Acad. Sci USA, 104; 8207, 2007). Neste trabalho, objetivamos analisar uma amostra do polímero polivinilpirrolidona (PVP) com o nanoporo protéico unitário. O PVP pertence a uma classe de polímeros solúveis em água e é uma molécula polar, pois, cada monômero contém um grupo amida e carbonila formando um dipolo. O PVP possui aplicações em diversas áreas, como indústria, farmacêutica e médica (Polym. Degrad. Stab 94; 2257, 2009).

MÉTODO E RESULTADOS:

A confecção da bicamada foi realizada pela técnica de Montal e Muller (Proc. Natl. Acad. Sci USA 69; 3561, 1972). Tanto a confecção da bicamada quanto a inserção do nanoporo unitário na membrana, e também a aquisição dos registros de correntes iônicas, foram realizadas em condições de fixação de voltagem, empregando um amplificador de Patch Clamp (Axon Patch 200B, Axon Instruments) como descrito recentemente (Biophys. J. 95; 5186, 2008). A solução banhante membrana era composta por 4M KCl, tamponado com 5mM Tris e pH 7.5 ajustado com ácido cítrico. Utilizamos como analito, o PVP com peso molecular médio de 10 kDa. Na ausência de qualquer molécula, a corrente iônica que flui pelo canal unitário permanece alta, entretanto na presença de PVP, identificamos diferentes níveis de bloqueios, indicando a polidispersidade da amostra utilizada neste trabalho. Analisando a constante de formação (Kf) do complexo PVP/nanoporo, observa-se que este parâmetro depende do potencial transmembrana, permitindo inferir que a PVP, apesar de ser um polímero neutro, adquire cargas elétricas em meio eletrolítico, analogamente ao polietilenoglicol. Todavia a dependência observada para o PVP é significativamente diferente daquela demonstrada para o PEG (Biophys. J. 95; 5186, 2008).

CONCLUSÃO:

O sensor estocástico do nanoporo formado pela alfa-hemolisina permitiu demonstrar a polidispersidade da amostra de Polivinilpirrolidona e também que este polímero neutro comportasse como molécula carregada em meios eletrolíticos.

Apoio Financeiro: CNPq, INCT-INAMI, FACEPE

APÊNDICE B - NANOPORO PROTÉICO EM ELEVADAS CONCENTRAÇÕES DE SAIS HALOGÊNIOS: A CONDUTÂNCIA

XXV Reunião Anual da FeSBE - FeSBE 2010

ResumoID: 1478-1

SILVA, J. J. J.; MACHADO, D. C.; BARROS, S. M.; KRASILNIKOV, O. V.; RODRIGUES, C. G.
 Depto. De Biofísica e Radiobiologia/Universidade Federal de Pernambuco, UFPE

Palavras-chaves: NANOPORO, MEMBRANAS, HOFMEISTER, ALFATOXINA, BIOSSENSOR

OBJETIVOS:

A aplicação de nanoporos no desenvolvimento de dispositivos analíticos é uma área em franca expansão em todo mundo (Proc. Natl. Acad. Sci USA, 104; 8207, 2007.; Nat. Nanotech, 4; 265, 2009). O canal iônico formado pela alfatoxina é o mais bem estudado e também considerado o melhor modelo de nanoporo protéico para o desenvolvimento de sensores estocásticos, uma vez que, apresenta: i) diâmetro compatível com diversos analitos; ii) elevada termoestabilidade; iii) baixa dependência de voltagem, e, iv) elevada condutância (Gen. Physiol. Biophys 8; 213, 1989). Recentemente demonstramos (Phys. Rev. Lett. 97; 018301, 2006) que o aumento na concentração de KCl (1 M para 4 M) na solução banhante do nanoporo formado pela alfatoxina, aumenta em 10 vezes a energia de interação do canal com o polietilenoglicol, proporcionando um aumento de aproximadamente 100 vezes na sensibilidade do sensor e isto se deve ao efeito salting-out (Biophys. J. 95; 5186, 2008). Uma vez que a condutância do canal é um parâmetro importante nas características funcionais do sensor, investigamos se a composição iônica da solução, especificamente, os ânions da série de Hofmeister, possa alterá-la.

MÉTODO E RESULTADOS:

Todos os experimentos foram realizados a temperatura ambiente, em condições de fixação de voltagem pela utilização de um amplificador de patch clamp (Axopatch 200B, Axon Instruments). Todos os sais foram de elevado grau de pureza (99,998%, Sigma-Aldrich) e o lipídeo sintético (Avanti polar lipids). Todas as membranas foram confeccionadas de acordo com alterações nas técnicas convencionais (Eur. Biophys. J. 34;997, 2005). As soluções banhantes da membrana foram (4 M, pH 7,5): KCl; KBr, KI ou KF. O protocolo consistiu em adicionar alfatoxina à solução banhante em concentração adequada, aplicar 40 mV e registrar a corrente resultante da incorporação espontânea de canais. A determinação do valor de condutância média do canal se processou pela confecção de histogramas, empregando o programa Origin 8.0 (OriginLab, Microcal). Para cada uma das soluções testadas, registrou-se no mínimo 150 canais em diferentes membranas. Os valores de condutância (nS): $3,606 \pm 0,05$ (n=185), $3,701 \pm 0,10$ (n=157), $3,732 \pm 0,02$ (n=175) e $2,558 \pm 0,01$ (n=166) para as soluções de KCl; KI, KBr e KF, respectivamente. Os valores da condutância foram proporcionais a condutividade aniônica das soluções. A capacidade de formação de canais também foi influenciada pelas soluções analisadas, obedecendo a seguinte ordem $KCl > KBr = KI > KF$. Estudos futuros poderão esclarecer a forte influência do Fluoreto na formação do poro.

CONCLUSÃO:

Os sais halogênicos alteram a condutância e capacidade de formação de canais da alfatoxina, influenciando na razão sinal/ruído e detecção estocástica do sensor.

Apoio Financeiro: CNPq, INCT-INAMI.

APÊNDICE C - STOCHASTIC SENSOR FORMED BY SINGLE PROTEIN NANOPORE IN CHARACTERIZATION OF POLYVINYLPYRROLIDONE

XXVI Reunião Anual da FeSBE - FeSBE 2011

ResumoID: 1387-1

BARROS, S. M. ; AGUIAR, J. P; MELO, M.C.A. ; RODRIGUES, C. G. ; KRASILNIKOV, O. V.
Depto. De Biofísica e Radiobiologia/Universidade Federal de Pernambuco, UFPE

Keywords: MALDI-TOF, POLYVINYLPYRROLIDONE, PROTEIN NANOPORE, STOCHASTIC SENSOR

OBJECTIVES:

Recent studies have demonstrated that single, nanometer scale pores, including the ion channels formed by *Staphylococcus aureus* α -hemolysin (α -HL), can be used to detect and quantify organic molecules (Biophys. J. 87:3162, 2007) nucleic acids, proteins, and polymers (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104:8207, 2007). Because these pores are small, their interaction with an analyte can alter the ionic current that would otherwise flow freely. Binding of analytes to nanopores is random and reversible, and it causes characteristic fluctuations in the ionic current. For this reason, single nanopores inserted in thin membranes have recently been referred to as stochastic sensors. Recently (Biophys. J. 95:5186, 2008) we had demonstrated that number and quantity of individual polymers in polydisperse polyethyleneglycol (PEG1500) sample is achievable with a single protein nanopore. The results are similar to conventional mass spectrometry. This study aims to apply the nanopore based method to other types of polymers, Polyvinylpyrrolidone (PVP) in particular. PVP was chosen because it wide applicability in pharmaceutical, cosmetic and food industries (J. Chromatogr. A. 938:67, 2001).

METHODS AND RESULTS:

Planar lipid bilayers were prepared according to conventional techniques (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69:3561, 1972). The experiments were performed at 24 ± 2 °C. Transmembrane voltage was kept at 40 mV. Solution used was 4M KCl, buffered with Tris (5 mM) at pH 7.5. Polydisperse PVP (Sigma) was used as an analyte. Preliminary results demonstrate that α -HL pore is able to detect the molecular dispersity of PVP. The results obtained with nanopore sensor was found similar to data obtained with conventional (MALDI-TOF) analysis (mass spectrometer Autoflex III; Bruker Daltonics).

CONCLUSIONS:

α -HL nanopore based sensor could be used as molecular mass spectrometer not so for PEG samples but for PVP too. The result permits suggestion nanopore based sensor for molecular mass measurement and/or monitoring different polymer molecules in aqueous solutions that may be important for industrial, pharmaceutical and medical area.

Financial Support: CNPq, CAPES, INAMI and UFPE.

APÊNDICE D - SOLUBILITY OF POLYETHYLENE GLYCOL AND POLYVINYLPIRROLIDONE IN SOLUTIONS OF ALKALI CHLORIDES

XVI Reunião Anual da FeSBE - FeSBE 2011

ResumoID: 1386-1

MELO, M. C. A. ; Silva, J.J. ; BARROS, S. M. ; KRASILNIKOV, O. V.
Biofísica e Radiobiologia/Universidade Federal de Pernambuco, UFPE

Keywords: ALKALI CHLORIDES, POLYETHYLENE GLYCOL, POLYVINYLPIRROLIDONE, SOLUBILITY

OBJECTIVES:

Ions of the Hofmeister series of can be classified as chaotropic or kosmotropic according to their influence on water structure. The specific ion effect is observed in various biological and chemical systems (Biophys Chem, 119:271-281, 2006). Studies have shown that the increase in KCl concentration qualitatively improved the ability stochastic sensor (constructed by unitary protein nanopore inserted in planar lipid bilayer (Biophys J. 95:5186-5192, 2008) to identify molecules of analyte and augmented its sensitivity. "Salting out" phenomenon (decreasing in solubility of analytes) appeared to be responsible for those effects. As a result, the goal of the present study was to investigate the influence of alkali chlorides on solubility of Polyvinylpyrrolidone (PVP) and Polyethylene glycol (PEG) in order to predict ion effects on characteristics of the sensor.

METHODS AND RESULTS:

The solubility was estimated by the method described Sahandzhieva (J. Chem. Eng. Data 51:1516-1525, 2006), with modifications. Small quantities of PVP and PEG were weighed and added in glass tubes and then small volumes of 4M KCl, NaCl, CsCl or RbCl solutions were added at room temperature. After each addition the tube was closed with Teflon lid, agitated, heated to 100° C and "cloud" of polymers was observed. Each experiment was performed in triplicate. It was found that solubility either polymer decreased with alkali chlorides concentration. The solubility of PVP was established significantly dependent on cations type. All tested cations ranked as follows in order of decreasing PVP solubility: NaCl>RbCl>CsCl>KCl. The difference could reach 15-folds. At the contrary, the solubility of PEG was not dependent on type of the alkali ions: the differences were below 15%.

CONCLUSIONS:

The increase in alkali chloride concentration leads to decrease in solubility of both polymers – "salting out". Such effect permits prediction that increase in concentration of the salts could result in increase in sensitivity of stochastic sensors. A specific interaction between alkali cations and analytes (polymers in our case) will determine the degree of cations influence on "salting out" and parameters of the sensor. In other words: the sensitivity of the sensor to an analyte appears to be higher in solution where analyte is less soluble.

Financial Support: CNPq, INAMI and UFPE