República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) MU 9102088-3 U2

(22) Data do Depósito: 25/08/2011

(43) Data da Publicação: 26/04/2016

(RPI 2364)

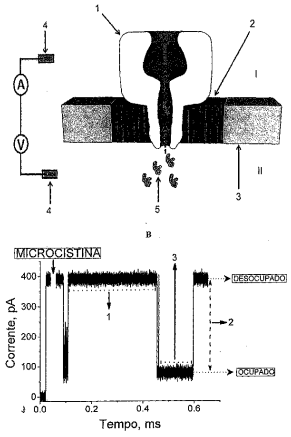
(54) Título: UTILIZAÇÃO DE UM NANOPORO PROTÉICO PARA DETECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E MONITORAMENTO EM TEMPO REAL DE MICROCISTINAS EM SISTEMAS AQUOSOS

(51) Int. Cl.: G01N 27/26; G01N 33/18; G01N 33/48

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

(72) Inventor(es): CLÁUDIO GABRIEL RODRIGUES, SERGIO FERNADOVITCH CHEVTCHENKO, OLEG VLADIMIROVICH KRASILNIKOV, DIJANAH COTA MACHADO, JULIANA PEREIRA DE AGUIAR, JANILSON JOSÉ DA SILVA JUNIOR

(57) Resumo: UTILIZAÇÃO DE UM NANOPORO PROTÉICO PARA DETECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E MONITORAMENTO EM TEMPO REAL DE MICROCISTINAS EM SISTEMAS AQUOSOS. De acordo com o presente modelo de utilidade existem diversos processos para detecção de microcistinas, limitados na capacidade de identificação adequada e monitoramento em tempo real de variantes estruturais destas toxinas. No presente processo inventiva e o dispositivo inventiva pode-se realizar a detecção, identificação, quantificação e monitoramento em tempo real de microcistinas em meios aquosos. O processo inventiva é baseado no fato de que a entrada e interação de microcistinas no lume aquoso de um nanoporo protéico formado pela alfatoxina incorporada em um suporte resistivo, provoca eventos discretizados na corrente iônica que flui através do nanoporo. A série temporal destes eventos é representativa e correlacionada com a variante estrutural da microcistina presente na solução contida em um dos reservatórios condutores. A análise estatística segmenta! da série temporal combinando o método dos mínimos quadrados e a(...)



"UTILIZAÇÃO DE UM NANOPORO PROTÉICO PARA DETECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E MONITORAMENTO EM TEMPO REAL DE MICROCISTINAS EM SISTEMAS AQUOSOS".

O presente Modelo de utilidade refere-se a um processo baseado na utilização de um nanoporo protéico para detecção, identificação, quantificação e monitoramento em tempo real de toxinas de baixo peso molecular, especificamente, as microcistinas em meios aquosos, bem como a um dispositivo para realização do processo.

Sabe-se que dois principais processos são atualmente empregados para detecção e identificação de microcistinas e outras cianotoxinas em meios aquosos, baseado principalmente em ensaios biológicos, bioquímicos e em suas propriedades físico-químicas. Estes processos diferem em seus princípios de detecção, identificação, complexidade de execução e custos operacionais. Dentre os processos bioquímicos normalmente realiza-se o ensaio imunoenzimático (ELIZA) e o ensaio de inibição da proteína fosfatase. O ELISA apesar de apresentar sensibilidade adequada, seu principal empecilho de ordem técnica, consiste nas reações cruzadas que podem levar a subestimação da concentração das cianotoxinas analisadas. Outrossim, o ensaio de inibição da proteína fosfatase é bastante sensível, porém, requer proteínas altamente purificadas de difícil disponibilização no mercado e ainda necessitam da utilização de fosfato radioativo, o que onera consideravelmente sua operacionalização, uma vez que exige o cumprimento das normas de segurança para manipulação de material radioativo. Os processos físico-químicos por sua vez são analíticos, e consideram as propriedades físico-quimicas das microcistinas, tais como, a presença de grupos cromóforos sensíveis à radiação ultravioleta (UV) presentes na estrutura molecular destas cianotoxinas, cuja reatividade deve-se a grupos funcionais específicos e também em sua estrutura ou peso molecular. Dentre os processos físico-químicos utilizam-se: cromatografia líquida de alta performance (HPLC), eletroforese capilar (EC), ressonância magnética nuclear (NMR) e a espectroscopia de massa (MS). A principal desvantagem da HPLC consiste na impossibilidade de identificação de variantes estruturais presentes em amostras de microcistinas, além da ausência de padrões específicos que podem inviabilizar sua ampla utilização, uma vez que, a identificação da amostra se dá pelo tempo de retenção. A EC apresenta baixa sensibilidade e também se faz necessário o pré-processamento da amostra no sentido de produzir produtos fluorescentes capazes de serem sensibilizados por um laser de comprimento de onda específico. Por outro lado a espectroscopia de massa e a ressonância magnética nuclear apesar de serem métodos eficientes para a determinação da estrutura molecular são bastante onerosas; e enquanto que o primeiro é destrutivo (impossibilitando o reaproveitamento da amostra analisada, para realização de contraprovas), no segundo é indispensável uma quantidade razoável (normalmente miligramas) de material de elevado grau de pureza.

Todos estes processos físico-químicos requerem pessoal altamente especializado e são muito onerosos para serem empregados de forma rotineira e em grande escala.

Adicionalmente todos os processos supracitados não permitem o monitoramento em tempo real de microcistinas, uma vez que, se faz necessário a coleta da amostra, na maioria das vezes, seu pré-processamento e finalmente a análise propriamente dita.

Nesta invenção utilizasse os conhecimentos da biomimética e se desenvolveu um processo para detecção, identificação, quantificação e monitoramento em tempo real de microcistinas em meio aquoso. O elemento de reconhecimento molecular é uma a nanoestrutura, o nanoporo protéico formado pela alfatoxina nativa, depositada e referenciada no Protein Data Bank sob código - PDB ID 7AHL.

Sabe-se, por exemplo, da patente US2010122907-A1 da utilização do nanoporo da alfatoxina para determinação da massa molecular de polímeros neutros, especificamente o polietilenoglicol, porém, desconhecesse o uso deste nanoporo como elemento de detecção, identificação, quantificação e monitoramento de variantes estruturais de microcistinas.

O nanoporo protéico da alfatoxina (aHL) é uma nanoestrutura formada por sete subunidades monoméricas, que se auto-inserem em uma bicamada lipídica, criando uma via aquosa para a passagem de diferentes partículas, desde, que apresentem diâmetro menor que a região mais estreita do nanoporo. A estrutura cristalina tridimensional e a estequiometria deste nanoporo são conhecidas. A geometria do poro aquoso e seu posicionamento assimétrico em relação ao plano da membrana lipídica, também já foram elucidados em condições dinâmicas empregando substâncias não eletrolíticas. Existem duas regiões do poro, uma com diâmetro de 4,6 nm que fica praticamente fora da membrana, e outra, que fica totalmente inserido na membrana e tem diâmetro de ~2 nm, sendo composto por 14 folhas β-barril. Estes dois domínios estão separados por uma constrição de ~1,4 nm de diâmetro. Adicionalmente o nanoporo formado pela alfatoxina apresenta elevada estabilidade e condutância iônica, facilidade de incorporação em membranas naturais e bicamadas lipídicas planas sintéticas.

Na figura 1, (A), esta representado um esquema do nanoporo protéico (1) inserido na membrana lipídica (2) construída em uma barreira resistiva (3) que separa dois reservatórios condutivos (I e II), e, na (B), o registro da corrente iônica captada por um dos eletrodos (4). O mecanismo de detecção de microcistinas (5) pelo nanoporo da alfatoxina se dá pela alteração transitória discretizada, denominada de agora em diante de evento de bloqueio (figura 1B), na corrente iônica que flui através do lume aquoso do nanoporo, quando da permeação de uma molécula de microcistina por uma das entradas do nanoporo. Na figura 1 B é demonstrado o tempo interbloqueio (1), que corresponde ao nanoporo DESOCUPADO, e, o evento de bloqueio que é caracterizado por amplitude (2) e tempo de duração (3). A amplitude depende do volume relativo ocupado pela microcistina quando presente no nanoporo, e, corresponde a diminuição na condutância do nanoporo, comparativamente a situação em que a microcistina não o ocupa; enquanto que o tempo de duração do evento corresponde ao tempo de residência de uma molécula de microcistina no lume aquoso, ou seja, o tempo em que o nanoporo fica OCUPADO.

A figura 2 representa que a série temporal dos eventos de bloqueios juntamente com os tempos interbloqueios correlacionasse com a variante estrutural da microcistina, portanto, é uma espécie de sua "IMPRESSÃO DIGITAL" (A), e que a análise da série temporal dos eventos de bloqueio relativos a cada valor médio de condutância, é operacionalizada traçando-se um histograma de todos os tempos, gerando uma distribuição de tempos característicos de cada variante da microcistina (B). Igualmente a frequência dos eventos de bloqueio, ou seja, o intervalo de tempo interbloqueios depende da concentração das variantes estruturais da microcistina presente na solução contida no reservatório de onde ela advém.

Na figura 3 representa-se de forma esquemática o diagrama modular do método de análise, e, a diferença entre os valores médios da condutância do nanoporo na ausência e na presença das variantes da microcistina no lume aquoso do nanoporo, de agora em diante denominada, condutância residual, que permite, através de um gráfico bidimensional, a identificação em tempo real das variantes estruturais de microcistinas.

Na figura 4 representasse a análise dos tempos interbloqueios, que representam a ausência de microcistina no interior do nanoporo, denominado de agora em diante, tempo característico de não-ocupação, representado por τ_{on}. A forma inversa, $1/\tau_{on}$, denominado de agora em diante como taxa de transição, é proporcional a concentração da microcistina, o que permite determinar a concentração de microcistina na solução.

A figura 5 ilustra a montagem mecânica do aparato, ou seja, a câmara experimental (1) empregada para realização do processo. Os dois reservatórios (I) e (II) onde se colocam soluções iônicas, são separados por uma barreira resistiva (2) composta por uma película não condutora que apresenta em sua região central, um pequeno orifício circular de 50μM de diâmetro. Neste orifício usando lipídeo sintético, constrói-se uma bicamada lipídica (3). Cada um dos reservatórios contendo solução eletrolítica é acoplado eletricamente ao amplificador de alta impedância configurado como conversor corrente-voltagem (não representado na figura), através de eletrodo prata-cloreto de prata (Ag-AgCl) (4) mantidos em pontes salinas do tipo agarose 2% em cloreto de potássio 3M, acomodado em ponteiras plásticas com volume de 200 μL, não esquematizada na figura. A corrente que flui através do nanoporo é condicionada por meio de filtro passa-baixa do tipo Butterworth, posteriormente digitalizada por um sistema de registro (5) formado por uma placa conversora analógico-digital, e finalmente armazenada diretamente na memória de um microcomp
representado na figura).

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para detecção de toxinas de baixo peso molecular, especificamente microcistinas em meio aquoso, caracterizado pelo fato de que a interação de moléculas de microcistinas através do lume aquoso do nanoporo protéico formado pela alfatoxina nativa, gera alterações discretizadas típicas no fluxo da corrente iônica que o permeia e, que estas alterações são dependentes desta classe de toxinas.

2. Processo para identificação de variantes estruturais de microcistinas em meio aquoso, caracterizado pelo fato de que a interação de cada variante estrutural da microcistina através do lume aquoso do nanoporo protéico formado pela alfatoxina nativa, provoca alterações discretizadas específicas no fluxo de corrente iônica que o permeia, e, que estas alterações são dependentes das propriedades estruturais de cada variante da microcistina.

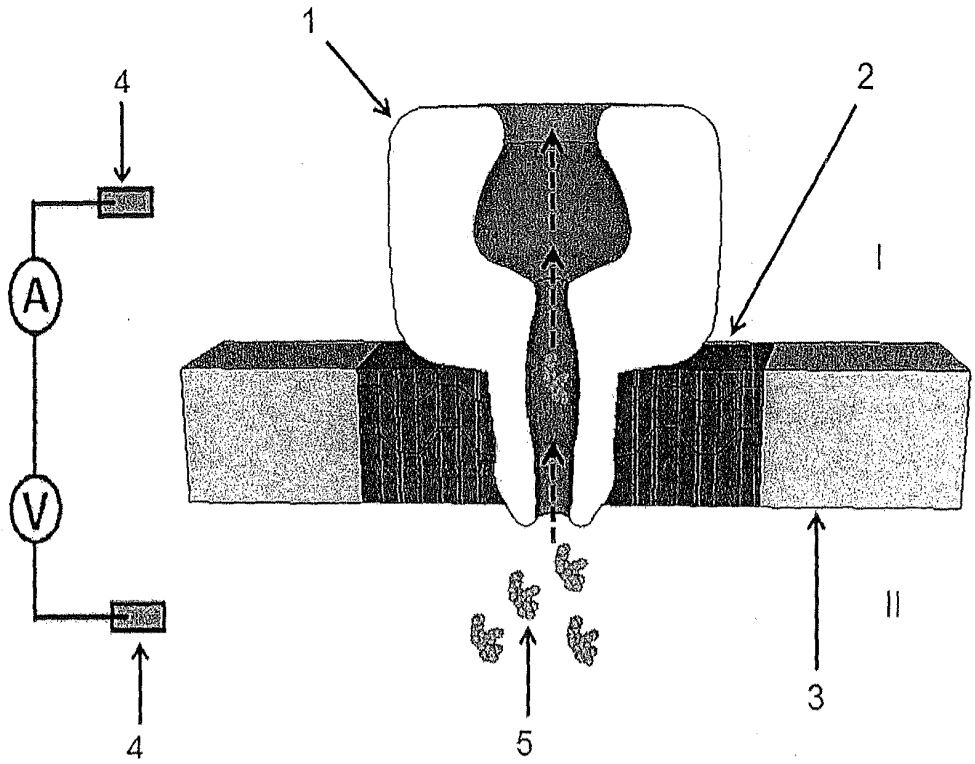
3. Processo para quantificação de microcistinas em meio aquoso, caracterizado pelo fato de que a interação de cada variante estrutural da microcistina através do lume aquoso do nanoporo protéico formado pela alfatoxina nativa, provoca alterações discretizadas específicas no fluxo de corrente iônica que o permeia, e, que a distribuição dos intervalos de tempo entre os eventos sucessivos de bloqueio de corrente iônica provocados por interação de cada variante estrutural da microcistina com o lume aquoso do nanoporo protéico, são dependentes da concentração ou quantidade destas moléculas no reservatório de onde elas advêm.

4. Processo para o monitoramento em tempo real de microcistinas em meio aquoso, caracterizado pelo fato de que a interação de cada variante estrutural da microcistina através do lume aquoso do nanoporo protéico formado pela alfatoxina nativa, provoca alterações discretizadas específicas para cada microcistina e que sua comparação com um banco de dados permite a identificação instantânea de cada molécula de microcistina que interagir com o nanoporo.

5. Dispositivo de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4 caracterizado por uma câmara experimental composta por material isolante e inerte, dividida em dois reservatórios condutores separados por uma barreira resistiva, no qual há uma única via de condução elétrica.

FIGURA 1

A


1
2
4
A
V
I
II
3
4
5

B

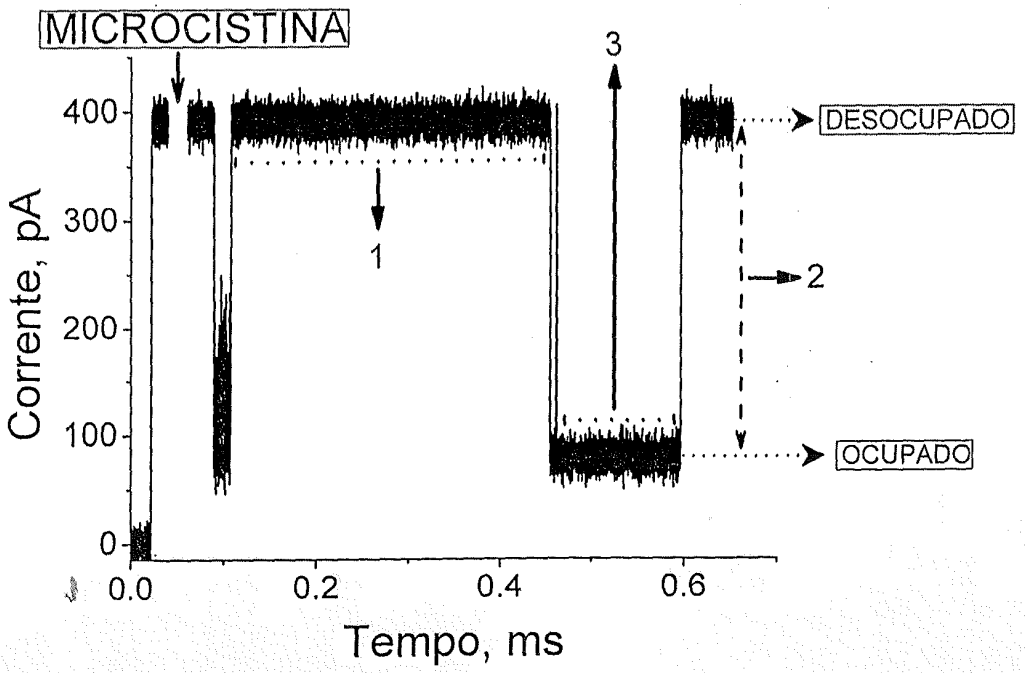

MICROCISTINA
3
400
300
200
100
0
Corrente, pA
1
2
DESOCUPADO
OCUPADO
0.0
0.2
0.4
0.6
Tempo, ms

FIGURA 2

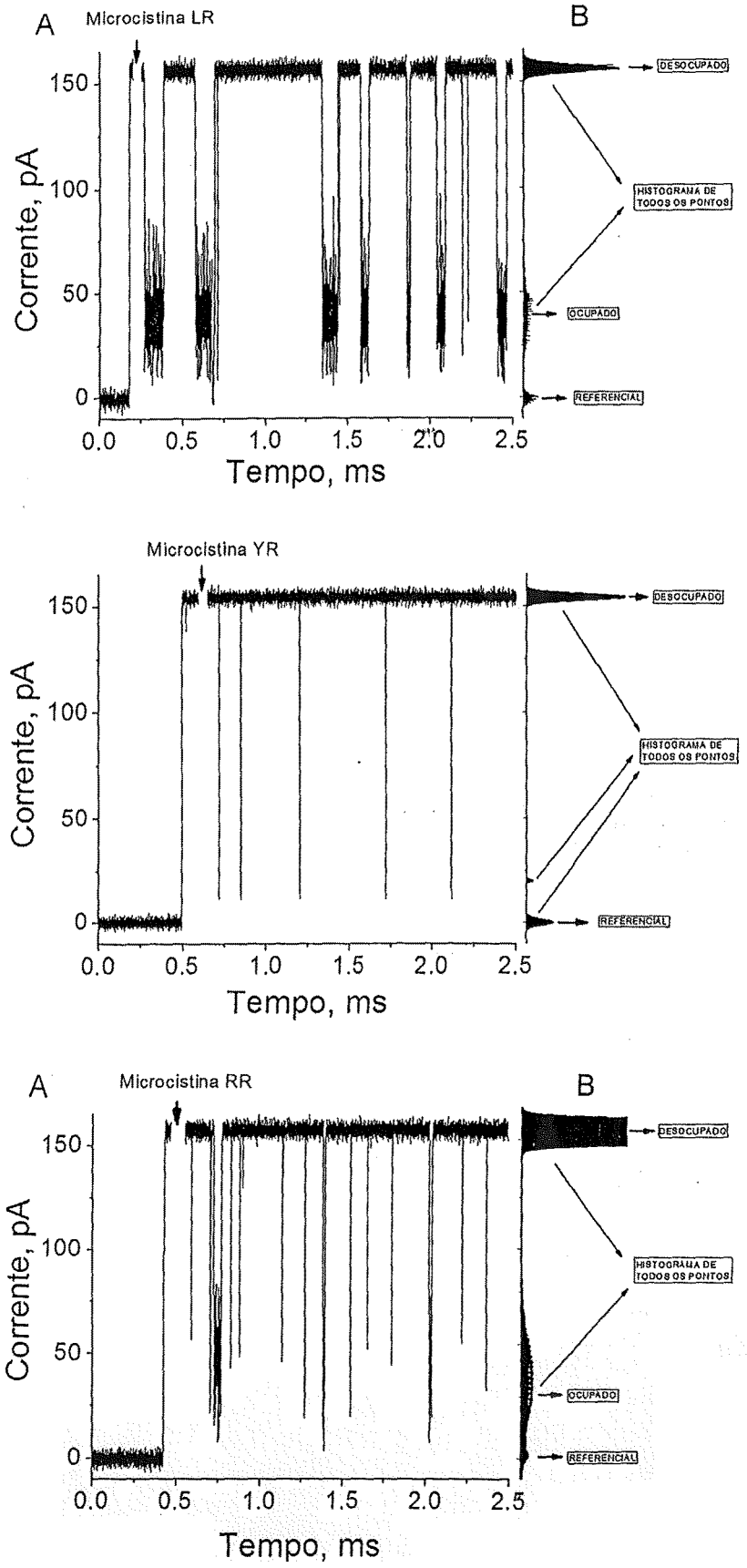

A
Microcistina LR
B
DESOCUPADO
HISTOGRAMA DE TODOS OS PONTOS
OCUPADO
REFERENCIAL
Corrente, pA
150
100
50
0
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
Tempo, ms
Microcistina YR
DESOCUPADO
HISTOGRAMA DE TODOS OS PONTOS
REFERENCIAL
Corrente, pA
Tempo, ms
A
Microcistina RR
B
DESOCUPADO
HISTOGRAMA DE TODOS OS PONTOS
OCUPADO
REFERENCIAL
Corrente, pA
Tempo, ms

FIGURA 3.

A

MÓDULO DE AQUISIÇÃO DOS REGISTROS DE CORRENTE IÔNICA ATRAVÉS DO NANOPORO.
(Os dados são digitalizados e gravados em arquivo de formato proprietário)

↓

MÓDULO DE APRESENTAÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DA SÉRIE TEMPORAL DE EVENTOS DE BLOQUEIO
(Os dados são processados por algoritmo baseado no método dos mínimos quadrados juntamente com algoritmo genético para decodificação do número de Gaussianas)

↓

MÓDULO DE IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES DE MICROCISTINAS
(A distribuição bidimensional de tempo dos eventos de bloqueio e a condutância residual, agrupamentos em "ilhas" correlacionadas a cada variante da microcistina)

↓

MÓDULO DE CONSULTA AO BANCO DE DADOS E IDENTIFICAÇÃO AUTOMÁTICA DAS VARIANTES DE MICROCISTINA
(O padrão de agrupamento das "ilhas" é comparado junto ao banco de dados formado por agrupamentos de variantes de microcistina previamente armazenados)

B

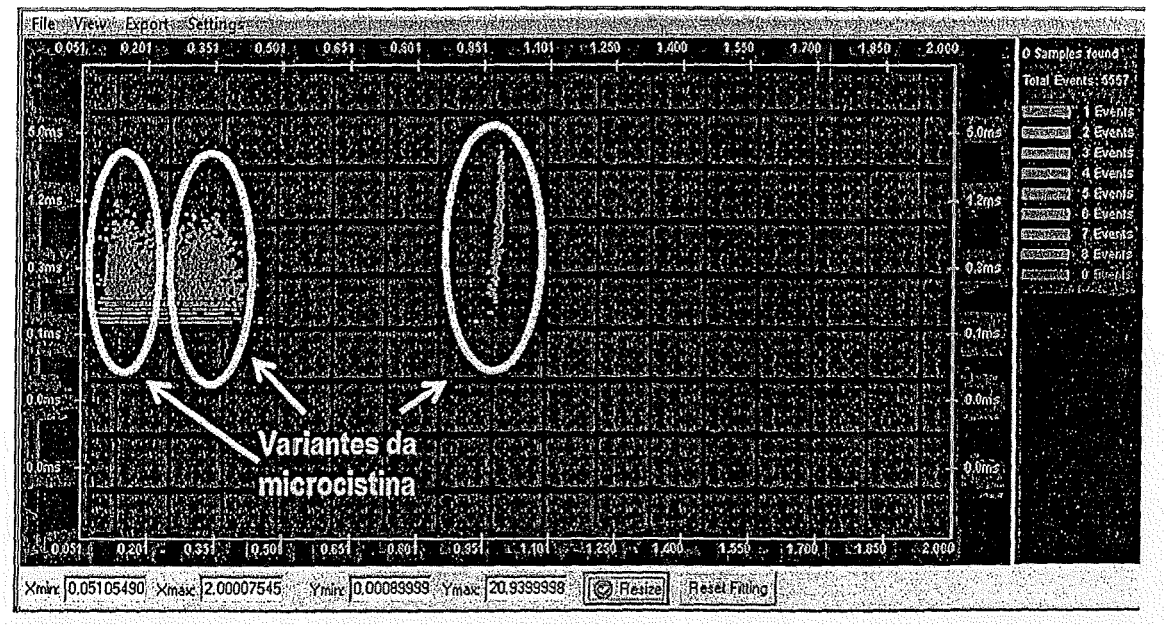


FIGURA 4.

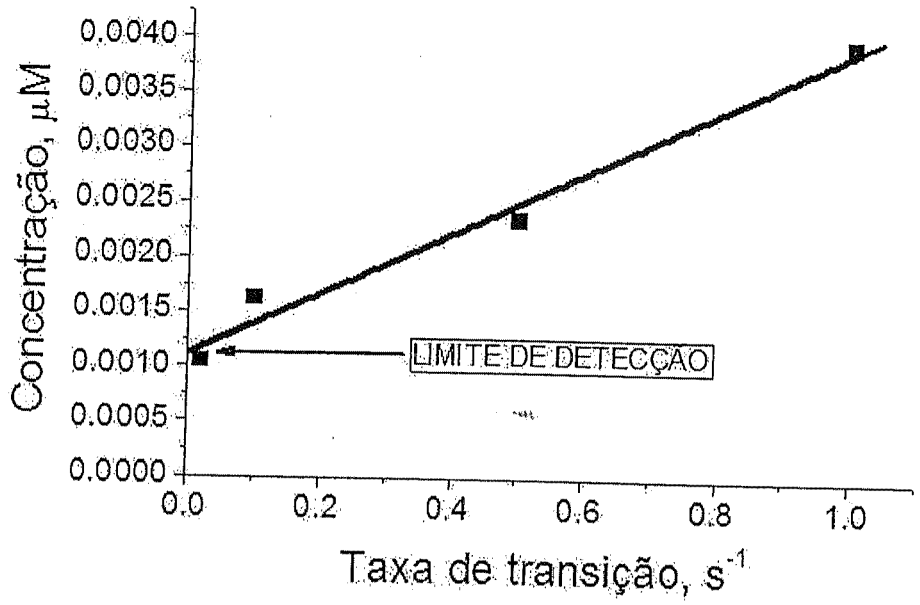
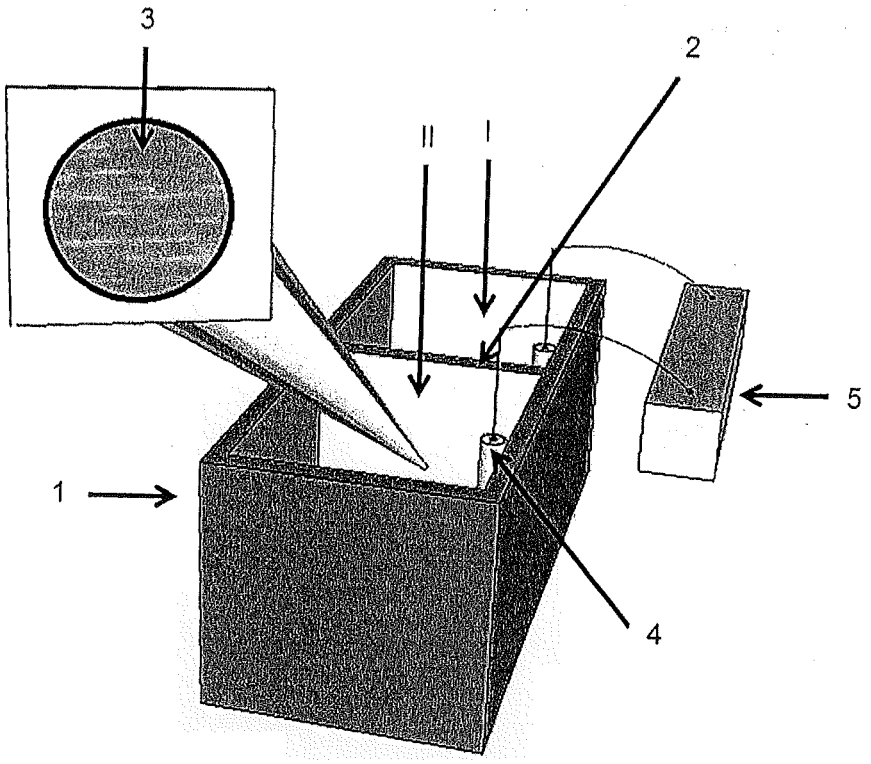


FIGURA 5.



Patente de Modelo de Utilidade "UTILIZAÇÃO DE UM NANOPORO PROTÉICO PARA DETECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E MONITORAMENTO EM TEMPO REAL DE MICROCISTINAS EM SISTEMAS AQUOSOS".

De acordo com o presente modelo de utilidade existem diversos processos para detecção de microcistinas, limitados na capacidade de identificação adequada e monitoramento em tempo real de variantes estruturais destas toxinas. No presente processo inventivo e o dispositivo inventivo pode-se realizar a detecção, identificação, quantificação e monitoramento em tempo real de microcistinas em meios aquosos. O processo inventivo é baseado no fato de que a entrada e interação de microcistinas no lume aquoso de um nanoporo protéico formado pela alfatoxina incorporada em um suporte resistivo, provoca eventos discretizados na corrente iônica que flui através do nanoporo. A série temporal destes eventos é representativa e correlacionada com a variante estrutural da microcistina presente na solução contida em um dos reservatórios condutores. A análise estatística segmental da série temporal combinando o método dos mínimos quadrados e algoritmo de otimização genética, permite discriminar em tempo real as variantes de microcistinas. O dispositivo inventivo consiste basicamente em um nanoporo incorporado em uma bicamada lipídica que separa dois reservatórios condutores, onde em um deles se coloca as microcistinas.