



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

**(11) PI 0602995-7 B1**

**(22) Data do Depósito:** 24/07/2006

**(45) Data de Concessão:** 25/04/2017



---

**(54) Título:** DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO DE PROTEÍNAS A PARTIR DO USO DE DIAGRAMAS DE RELAXAÇÃO DIELÉTRICA

**(51) Int.Cl.:** G01N 33/487; G01N 27/02

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

**(72) Inventor(es):** CÉSAR AUGUSTO SOUZA DE ANDRADE; HELINANDO PEQUENO DE OLIVEIRA; MARIA DANIELLY LIMA DE OLIVEIRA; CELSO PINTO DE MELO

**“DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO DE PROTEÍNAS A PARTIR DO USO DE DIAGRAMAS DE RELAXAÇÃO DIELÉTRICA.”**

A presente patente de modelo tem por objetivo estabelecer a utilização da espectroscopia de impedância como método simples para a  
5 determinação direta e mais precisa do ponto isoelétrico (PI) de proteínas.

Por desempenharem papel crucial nos diferentes processos e metabolismos dos organismos vivos, as proteínas são macromoléculas essenciais para o funcionamento dos sistemas biológicos (Stryer, 1995). Elas podem atuar como catalisadores e - como outros exemplos importantes  
10 - desempenham papel vital no transporte e armazenamento de outras moléculas (tal como o oxigênio), fornecem proteção e suporte mecânico a plantas e animais, são responsáveis pela transmissão de impulsos nervosos e pelo movimento, estão associadas à proteção imunológica, e controlam os processos de crescimento e de diferenciação celular (Stryer, 1995). O  
15 correto funcionamento das proteínas depende da maneira como sua conformação muda da estrutura nativa (isto é, aquela adotada quando se encontra isolada e em meio fisiológico) para outra, quando de sua associação com outras moléculas. Essa modificação se dá por efeito da ação de forças eletrostáticas, que têm ainda um papel importante na  
20 determinação da conformação e da estrutura de polímeros e polieletrólitos.

O reconhecimento molecular e a especificidade das interações entre moléculas são características essenciais da vida: macromoléculas biológicas são capazes do reconhecimento de outra macromolécula ou de membranas ou substratos, de modo a formar associações específicas (Baszkin e Norde, 5 2000). As forças intermoleculares são de natureza eletrostática, particularmente devido à ação de interações Coulombianas, para as quais é determinante a natureza da atmosfera iônica em torno das macromoléculas e substratos. Na associação e interação entre moléculas, o reconhecimento eventual mútuo do hóspede e hospedeiro e a estabilidade da ligação 10 resultante dependem das modificações na energia livre total do sistema que resultam do contato e posterior ligação entre as moléculas interagentes. Tais mudanças podem ser sensíveis à contribuição da dupla camada elétrica (a camada difusa que pode ser visualizada como uma "atmosfera" de cargas que rodeia um colóide) e, para o entendimento desta associação, se torna 15 necessária a avaliação das interações eletrostáticas entre um alvo-hospedeiro (tal como uma superfície celular ou uma resina de troca iônica) e um hóspede (proteína) como função da força iônica, distância da separação, orientação, e estrutura dos materiais envolvidos (Petty, 1996; Hiemenz e Rajagopalan, 1997; Baszkin e Norde, 2000). O ponto isoelétrico

(PI) de uma proteína em solução é definido como o valor do pH específico para o qual sua carga líquida efetiva é nula.

O objetivo desta patente é propor uma nova técnica, baseada na espectroscopia de impedância, para a determinação do PI de proteínas.

5 Neste Relatório Descritivo, a técnica proposta será utilizada para a caracterização elétrica de três moléculas protéicas, a saber: i) lectina de *Triticum vulgare* (WGA), ii) lectina *Concanavalina A* (Con A) e iii) Soroalbumina bovina (BSA).

i) Lectinas são proteínas que possuem ao menos um  
10 domínio não-catalítico que se liga reversivelmente e especificamente a um mono ou oligossacarídeo (Peumans e van Damme, 1995). A WGA (das iniciais em inglês para aglutinina de germen de trigo) é uma lectina isolada do embrião de *Triticum vulgare* (Graminaceae), uma planta monocotiledônea. A WGA é  
15 uma proteína dimérica, possuindo massa molecular de 17 kDa para cada subunidade, que apresenta ponto isoelétrico em torno do pH 9. Essa lectina apresenta alta afinidade para N-acetil-D-glicosamina e ácido N-acetil-D-neuramínico e pertence à família das proteínas que se ligam à quitina, e que são caracterizadas por um elevado  
20 conteúdo de cisteína e glicina (Nagata e Burger, 1974; Rice e

Etzler, 1975; Wright, 1992). WGA pode se ligar a oligossacarídeos, quitobiase ou N-acetil-D-glicosamina terminal, estruturas comuns em um grande número de glicoproteínas de membrana e soro. Peptídeoglicanos da parede das células bacterianas, quitina e glicosaminoglicanos de cartilagem também podem se ligar a WGA.

ii) A Con A é uma molécula polimérica cujo grau de associação é dependente de um certo número de variáveis, das quais a mais importante é o valor do pH do meio. Para a faixa de pH entre 2 e 5,5, verificamos que a Con A existe como um dímero composto de duas subunidades e tem um peso molecular de aproximadamente 55 KDa (Abe *et al.*, 1971; McCubbin e Kay, 1971), enquanto que para valores de pH maiores que 5,5, uma estrutura tetramérica com peso molecular de 111 KDa é predominante (Wang *et al.*, 1971; McKenzie *et al.*, 1972). Os padrões apresentados na focalização isoeétrica (técnica usual de determinação do PI de proteínas - ver adiante) de amostras da proteína Con A (metalizadas e não-metalizadas) com subunidades intactas e fragmentadas apresentam diferentes bandas. O mesmo é observado nos casos em que esta lectina contém metais, mas suas cadeias de polipeptídios permanecem intactas, situação em que o PI se torna 8,35. No

entanto, preparações metalizadas de Con A consistindo de cadeias fragmentadas apresentam três bandas com valores de PI 8,0, 7,8 e 7,7. Neste trabalho utilizamos a lectina Con A não-metalizada que possui PI em pH 6,5 (Bhattacharyya e Brewer, 1990).

5           iii) Por sua vez, a soro albumina, uma das proteínas mais extensivamente estudadas, é uma abundante proteína plasmática com concentração típica de 5g/100mL. A soro albumina bovina (BSA), presente no plasma sanguíneo bovino, quando na forma de monômero apresenta peso molecular de 65 KDa e ponto isoelétrico  
10 igual a 4,9. A BSA possui duas importantes funções que incluem a manutenção da pressão osmótica e deposição e o transporte de uma série de compostos endógenos e exógenos (Folco *et al.*, 1977; Fehske *et al.*, 1981; Fitzpatrick *et al.*, 1982).

Atualmente, por sua maior confiabilidade e acurácia, a focalização  
15 isoelétrica é a técnica mais amplamente utilizada para a determinação do PI de proteínas. Na focalização isoelétrica capilar, substâncias anfóteras são separadas com base em seus pontos isoelétricos (que podem ser entendidos também como os valores de pH para os quais o número de moléculas que migra para o ânodo iguala o número de moléculas que migra para o  
20 cátodo). Esta técnica é baseada na formação de um gradiente de pH, obtido

pelo uso de substâncias conhecidas como anfólitos (que são geralmente ácidos poliméricos sintéticos, como, por exemplo, poliaminoácidos, ácidos policarboxílicos ou ácidos polissulfônicos), em um meio conectado ao mesmo tempo a um cátodo onde existe uma solução com pH alto (tipicamente hidróxido de sódio) e a um ânodo com pH baixo (tipicamente ácido fosfórico). A aplicação de um campo elétrico a uma mistura de anfólitos gera a formação de um gradiente de pH no meio, e proteínas, que são moléculas anfóteras, irão se comportar de maneira idêntica e serão, portanto, focalizadas em uma dada posição citada pelo seu PI. Neste tipo de separação se torna ainda necessário um passo adicional, uma vez que os diferentes solutos não podem ser detectados *in situ*: quando, ao se movimentar dentro do capilar, cada um deles para de se mover ao atingir a posição em que o valor do pH do meio corresponde a seu PI, e assim, portanto, não chega a atingir a cela do detector. Dessa maneira, a coleta e a identificação dos solutos requerem uma etapa adicional que pode ser implementada de diferentes maneiras:

- Após a focalização, as zonas de distinta natureza criadas no capilar podem ser movidas em direção ao detector, por meio da aplicação de pressão (isso pode ser conseguido, por exemplo, elevando-se uma das extremidades do capilar).

- Alternativamente, pode ser explorado o fato de que após a focalização a corrente do sistema costuma ser pequena (pois somente íons  $\text{OH}^-$  e  $\text{H}^+$  contribuem para a condutividade): quando um sal como o cloreto de sódio é adicionado ao anólito (reservatório ácido) ou ao católito, os íons cloreto irão predominar e assim ocorrerá um aumento na condutividade. Pelo princípio da eletroneutralidade, íons sódio podem ser trocados por prótons no tubo, gerando um gradiente desbalanceado. Isso causa a migração dos íons em direção ao detector.

10 No geral, no entanto, o elevado número de etapas torna não apenas onerosa e complicada a técnica da focalização isoeletrica, mas também contribui para, conseqüentemente, aumentar as probabilidades de erro nos resultados.

Além de demoradas e onerosas, as atuais técnicas disponíveis para a  
15 determinação do PI de proteínas envolvem o uso de reagentes provenientes principalmente do exterior e a manipulação de alguns produtos químicos danosos à saúde. Mais ainda, os ensaios são destrutivos no sentido em que envolvem a perda após o uso da amostra utilizada, o que se torna um grande problema para pesquisadores em várias áreas de fronteira (como  
20 proteômica) em que as amostras de interesse não estão disponíveis

comercialmente, e sim são obtidas em quantidades extremamente limitadas.

Em adição a custos operacionais, são também fatores relevantes de consideração na escolha do procedimento a ser adotado tanto o tempo necessário para que a informação seja obtida, quanto a necessidade de que os métodos a serem empregados não venham a deixar resíduo ou levem à contaminação das amostras de interesse.

Em contraposição aos problemas enfrentados quando da aplicação das técnicas usuais de determinação do PI de proteínas, o método alternativo que aqui propomos é relativamente simples e de baixo custo, podendo sua aplicação ocorrer com alta eficiência, em qualquer escala de operação que se faça necessária.

A técnica proposta consiste no levantamento do espectro de impedância de uma solução, em que uma quantidade conhecida da proteína a ser analisada é dissolvida em um volume determinado de um solvente padrão. As amostras são colocadas em um béquer, onde posteriormente são introduzidas duas lâminas de aço inoxidável que devem ser mantidas paralelas entre si a uma distância constante, como mostra a Fig. 1. Entre essas lâminas é feita a aplicação (sem polarização externa) de um potencial que oscila no tempo de forma senoidal com uma frequência que varia de maneira controlada na faixa de 1Hz a 1MHz. A partir do levantamento da

variação das partes real e imaginária da impedância como função da frequência (Daniel, 1967; Hedvig, 1977) tem-se o perfil de resposta do sistema sob teste como efeito da combinação dos processos de transporte de carga e de polarização elétrica (Asami, 2002). Pelo uso de soluções-tampão, o processo pode ser repetido para diferentes valores de pH, escolhidos em uma faixa limitada de forma a cobrir o esperado valor do PI da proteína de interesse.

No presente Relatório Descritivo, foi usada uma alíquota de 1mL da solução de cada proteína (1mg/mL) para um volume final de 10mL de cada solução-tampão para a determinação dos valores das partes real ( $Z'$ ) e imaginária ( $Z''$ ) da impedância (Figs. 2, 3 e 4). A curva que caracteriza o termo referente às perdas no material para uma frequência fixa (em nosso caso, 1MHz) versus o pH da solução pode ser então construída, quando então verificamos que sua segunda derivada passa por um valor máximo para um dado valor de pH (Figs. 5, 6 e 7). Como a existência de um valor nulo para a terceira derivada de um parâmetro é um dos critérios usados para a identificação de um fenômeno crítico em uma solução (Phillips, 1955), associamos a transição observada com o valor do ponto isoelétrico da proteína considerada. Assim, em nossa técnica a quebra na inclinação observada para a curva de  $Z'$  versus pH é usada como um método simples e

direto de determinação do ponto isoeletrico das amostras consideradas que, caso necessário, podem ser facilmente recuperadas para uso posterior, após as medidas realizadas.

## Novas Reivindicações do Pedido de Patente "PI 0602995-7", de 24/07/2006

1 - Método para a determinação do ponto isoelétrico de uma proteína, caracterizado pelo uso de diagramas de relaxação dielétrica, compreendendo as etapas de:

a) medir a resposta elétrica de um tipo específico de proteínas, usando um equipamento do tipo potenciostato/galvanostato, com aplicação de potencial elétrico de baixo valor (entre 10 mV e 100 mV), tanto para o caso de uma faixa de frequência mais larga (de 1 Hz a 1 MHz), para uso mais genérico, ou mais estreita, no caso de medidas realizadas a uma frequência única;

b) o potenciostato/galvanostato descrito em (a) deve estar conectado a um reator, composto por i) recipiente de material não condutor, onde a amostra de interesse deve ser colocada, e ii) os eletrodos metálicos, que devem ser introduzidos de maneira a estar posicionados paralelamente a uma distância fixa, para permitir a excitação elétrica da amostra, o que vem a possibilitar o monitoramento da variação de cargas das moléculas em estudo, bem como, pela injeção de volumes controlados de soluções de substâncias ácidas, alcalinas ou do tipo "solução-tampão", se faz ainda possível variar de maneira controlada o pH do meio;

c) medir os valores das componentes real e imaginária da impedância elétrica da solução mantida no reator, para diferentes valores do pH do meio, de modo a acompanhar a variação correspondente das cargas da macromolécula, possibilitando determinar o ponto isoelétrico da proteína pela identificação do pH do meio para o qual ocorrerão mudanças súbitas na taxa de variação dessas grandezas, sendo o sistema de registro correspondente de natureza elétrica ou eletrônica, com indicação luminosa, sonora ou gráfica do valor do ponto isoelétrico assim determinado.

2 - Método para a determinação do ponto isoelétrico de uma proteína, de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o equipamento do tipo potenciostato/galvanostato com gerador de frequência possui um recipiente onde a amostra de interesse deve ser colocada, de modo a possibilitar o monitoramento da variação de cargas das moléculas em estudo a partir da injeção de volumes líquidos de substâncias, e assim, medir os valores das componen-

tes real e imaginária da impedância elétrica da solução mantida no reator, o que permite acompanhar a variação de cargas da molécula e, desse modo, determinar o ponto isoelétrico da proteína pela identificação do valor do pH do meio para o qual ocorrerão mudanças súbitas na taxa de variação dessas grandezas.

## FIGURAS

FIG.1

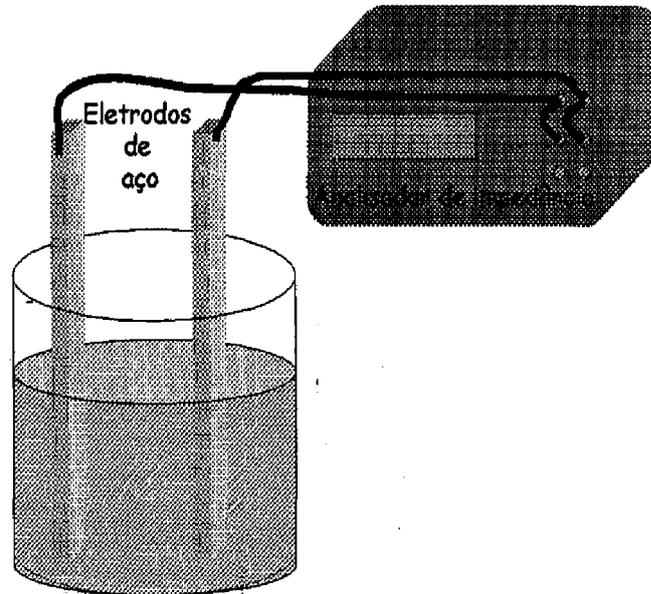


FIG. 2

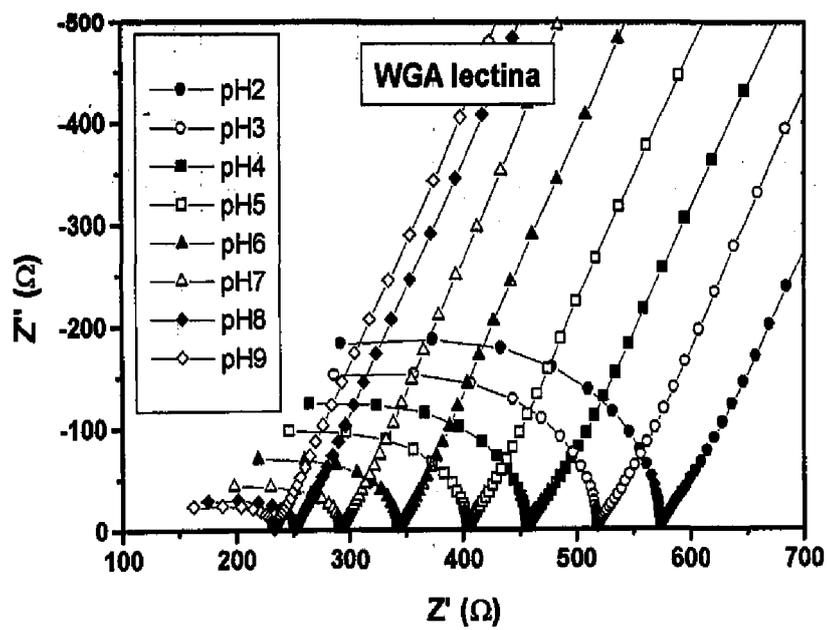


FIG. 3

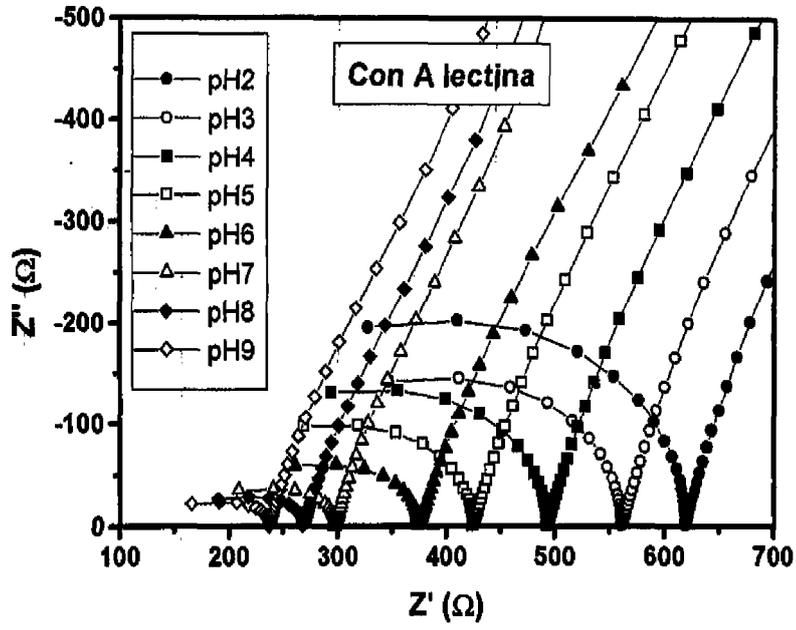


FIG. 4

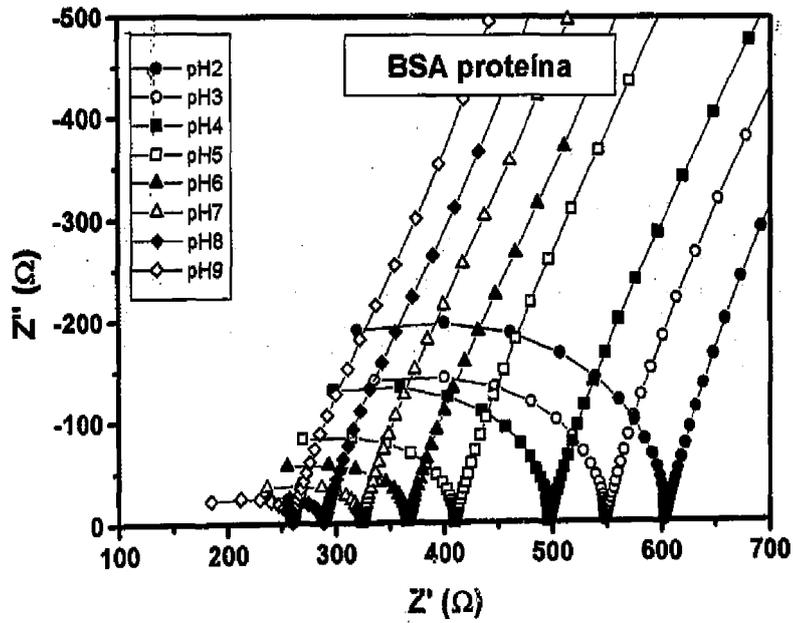


FIG. 5

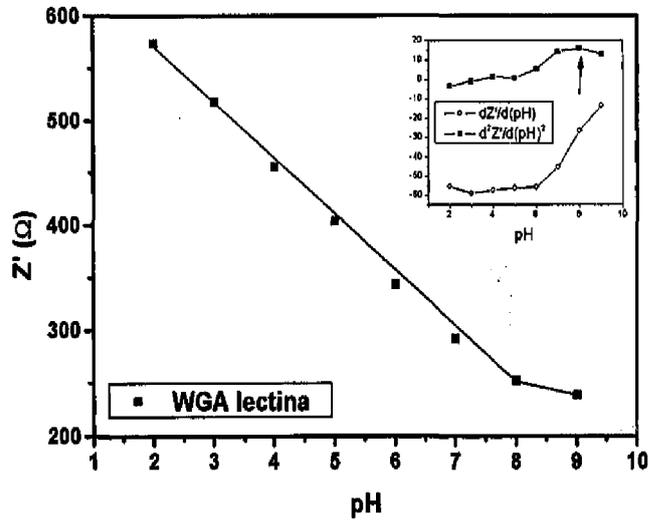


FIG. 6

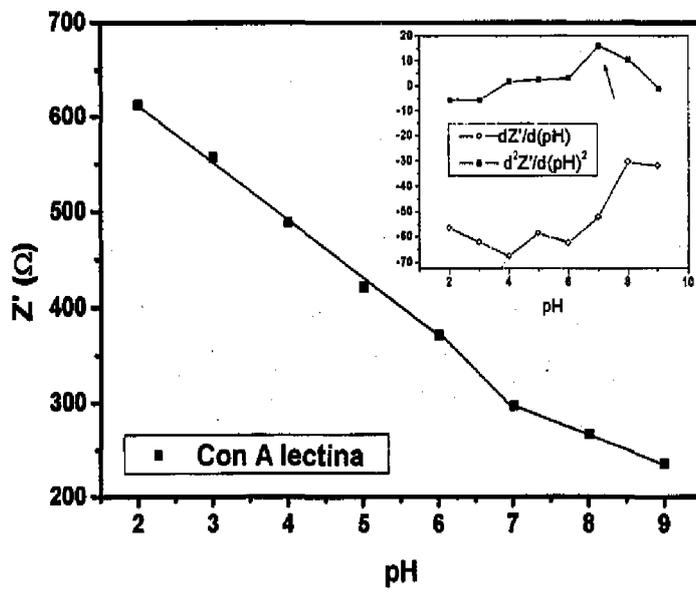


FIG. 7

