

## Estudo da Interação Metal Proteína Após Sonicação e Extração por Radiação Micro-onda

Augusto C. L. M. Peigo\*, Gustavo S. Pessôa, Marco A. Z. Arruda.

### Resumo

Este trabalho destaca a importância da avaliação de diferentes técnicas de preparo de amostras na Metalômica. Assim, foi estudado como o emprego do ultrassom (sistema Cup-horn) e da radiação micro-onda afetam a interação metal-proteína, usando a enzima anidrase carbônica como modelo. Com o objetivo de averiguar se a interação entre o metal e a proteína se manteve intacta mesmo após os procedimentos de preparo de amostra, a anidrase, solubilizada em tampão acetato de amônio, foi submetida à ultrafiltração usando filtros de exclusão de 10 kDa. Os teores de Zinco ligados às proteínas foram determinados no resíduo e na solução filtrada por meio da técnica de ICP-MS, e a concentração de proteína no resíduo por meio do método de Bradford. Os resultados foram obtidos empregando um tempo de sonicação de 120 segundos, com amplitudes de 5, 10, 20, 40 e 60%. Os teores de zinco das amostras que sofreram sonicação são semelhantes ao da amostra que não sofre qualquer tipo de preparo, sugerindo que a energia fornecida pelo Cup-Horn (maior valor de 19350 J) não foi suficiente para disponibilizar o íon livre para a solução. Além disso as concentrações de zinco nas soluções filtradas foram menores que os limites de quantificação. O próximo passo do trabalho é de avaliar o emprego da radiação micro-ondas no preparo da anidrase carbônica.

### Palavras-chave:

Metaloproteína, Ultrassom, Micro-ondas.

### Introdução

O preparo de amostras pode ser compreendido como toda a manipulação que modifica a matriz da amostra, revelando uma ou mais características da mesma. Quando o foco é voltado para proteínas, as estratégias de preparo de amostra devem reduzir a heterogeneidade da mesma em nível molecular, além de possibilitar a obtenção de resultados significativos e confiáveis<sup>1</sup>.

Este trabalho visa estudar a interação metal-proteína empregando diferentes procedimentos de preparo de amostra, que envolvem ultrassom e radiação micro-onda. Assim, foi utilizada a anidrase carbônica, uma vez que esta proteína apresenta grande relevância em estudos proteômicos e metalômicos, bem como está presente em todos os seres vivos, cujo íon metálico age como catalisador da reação de hidratação do dióxido de carbono<sup>2</sup>.

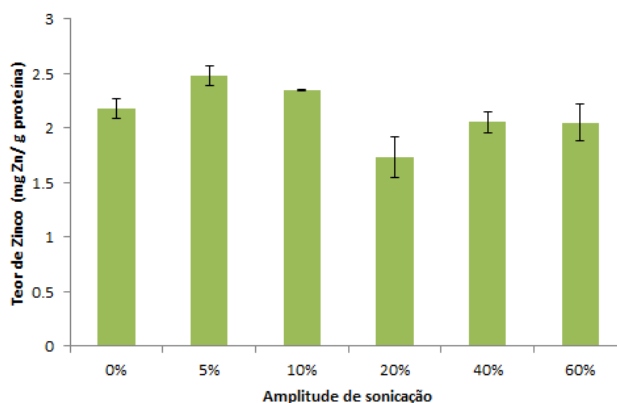
### Resultados e Discussão

A princípio, obtiveram-se resultados da sonicação da anidrase carbônica, utilizando-se do sistema *Cup-Horn*. Os parâmetros avaliados são apresentados na Tabela 1, bem como a energia fornecida pelo ultrassom.

**Tabela 1.** Parâmetros avaliados no preparo da anidrase carbônica empregando ultrassom do tipo *Cup-Horn*, e a energia fornecida ao sistema.

Tempo de sonicação (s)	120				
Amplitude (%)	5	10	20	40	60
Energia fornecida (J)	5641	6199	8211	13260	19350

Na Tabela 1, pode-se observar que a energia fornecida pelo sistema *Cup-Horn* apresentou uma variação de 5641 a 19350 J. Contudo, esta energia não foi suficiente para separar o metal da proteína, como se observa na Figura 1, uma vez que o teor de zinco praticamente não se altera entre as diferentes amplitudes de sonicação (0, 5, 10, 20, 40 e 60%).



**Figura 1.** Teor de zinco na anidrase carbônica após procedimento de sonicação usando sistema *Cup-Horn*.

### Conclusões

A energia fornecida pelo sistema *Cup-Horn* não foi suficiente para romper a interação metal proteína, nem mesmo na maior amplitude testada (60%). Assim, este trabalho sugere que o uso deste sistema de ultrassom pode ser utilizado em procedimentos de preparo de amostras voltados para a Metalômica, mesmo em diferentes condições de extração.

O próximo passo do trabalho é realizar o preparo da anidrase carbônica utilizando-se radiação micro-onda.

### Agradecimentos

PIBIC, FAPESP, CAPES, CNPQ, INCT de Bioanalítica.

<sup>1</sup> Arruda, M. A. Z. Trends in Sample Preparation. New York: Nova Science, 2007. 283 p.

<sup>2</sup> Silverman, D. N., Lindskog, S. The Catalytic Mechanism of Carbonic Anhydrase - Implications of a Rate Limiting Protolysis of Water, Acc. Chem. Res., no 21, pp. 30-31, 1988.