

Brasília, DF
Dezembro, 2009

Autores

Caroline Luchtenberg Ribeiro
Graduanda, Química
Universidade de Brasília
carolluch@gmail.com

Jonatas Gomes da Silva
Doutorando, Químico
Universidade de Brasília
jonatasg@yahoo.com.br

Luciano Paulino da Silva
PhD, Biólogo
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia
paulinol@cenargen.embrapa.br

Jurandir Rodrigues de Souza
PhD, Químico
Universidade de Brasília
rodsouza@unb.br

Marcelo Porto Bemquerer
PhD, Biólogo
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia
mpbemque@cenargen.embrapa.br

Clarissa Silva Pires de Castro
PhD, Química
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia
clarissa@cenargen.embrapa.br

Desenvolvimento de biossensor eletroquímico: síntese, caracterização e interação do peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂ com Cu(II)

Resumo

O monitoramento das concentrações de metais tóxicos, atualmente, é realizado por técnicas espectroscópicas de grande porte e de alto custo, não sendo possível, portanto, fazer análises em tempo real no campo. Os biossensores aparecem como uma solução possível para atender essa necessidade, pois, além de serem portáteis, possuem a capacidade de fazer uma estimativa da biodisponibilidade dos íons metálicos. O fragmento peptídico H-VNITKQHTVTTTT-NH₂, utilizado como elemento biológico de reconhecimento no desenvolvimento do biossensor, faz parte do sítio de reconhecimento a Cu(II) do príon e foi obtido pelo método da síntese em fase sólida. Depois de completada a síntese, parte da peptidil-resina foi separada e ligada ao derivado do aminoácido cisteína e a outra parte teve o grupo N-terminal acetilado com Ac₂O. Os voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial obtidos para Cu(II), em tampão B-R pH 7,40, na ausência e na presença do Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂, atestaram a interação entre essas duas espécies químicas. Por meio do ponto de equivalência da curva de titulação amperométrica obtida, calculou-se a estequiometria do complexo (1Cu(II): 1 Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂), resultado este coincidente com a literatura. Determinou-se o K_d, para o sistema Cu(II)-Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂ (1,56 x 10⁻⁸ mol L⁻¹), cujo valor obtido demonstra a estabilidade do complexo formado entre as duas espécies. Foram calculados os valores de E^{0'} para as espécies Cu(I) (-0,53 V) e Cu(II) (-0,11 V) complexadas com o peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂. Os resultados apresentados mostram a viabilidade do desenvolvimento de um biossensor eletroquímico à base do peptídeo H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂ e sua utilização posterior na determinação de Cu(II) em amostras ambientais e de alimentos.

Palavras-chave: biossensor, peptídeo do príon, cobre, peptídeo sintético, voltametria de redissolução anódica.

Introdução

Muitos metais são essenciais para o crescimento de todos os tipos de organismos, desde as bactérias até mesmo o ser humano, mas eles podem danificar sistemas biológicos se estiverem em altas concentrações. Acredita-se que os metais talvez sejam os agentes tóxicos mais conhecidos pelo homem. Os efeitos tóxicos dos metais sempre foram considerados como eventos de curto prazo, agudos e evidentes, como a anúria (ausência da produção de urina) e a diarreia sanguinolenta, decorrentes da ingestão de mercúrio. Atualmente, ocorrências a médio e longo prazo são observadas, e as relações causa-efeito são pouco evidentes e quase sempre subclínicas. Geralmente esses efeitos são difíceis de serem distinguidos e perdem em especificidade, pois podem ser provocados por outras substâncias tóxicas ou por interações entre esses agentes químicos. A manifestação dos efeitos tóxicos está associada à dose e pode distribuir-se por todo o organismo, afetando vários órgãos, alterando os processos bioquímicos,

organelas e membranas celulares. A exposição humana aos metais tóxicos pelo meio ambiente tem aumentado muito durante os últimos 50 anos. Por exemplo, o uso repetido de fungicidas à base de cobre (Cu) nos cafeeiros, para o controle de doenças, tem resultado em maior teor de Cu nos solos e vegetação elevando os níveis de poluição (LOLAND e SINGH, 2004). A acumulação de Cu nos solos ocorre devido à sua interação com ligantes difusores, com macromoléculas e com ligantes presentes em membranas, o que lhe confere as propriedades de bioacumulação na cadeia alimentar e persistência no ambiente. A bioacumulação encarrega-se de transformar concentrações consideradas normais em concentrações tóxicas para diferentes espécies da biota e para o homem. A persistência garante o efeito ao longo do tempo ou de longo prazo, mesmo depois de interrompidas as emissões. Dessa forma, o cobre será absorvido pelas plantas e ingerido pelos animais e entrará na alimentação humana por meio do consumo de carne, leite e peixes, causando sérios problemas à saúde. A dose diária recomendada de cobre nas dietas é de 2 a 3 mg. No entanto, em concentrações elevadas, este metal poderá ser pró-oxidante e, portanto, tóxico. Em animais, a deficiência desse metal resulta na incapacidade de aproveitar o ferro armazenado no fígado, e o animal passa, portanto, a sofrer de anemia. Já grandes quantidades deste elemento podem causar distúrbios como a Doença de Wilson. Neste contexto, o monitoramento das concentrações desse metal é essencial para avaliar seus níveis de toxicidade. No Brasil, a grande produção e o elevado consumo de café tornam este produto essencial para caracterização, seja em relação à qualidade ou à origem geográfica. Essa caracterização tem sido realizada por meio da determinação de elementos-traços, em particular do cobre (Cu). Os níveis de Cu determinados em grãos de café variam entre 11 e 24 mg/Kg, o que pode ser considerado elevado quando comparado a outros alimentos. Atualmente, esse monitoramento é realizado por técnicas espectroscópicas de grande porte e de alto custo (espectroscopia de absorção atômica - AAS e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado - ICP-MS), não sendo possível, portanto, fazer análises em campo, em tempo real, e evitar que ações governamentais levem muito tempo para serem tomadas se as concentrações excederem os limites máximos permitidos. Os sensores eletroquímicos aparecem como uma alternativa possível para atender essa necessidade, pois

permitem a análise em campo de vários íons devido ao seu pequeno porte, poucos requisitos de potência e, em alguns casos, a necessidade de pouco ou nenhum tratamento prévio da amostra.

A maior parte dos estudos de eletrodos quimicamente modificados para a detecção de íons metálicos envolve ligantes macrocíclicos como elementos de reconhecimento. Na natureza, porém, a interação de metais com peptídeos ocorre com alto grau de seletividade, maior do que com ligantes macrocíclicos (SIGEL e MARTIN, 1982; LICINI e SCRIMIN, 2003). Considerando o desenvolvimento de biossensores que utilizam moléculas biológicas como elementos de reconhecimento e a extensa literatura sobre a complexação de íons metálicos com peptídeos e proteínas (DE CASTRO et al., 2000, 2002, 2003a, 2003b), é surpreendente que poucos estudos tenham sido conduzidos até o momento para o desenvolvimento de eletrodos sólidos baseados em peptídeos para a determinação de metais.

Os estudos existentes utilizam eletrodos de ouro, carbono vítreo e grafite como transdutores de sinal (eletrodos-base), enquanto o aminoácido L-Cys ou os peptídeos angiotensina I, GGH e HSQKVF são os elementos de reconhecimento dos íons Cd(II), Pb(II) e Cu(II). Limites de detecção da ordem de 10^{-9} mol L⁻¹ têm sido geralmente determinados para os metais. A interferência de outros metais — Ni(II), Zn(II), Cr(III), Ba(II), Cd(II), Pb(II) e Cu(II) — sobre o íon metálico de interesse também tem sido investigada e na maioria dos casos os efeitos foram considerados insignificantes (ARRIGAN e LE BIHAN, 1999; LIU et al., 1999, 2007; YANG et al., 2001a; CHOW et al., 2005a, 2005b, 2005c, 2005d, 2006). Alguns dos biossensores desenvolvidos foram aplicados com sucesso para a determinação de metais em amostras reais. Chow et al. (2005a) demonstraram a aplicabilidade de um eletrodo de ouro modificado com angiotensina I na determinação de chumbo no lago Bedford, na Austrália. Liu et al. (1999) utilizaram um eletrodo de ouro modificado com L-Cys para determinar cobre em amostras certificadas de água de rio e mar. Concentrações baixas de cobre também foram determinadas em água potável, utilizando um eletrodo de ouro modificado com L-Cys, por Yang et al. (2001b).

O fragmento peptídico VNITKQHTVTTTT é um dos sítios de ligação para íons cobre(II) do Príon, proteína presente no tecido nervoso da maioria dos mamíferos,

que é responsável por um conjunto de doenças denominadas de Encefalopatias Espongiformes (GAGGELLI et al., 2006). A modificação química desse fragmento peptídico com um grupo sulfidril (H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂) torna-o um elemento biológico de reconhecimento potencial para o desenvolvimento de biossensores que utilizam o eletrodo de ouro como transdutor de sinal para detecção e quantificação de cobre. O objetivo deste trabalho é realizar a síntese e a caracterização do Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂ e estudar sua interação com íons Cu(II), em meio semelhante ao fisiológico, por voltametria de redissolução anódica (ASV), para posterior utilização deste peptídeo na construção de um biossensor para determinação de Cu(II) em amostras ambientais e de alimentos.

Materiais e métodos

Os peptídeos Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂ e H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂ foram sintetizados por meio da metodologia de acoplamento/desproteção 9-fluorenilmetiloxycarbonila (Fmoc). A estratégia utilizada na síntese em fase sólida dos peptídeos consistiu inicialmente na desproteção de uma extremidade amínica do suporte polimérico (Rink Amide-MBHA Resin, 0,52 mmol g⁻¹, Peptides international) utilizando-se como reagente uma solução de 4-metilpiperidina (Merck) a 20% em volume em N,N-dimetilformamida (DMF, Carlo Erba) e acoplamento posterior de um Fmoc-aminoácido (com a cadeia lateral devidamente protegida, quando necessário) na extremidade amínica desprotegida, utilizando-se como reagentes para a ativação do grupo carboxila os compostos tetrafluoroborato de [benzotriazol-1-iloxi(dimetilamino) metilideno]-dimetilazânio (TBTU, Merck), 1-hidroxibenzotriazola (HOBT, NovaBiochem) e N,N-diisopropiletilamina (DIPEA, Sigma), dissolvidos em N,N-dimetilformamida (DMF, Vetec) e diclorometano (Vetec). As etapas de desproteção e acoplamento foram repetidas alternadamente até a adição do derivado de aminoácido N-terminal e desproteção do grupamento Fmoc amino-terminal. Ao completar a síntese, os peptídeos foram submetidos à etapa de clivagem, na qual o suporte polimérico e seus grupos protetores foram removidos por meio da reação com ácido trifluoroacético (TFA, Sigma) e nucleófilos sequestradores de carbocátions – por exemplo, etanoditiol (Sigma), metilfenilsulfeto (Sigma), fenol (Sigma) e triisopropilsilano (Sigma). Após uma hora e trinta min. de reação, borbulhou-se nitrogênio

até a completa evaporação do TFA. Em seguida, lavagens foram conduzidas com éter diisopropílico (Vetec) gelado para a extração dos subprodutos de reação entre os carbocátions formados e os nucleófilos adicionados, sendo o peptídeo recolhido por filtração em funil de placa porosa. Conduziu-se, então, a solubilização do peptídeo com solução aquosa de acetonitrila (ACN, J.T. Baker) a 50% (em volume). A solução foi recolhida por filtração e liofilizada. Os peptídeos foram purificados por cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC), utilizando-se o cromatógrafo líquido LC 10 (Shimadzu) e uma coluna semipreparativa (Zorbax Agilen, 250 x 10 mm, 5 μm), fluxo de 2,5 mL min.⁻¹, sob temperatura de 22°C. O gradiente de variação de composição da fase móvel foi o seguinte: (H₂O:ACN:TFA, 95:5:0,1; v:v:v) por 5 min.; (H₂O:ACN:TFA, 95:5:0,1; v:v:v) a (H₂O:ACN:TFA, 5:95:0,1; v:v:v) em 90 min. e detecções em 216 e 280 nm. As frações cromatográficas atribuídas aos peptídeos Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂ e H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂ foram verificadas por espectrometria de massa em modalidade MALDI-ToF, utilizando-se o espectrômetro de massa Ultraflex III (Bruker Daltonics) nas seguintes condições analíticas e instrumentais: voltagem de aceleração de 25 kV; pressões na fonte de íons e no detector de 5,0 x 10⁻⁶ e 2,0 x 10⁻⁷ mBar; e ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico como matriz. Os valores de massas moleculares obtidos experimentalmente para os peptídeos foram comparados às massas moleculares teóricas. Determinou-se a concentração da solução aquosa do peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂ por meio de medidas de absorvância (205, 215 e 225 nm) de soluções aquosas, utilizando-se o espectrofotômetro modelo UV-mini 1240 (Shimadzu) e o método de Murphy e Kies (1960).

Realizou-se o estudo eletroquímico com a utilização do analisador voltamétrico 797 VA Computrace (Metrohm) e uma célula eletroquímica composta pelo eletrodo de mercúrio gota pendente (HMDE) (eletrodo de trabalho), eletrodo Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) (eletrodo de referência) e eletrodo de platina (eletrodo auxiliar). As medidas voltamétricas de redissolução anódica de pulso diferencial foram realizadas em triplicatas, após o borbulhamento de N₂ durante 5 min. para o eletrólito suporte e 1 min. após as adições do Cu(II) e do peptídeo, no intervalo de potencial de -0,60 V (potencial inicial, E_i) a 0,05 V (potencial final, E_f), velocidade de varredura (v) de 50 mV s⁻¹, potencial de deposição (E_d) de -1,20 V e tempo

de deposição (t_d) de 60 s. Realizou-se o estudo da interação do peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂ com o íon Cu(II), utilizando-se a ASV, por meio de adições sucessivas de 20 μ L do peptídeo $7,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, até a complexação de todo o Cu(II) na célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão Britton-Robinson (B-R) pH 7,40 (ácido fosfórico Sigma $4,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, ácido acético Vetec $4,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, ácido bórico Sigma $4,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, hidróxido de sódio Sigma 2 mol L⁻¹ para ajustar o valor do pH) e 100 μ L de Cu(II) Fluka $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Com base nos voltamogramas obtidos, calculou-se a estequiometria, a constante de dissociação (K_d) do complexo Cu(II)-Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂ e os potenciais padrões de redução das espécies Cu(I) e Cu(II) complexadas ao peptídeo (E^0).

Resultados e discussão

Partindo-se de 0,15 mmol (288 mg) de resina (Rink Amide-MBHA Resin, 0,52 mmol g⁻¹), obtiveram-se 928 mg do peptidil-resina H-VNITKQHTVTTTT-NH₂-Resina. Uma parte (464 mg) foi separada e ligada ao derivado do aminoácido cisteína (Fmoc-Cys(Trt)-OH).

Os 464 mg restantes tiveram o grupo N-terminal acetilado com anidrido acético (Ac₂O) (Merck). Após a etapa de clivagem, obtiveram-se 72 mg do peptídeo H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂ e 70 mg do peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂. Observaram-se dois compostos principais (32,5 e 35,0 min.) no cromatograma obtido para o peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂ (Figura 1), correspondentes a produtos com absorvância a 216 nm.

A fração cromatográfica de 32,5 min., observada no cromatograma da Figura 1, foi atribuída ao peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂ por meio da espectrometria de massa, modalidade MALDI-ToF (Figura 2). Observou-se um único íon principal (correspondente a $m/z = 1484,9$) no espectro de massa. Esse íon refere-se ao peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂ sintetizado, uma vez que o valor de massa molecular experimental coincide com o valor de massa molecular teórico do peptídeo (MM = 1483,9 Da, calculada a partir de $m/z = 1484,9$ com $z = 1$). Os resultados mostram que a síntese do peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂ foi satisfatória e que ele apresenta grau de pureza adequado para os testes de interação com o íon Cu(II) por ASV.

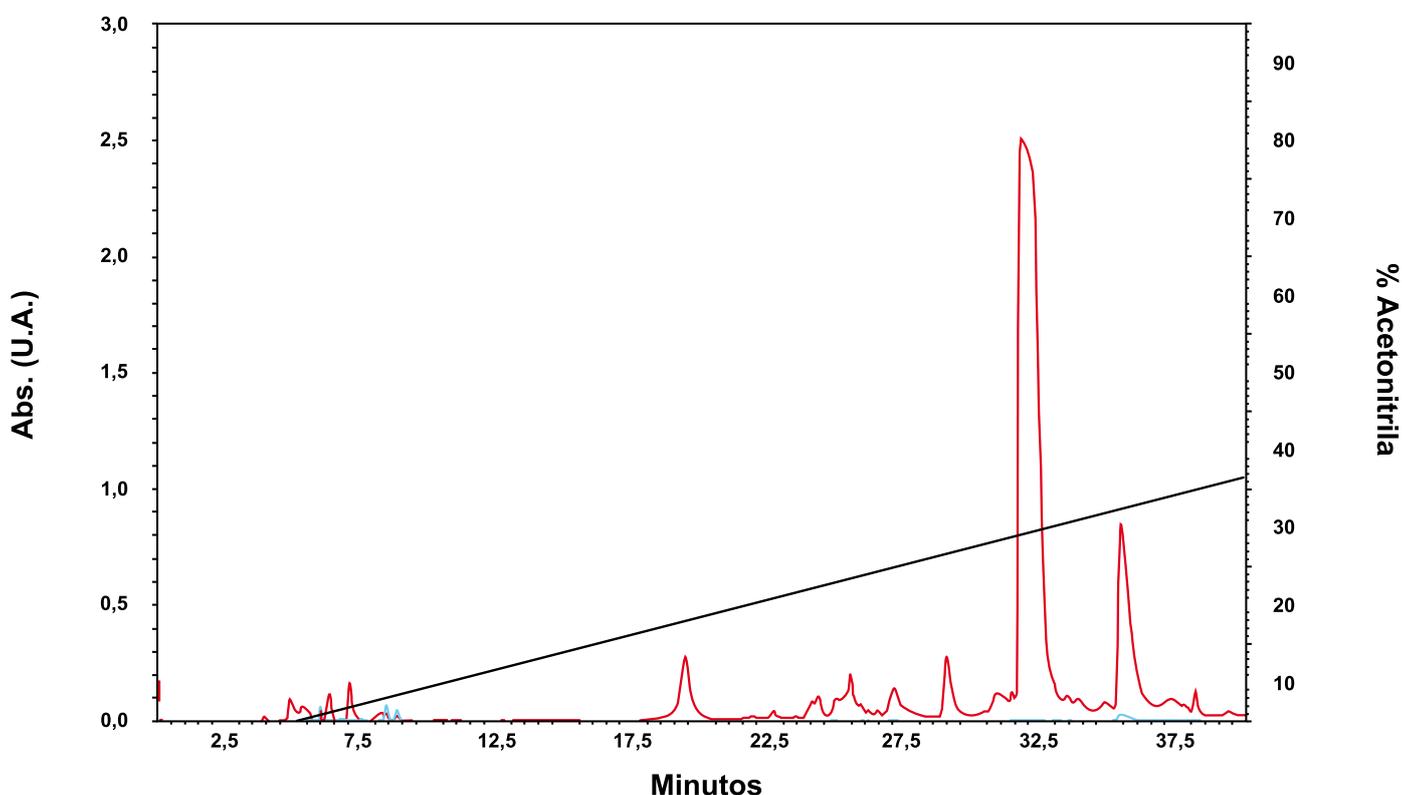


Figura 1. Cromatograma do peptídeo bruto Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂. Em vermelho, absorção em 216 nm; em azul, absorção em 280 nm; em preto, gradiente de concentração do solvente B (solução de TFA a 0,1% em ACN). Coluna semipreparativa (250 x 10 mm, 5,0 μ m, Zorbax Agilent), fluxo a 2,5 mL min⁻¹, Temperatura 22°C, gradiente (H₂O:ACN:TFA, 95:5:0,1; v:v:v) por 5 min; (H₂O:ACN:TFA, 95:5:0,1; v:v:v) a (H₂O:ACN:TFA, 5:95:0,1; v:v:v) em 90 min.

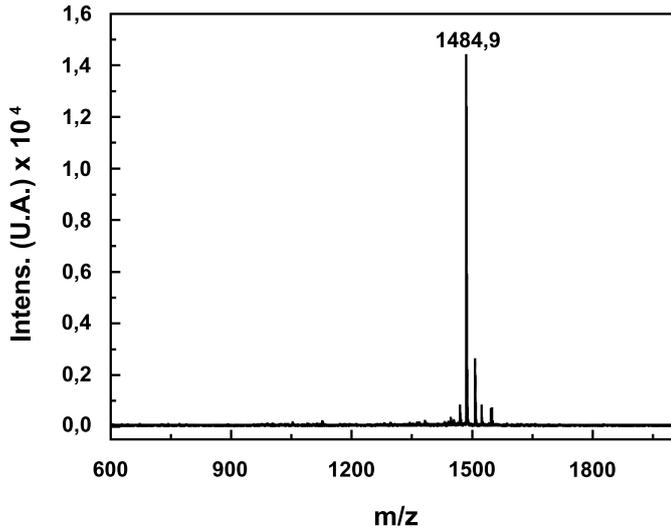


Figura 2. Espectro de MALDI-ToF/MS (Bruker Ultraflex III) para a fração cromatográfica correspondente ao peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂ purificado. Condições analíticas e instrumentais: 25 kV; pressões na fonte de íons e no detector: 5,0 x 10⁻⁶ e 2,0 x 10⁻⁷ mBar; matriz: ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico.

Observaram-se três compostos principais (correspondentes a produtos com 30,0; 31,0 e 32,5 min.) no cromatograma obtido para H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂ (Figura 3).

As frações cromatográficas de 30,0 min., 31,0 min. e 32,5 min. observadas no cromatograma da Figura 3 foram atribuídas ao peptídeo H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂ por meio da espectrometria de massa, modalidade MALDI-ToF. Observaram-se dois íons no espectro de massa obtido para as frações cromatográficas do peptídeo H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂ (Figura 4). O primeiro produto (m/z = 1546,8) refere-se ao peptídeo H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂ sintetizado, uma vez que o valor de massa molecular experimental coincide com o valor de massa molecular teórico do peptídeo (MM = 1544,8 Da, calculada a partir de m/z = 1545,8 com z = 1). O segundo produto observado em m/z = 3090,6 representa o peptídeo H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂ na forma dimerizada por meio de ligação dissulfeto.

Ensaio de interação do peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂ com o Cu(II) foram realizados por ASV. A Figura 5 mostra os voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial obtidos para 100 μL de Cu(II) 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹, em 10 mL de tampão B-R pH 7,40, na ausência e na presença do Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂ 7,2 x 10⁻⁵ mol L⁻¹.

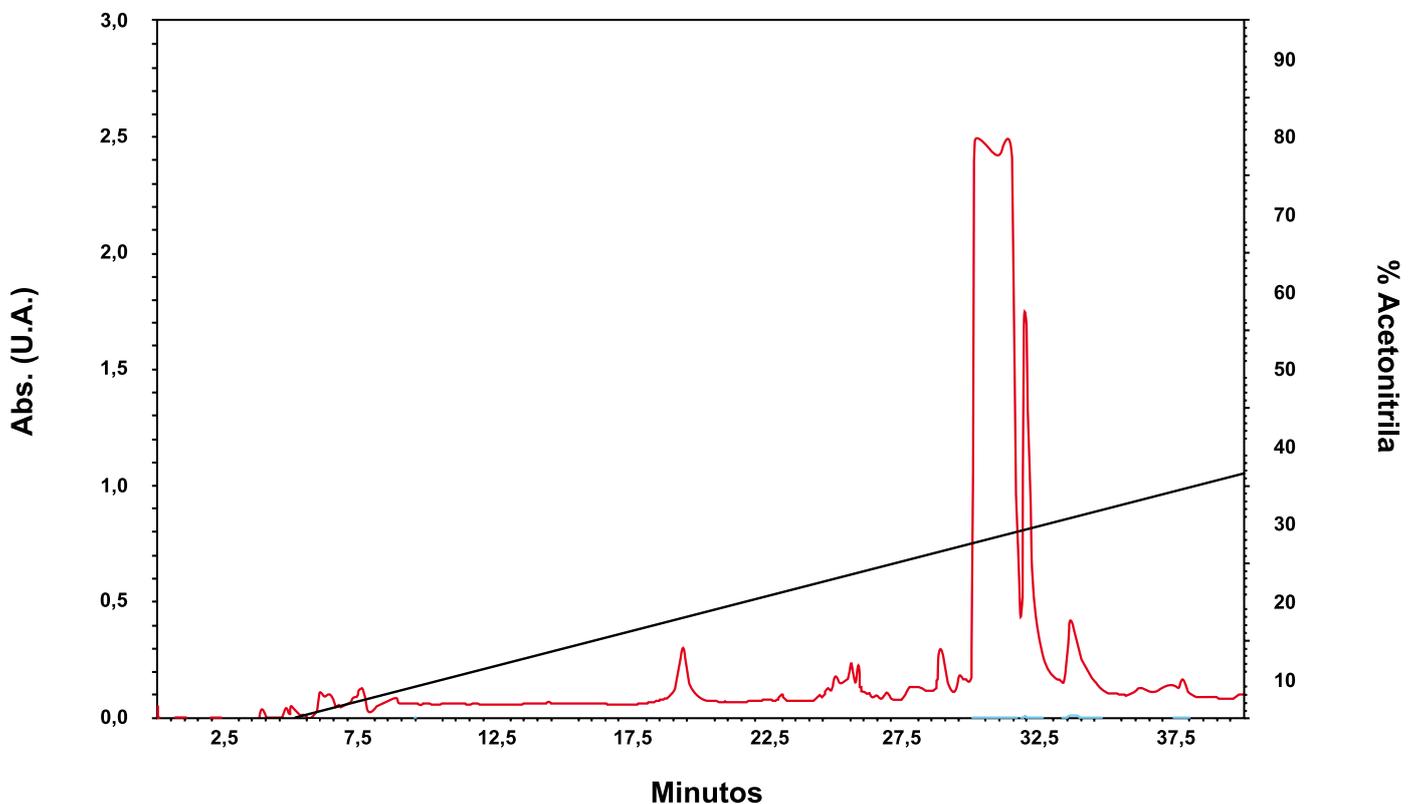


Figura 3. Cromatograma do peptídeo bruto H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂. Em vermelho, absorção em 216 nm; em azul, absorção em 280 nm; em preto, gradiente de concentração do solvente B (solução de TFA a 0,1% em ACN). Coluna semipreparativa (250 x 10 mm, 5,0 μm, Zorbax Agilent), fluxo a 2,5 mL min⁻¹, temperatura 22°C, gradiente (H₂O:ACN:TFA, 95:5:0,1; v:v:v) por 5 min; (H₂O:ACN:TFA, 95:5:0,1; v:v:v) a (H₂O:ACN:TFA, 5:95:0,1; v:v:v) em 90 min.

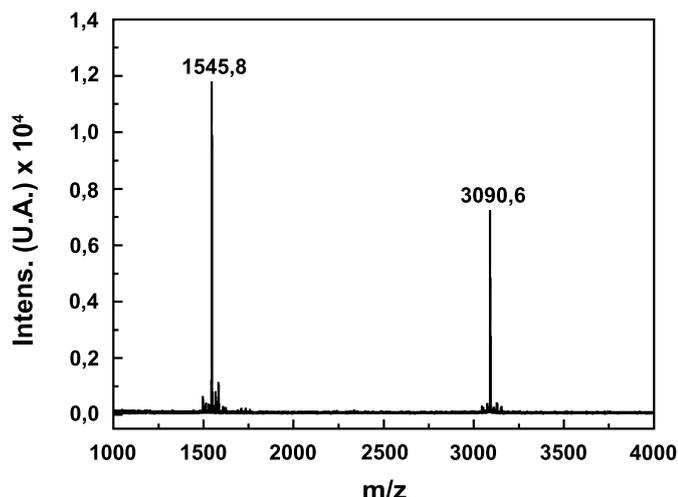


Figura 4. Espectro de MALDI-ToF/MS (Bruker Ultraflex III) para a fração cromatográfica correspondente ao peptídeo H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂ purificado. Condições analíticas e instrumentais: 25 kV; pressões na fonte de íons e no detector: 5,0 x 10⁻⁶ e 2,0 x 10⁻⁷ mBar; matriz: ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico.

Observa-se que a adição do Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂ provoca o decaimento da corrente de oxidação do cobre, atestando a interação do íon metálico Cu(II) com o peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂.

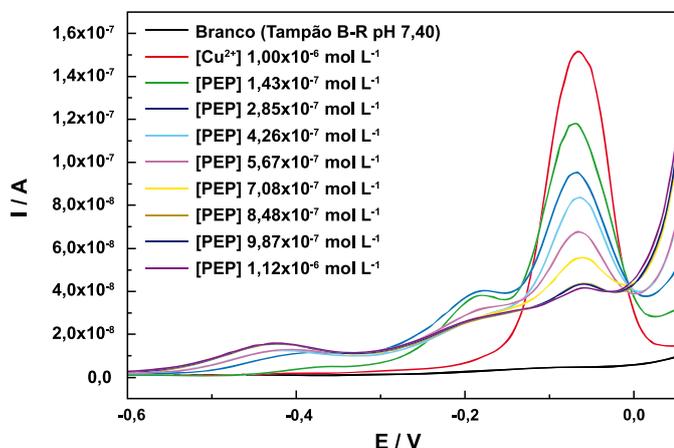


Figura 5. Voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial para 100 μ L de Cu(II) 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em 10 mL de tampão B-R pH = 7,40 com adições de 20 μ L de Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂ 7,2 x 10⁻⁵ mol L⁻¹. E_d = -1,20 V, t_d = 60s, E_i = -0,60 V E_f = 0,05 V, v = 50 mV s⁻¹, Eletrodo de trabalho: HMDE; Eletrodo de referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹).

Obteve-se a curva de titulação amperométrica (Figura 6) com base nos voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial para o íon Cu(II) na ausência e na presença do Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂. Por intermédio do ponto de equivalência da curva de titulação amperométrica, calculou-se a estequiometria do complexo (1Cu(II): 1 Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂).

Utilizando-se a lei da ação das massas, determinou-se o K_d para o sistema Cu(II)-Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂ (1,56 x 10⁻⁸ mol L⁻¹), cujo valor obtido demonstra a estabilidade do complexo formado entre as duas espécies. A interação do íon Cu(II) com o Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂ ocorre devido à afinidade entre o cobre e o nitrogênio do anel imidazólico de histidina. Provavelmente, o complexo é formado na região central do peptídeo, com o Cu(II) ligando-se ao resíduo de histidina da sequência VNITKQHTVTTTT (BROWN et al., 2004). O principal componente do complexo Cu(II)-Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂ é uma espécie que envolve um doador de nitrogênio imidazólico e pelo menos uma amida não protonada como doadora de nitrogênio (DE CASTRO et al., 2009).

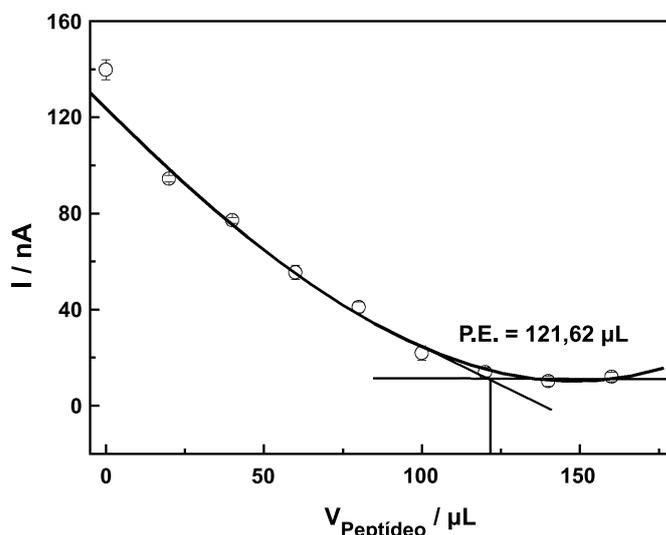


Figura 6. Curva de titulação amperométrica de 100 μ L de Cu(II) 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em 10 mL de tampão B-R pH = 7,40 com o Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂. Adições sucessivas de 20 μ L da solução do Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂ 7,2 x 10⁻⁵ mol L⁻¹. (n_d = 3 determinações).

Com base no valor de K_d, foram calculados os valores de E^o para as espécies Cu(I) (-0,53 V) e Cu(II) (-0,11 V) complexadas com o peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂. Os valores de E^o calculados foram próximos aos valores de E^o observados nos voltamogramas de redissolução anódica de pulso diferencial (Cu(I) - 0,43 V e Cu(II) - 0,19 V) (Figura 5).

Conclusão

A partir das análises dos resultados, pode-se afirmar que a metodologia de síntese de peptídeos Fmoc em fase sólida é adequada para a obtenção dos

peptídeos. O peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH₂ forma complexo com o íon Cu(II), o que foi evidenciado pelo decaimento da corrente de oxidação do cobre quando das adições de peptídeo. Os resultados apresentados mostram a viabilidade de construção de um biossensor de peptídeo que possibilitará a análise de amostras de café com custos e tempos reduzidos, quando comparados às análises convencionais realizadas por AAS e ICP-MS, além do aumento da produtividade.

No aspecto alcance da tecnologia, os resultados obtidos com o método desenvolvido abrangerão e terão influência sobre todas as regiões de plantio do café no Brasil e poderão ser utilizados por instituições de pesquisa e universidades e órgãos de defesa do consumidor na produção de dados para a avaliação do café do ponto de vista nutricional e toxicológico com relação à concentração de cobre. Para a finalização do desenvolvimento do biossensor e sua aplicação na determinação de cobre em amostras alimentares, serão realizadas as seguintes etapas: caracterização do eletrodo de ouro modificado como o peptídeo do príon acrescido quimicamente de um grupamento sulfidril H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂ por voltametria cíclica (CV); caracterização da superfície do eletrodo de ouro modificado com o peptídeo H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂ por microscopia de força atômica; desenvolvimento do método eletroquímico de análise para determinação de Cu(II), utilizando-se o biossensor eletroquímico; e avaliação do desempenho do biossensor de peptídeo na determinação dos íons Cu(II) em amostras de café, utilizando-se técnicas voltamétricas.

A utilização das técnicas eletroquímicas no desenvolvimento do biossensor apresenta vantagens quando comparadas a outras técnicas. As técnicas eletroquímicas não são destrutivas; são de baixo custo e de alta sensibilidade; permitem a determinação direta, rápida, simultânea e precisa de diversos analitos em uma única varredura, sem a necessidade de etapa de separação ou pré-tratamento; os sinais de resposta sofrem uma menor influência de interferentes; e podem ser adaptadas ao campo por meio da construção de ultramicroeletrodos e biossensores.

Referências bibliográficas

- ARRIGAN, D. W. M.; LE BIHAN, L. A study of L-cysteine adsorption on gold via electrochemical desorption and copper(II) ion complexation. **The Analyst**, Londres, v. 124, n.11 p. 1645-1649, 1999.
- BROWN, D. R.; GUANTIERI, V.; GRASSO, G.; IMPELLIZZERI, G.; PAPPALARDO, G.; RIZZARELLI, E. Copper(II) complexes of peptide fragments of the prion protein. Conformation changes induced by copper(II) and the binding motif in C-terminal protein region. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Amsterdam, v. 98, n.1, p.133-143, 2004.
- CHOW, E.; GOODING, J. J. Peptide Modified Electrodes as Electrochemical Metal Ion Sensors. **Electroanalysis**, Chichester, v.18, n.15, p.1437-1448, 2006.
- CHOW, E.; HIBBERT, D. B.; GOODING, J. J. Electrochemical detection of lead ions via the covalent attachment of human angiotensin I to mercaptopropionic acid and thioctic acid of human angiotensin I to mercaptopropionic acid and thioctic acid self-assembled monolayers. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 543, n.1-2, p.167-176, 2005a.
- CHOW, E.; HIBBERT, D. B.; GOODING, J. J. His-Ser-Gln-Lys-Val-Phe as a selective ligand for the voltammetric determination of Cd(II). **Electrochemistry Communications**, Amsterdam, v.7, n.1, p.101-106, 2005b.
- CHOW, E.; HIBBERT, D. B.; GOODING, J. J. Voltammetric detection of cadmium ions at glutathione-modified gold electrodes. **The Analyst**, Londres, v.130, n.6, p.831-83, 2005c.
- CHOW, E.; WONG, E. L. S.; BOCKING, T.; HIBBERT, D. B.; GOODING, J. J. Analytical performance and characterization of MPA-Gly-Gly-His modified sensors. **Sensors and Actuators B**, Amsterdam, v.111-112, p.540-548, 2005d.
- DE CASTRO, C. S. P.; SOUZA, J. R.; BLOCH JUNIOR, C.; BRAZ, J. Zinc binding to lambda phage DNA studied by voltammetric techniques. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 11, n. 4 p. 398 – 404, 2000.

- DE CASTRO, C. S. P.; SOUZA, J. R.; BLOCH JUNIOR, C. Ca(II)- γ -Thionin Complex: Interaction Studies by Differential Pulse Voltammetry and MALDI-TOF/MS. **Protein and Peptide Letters**, Hilversum, v. 9, n. 1, p. 45-52, 2002.
- DE CASTRO, C. S. P.; SOUZA, J. R.; BLOCH JUNIOR, C. The Binding of Zinc (II) to Mung Bean Nuclease. A Voltammetric Study. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Amsterdam, v. 94, n. 04, p. 365-371, 2003a.
- DE CASTRO, C. S. P.; SOUZA, J. R.; BLOCH JUNIOR, C. Investigations on the Binding of mercury ions to Albumins Employing Differential Pulse Voltammetry. **Protein and Peptide Letters**, Hilversum, v. 10, n. 2, p. 155-164, 2003b.
- DE CASTRO, C. S. P.; SOUZA DE, J. R.; BEMQUERER, M. P.; FILHO, W. P. O. A voltammetric study of the binding of copper(II) to peptide fragments of prion. **Polyhedron**, Amsterdam, v. 28, n. 18, p. 4131-4135, 2009.
- GAGGELLI, E.; KOZLOWSKI, H.; VALENSIN, D.; VALENSIN, G. Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, Prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis). **Chemical Reviews**, Washington, v. 106, n.4, p. 1995-2044, 2006.
- LICINI, G., SCRIMIN, P.; Metal-ion-binding peptides: From catalysis to protein tagging. **Angewandte Chemie International Edition**, Chichester, v.42, n. 38, p. 4572-4575, 2003.
- LIU, A-C.; CHEN, D-C.; LIN, C-C; CHOU, H-H.; CHEN, C-H. Application of cysteine monolayers for electrochemical determination of sub-ppb copper(II). **Analytical Chemistry**, Washington, v.71, n.8, p.1549-1552, 1999.
- LIU, G.; BOCKING, T.; GOODING, J. J. Diazonium salts: Stable monolayers on gold electrodes for sensing applications. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Amsterdam, v. 600, n.2, p. 335-344, 2007.
- LOLAND, J. O.; SINGH, B. R. Copper contamination of soil and vegetation in coffee orchards after long-term use of Cu fungicides. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Amsterdam, v. 69, p. 203-211, 2004.
- MURPHY, J. B.; KIES, M. W. Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. **Biochemistry et Biophysical Acta**, Amsterdam, v. 45, p.382, 1960.
- SIGEL, H., MARTIN, R. B.; Coordinating properties of the amide bond. Stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands. **Chemical Reviews**, Washington, v. 82, n. 4, p. 385-426, 1982.
- YANG, W.; JARAMILLO, D.; GOODING, J. J.; HIBBERT, D. B.; ZHANG, R.; WILLET, G. D.; FISHER, K. J. Sub-ppb detection limits for copper ions with Gly-Gly-His modified electrodes. **Chemical Communication**, Londres, n.19, p.1982-1983, 2001a.
- YANG, W.; HIBBERT, D. B.; GOODING, J. J. Characterisation of gold electrodes modified with self-assembled monolayers of L-cysteine for the adsorptive stripping analysis of copper. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Amsterdam, v. 516, n.1-2, p 10-16, 2001b.

Circular Técnica, 86

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
 Endereço: Parque Estação Biológica (PqEB) - Avenida
 W5 Norte; Caixa Postal 02372 - Brasília, DF - Brasil;
 CEP: 70770-900
 Fone: (61) 3448-4700
 Fax: (61) 3340-3624
 E-mail: sac@cenargen.embrapa.br
 1ª edição
 Publicação *on line* (2009)

Ministério da
 Agricultura, Pecuária
 e Abastecimento



Comitê Local de Publicações

Presidente: Lúcio Brunale
Secretária-Executiva: Lígia Sardinha Fortes
Membros: José Roberto de Alencar Moreira, Diva Maria de Alencar Dusi, Regina Maria Dechechi G. Carneiro, Samuel Rezende Paiva e Jonny Everson Scherwinski Pereira.
Membros suplentes: João Batista Tavares da Silva e Margot Alves Nunes Dode.

Expediente

Revisão de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães
Normalização bibliográfica: Ana Flávia do Nascimento Dias
Tratamento das ilustrações: Cinthia Pereira da Silva
Editoração eletrônica: Cinthia Pereira da Silva