

Preparação de nanoestruturas metálicas associadas a um peptídeo para a construção de biossensor¹

Gabriela Cristina Mendonça Calisto ²
Marcelo Porto Bemquerer ^{3,4}

Resumo: As nanopartículas de ouro preparadas com peptídeos podem ser utilizadas como biossensores devido às suas prioridades físico-químicas estáveis, funcionalidade ajustável e boa biocompatibilidade. Íons metálicos como o Cu(II) são encontrados no solo e na água em níveis elevados, podendo acarretar alterações de fisiologia e bioquímica vegetal e animal, gerando impacto para o agronegócio. Adicionalmente, a utilização de fungicidas cúpricos e de nanoestruturas antimicrobianas contendo Cu(II) aumenta o risco de estresse biótico. Deste modo, é necessário um método analítico como um biossensor automontado sobre Au(O) para a detecção de Cu(II). O peptídeo escolhido como elemento de reconhecimento ao íon metálico Cu(II) tem a seguinte sequência de resíduos de aminoácido: H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂. As nanopartículas de ouro foram preparadas por meio de redução de sais de Au⁺ com citrato, caracterizadas em todas as fases em relação ao raio hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta em equipamento Zetasizer, que faz medidas de espalhamento dinâmico de luz.

Palavras-chave: Nanopartícula de ouro, peptídeo, biossensor, cobre (II).

Preparation of metallic nanostructures associated to a peptide for the construction of a biosensor

Abstract: Peptide-based gold nanoparticles are often used as biosensors because of their stable physical-chemical properties, tunable functionality and good biocompatibility. High levels of Cu(II) metal ions may be found in soil and water, which can cause changes in plant physiology and biochemistry, impacting agribusiness. In addition, cupric fungicides and Cu(II)-organic frameworks with antimicrobial effects can lead to a scenario of biotic stress. Thus, a biosensor-based analytical method is required for the detection of Cu(II) metal ion. The peptide chosen as the Cu(II) metal ion recognition element has the following amino acid residue sequence: H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂. The nanoparticles were obtained by using citrate as the reducing agent for Au⁺ species, characterized at all stages of synthesis for the average hydrodynamic radius, the polydispersity index and the zeta potential by dynamic light scattering in a Zetasizer equipment.

Keywords: Gold nanoparticle, peptide, biosensor, copper(II).

Introdução

As nanopartículas de ouro apresentam propriedades físico-químicas relevantes de tal modo que elas têm sido utilizadas em catálise, espectroscopia molecular e detecção de compostos (CHEN *et al.*, 2008). Quimicamente sintetizadas, são superiores aos corantes orgânicos

¹ O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil, em associação ao projeto de pesquisa intitulado "Metodologia técnico-científica analítica de obtenção de biossensores de peptídeos para aplicações em amostras de interesse na agricultura" (SEG 21.14.03.001.03.03.005), liderado por Marcelo Porto Bemquerer.

² Graduando em Licenciatura em Química – UFJF/Juiz de Fora. e-mail: gabikalisto@gmail.com

³ Pesquisador – Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora. e-mail: marcelo.bemquerer@embrapa.br

⁴ Orientador

possuindo intensidade de fluorescência elevada, biocompatibilidade, e caracterizadas por uma toxicidade celular baixa. Apesar do rendimento quântico baixo, elas podem ser funcionalizadas por diferentes ligantes e biomoléculas, como ácidos nucleicos, proteínas e peptídeos (YUBO et al, 2019). As nanopartículas de peptídeos são comumente sintetizadas devido à possibilidade no controle da variação de sequências de aminoácidos e na organização de diversas nanoestruturas moleculares. Os peptídeos são sinteticamente acessíveis e, tendo fácil manipulação, podem ser utilizados na fabricação de nanomateriais específicos.

O presente trabalho busca elaborar um método analítico referente aos biossensores ópticos. O biossensor tem por finalidade detectar íons metálicos, especificamente o Cu(II), por meio de um peptídeo que apresenta a sequência de resíduos de aminoácido H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂ com sítio de reconhecimento a este elemento. Algumas culturas são submetidas ao tratamento com fungicidas cúpricos e por meio do biossensor é possível a quantificação do Cu(II) em níveis que causem alterações bioquímicas vegetais, diminuindo a produtividade agrônômica e impactando o agronegócio (GURE *et al.*, 2018). Estruturas metálico-orgânicas (MOFs) contendo Cu(II) estão sendo desenvolvidas para o tratamento de mastite. O material antimicrobiano adere à pele do animal impedido a adesão de bactérias e liberando íons Cu(II) da superfície dos microrganismos (KATSNELSON, 2020). O uso deste MOF pode gerar uma contaminação de íon Cu(II) no leite.

O peptídeo utilizado como reconhecimento e ligação ao íon cúprico no biossensor possui o grupamento sulfidríla (resíduo de cisteína, C) que é o sítio de automontagem ao ouro, já a histidina (H) é o sítio de ancoragem ao Cu(II), pois, por ser um metal de transição mole, o íon metálico Cu(II) possui afinidade eletrônica por sítios nitrogenados (PEARSON, 1963).

Neste projeto nanopartículas de ouro foram sintetizadas por via aquosa utilizando-se o citrato como agente redutor e estabilizante e preparadas com o peptídeo por automontagem, que é um método extremamente versátil e de custo relativamente baixo se comparado a outras metodologias de síntese envolvendo nanoestruturas metálicas, podendo ser adaptado para produções em grande escala, ressaltando as nanopartículas de ouro, vastamente aplicadas.

Material e Métodos

A preparação das soluções coloidais de nanopartículas de ouro (AuNP), desenvolvida no Laboratório de Inovação em Nanobiotecnologia e Materiais Avançados para Pecuária-LINMAP da Embrapa Gado de Leite, seguiu o método de Turkevich e colaboradores com base em reações de oxi-redução, utilizando o citrato de sódio como agente redutor e estabilizante (TURKEVICH *et al.*, 1951).

Inicialmente, foi preparada uma solução de ácido cloroauríco na concentração de $2,9 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹. A partir desta solução estoque de ouro, retirou-se uma alíquota de 1,0 mL que foi transferida para um erlenmeyer de 125 mL contendo 100 mL de água ultrapura Milli-Q, que foi mantida sob aquecimento e agitação constante até a ebulição. Neste momento, aplicou-se 1,5 mL da solução estoque de citrato de sódio (C₆H₅Na₃O₇, MM: 258,1 g/mol) a 1% (p/v), correspondente a $3,9 \times 10^{-2}$ mol/L, sendo a [C₆H₅Na₃O₇] final de $5,7 \times 10^{-4}$ mol/L). Após alguns minutos, a solução adquiriu uma coloração avermelhada, indicando a formação das AuNPs. Posteriormente ao resfriamento da solução, esta foi submetida à diálise, onde se utilizou uma membrana com diâmetro médio de 34 mm, MWCO 3,5 kDa, durante dois dias, realizando-se a troca de água por três a quatro vezes. Subsequentemente, a solução

coloidal foi retirada da diálise e transferida para um erlenmeyer de 125 mL. Em seguida, aplicou-se um volume de 500 µL de solução estoque de H-CVNITKQHTVTTTT-NH₂ (MM= 1547 g/mol), para uma concentração final de 6,4 x 10⁻⁶ mol/L. A solução foi mantida sob agitação constante por aproximadamente 12 horas.

Resultados e Discussão

O potencial zeta (PZ), o índice de polidispersão (PDI) e o tamanho das nanoestruturas de ouro (raio hidrodinâmico) foram obtidos por espalhamento (DLS) a 25°C. Como mostrado na tabela 1, ocorre um aumento progressivo do raio hidrodinâmico das AuNPs funcionalizadas com peptídeo em relação às AuNPs com citrato. Este efeito é justificado pelo acoplamento dos peptídeos. As nanopartículas sintetizadas com citrato de sódio possuem estabilidade, pouca ou nenhuma agregação, apresentando o valor médio de carga superficial de -37,9 mV. O valor de PZ diminuiu devido à interação com o peptídeo, porém era esperado um valor de potencial zeta mais positivo devido à presença de cargas no grupo amino na cadeia lateral de lisina (K) e no grupamento histidina (H) da estrutura peptídica (YANG *et al.*, 2022). Os índices de polidispersividade são considerados aceitáveis, mostrando uma uniformidade na distribuição dos tamanhos, com valores de PDI de 0,3 a 0,4 (CASANOVA, 2010)

Tabela 1. Índice de polidispersão (PDI), raio hidrodinâmico e potencial zeta das nanopartículas de ouro. Um valor representativo de medição é mostrado juntamente com o seu PDI.

Nanopartículas	PDI	Potencial Zeta(mV)	Raio Hidrodinâmico
AuNP com peptídeo	0,4	-5,0	144,2
AuNP com citrato de sódio	0,3	-37,9	28,7

Conclusões

Concluiu-se que foi possível a síntese das nanoestruturas de ouro preparadas com peptídeos por meio de técnicas simples. Entretanto, ainda é necessária a utilização de outras abordagens com os fatores que favoreçam de forma efetiva a ligação direta entre o peptídeo e a AuNP. A otimização experimental da associação do peptídeo com as AuNP será conduzida por meio de variação de grandezas como o pH e a razão [Peptídeo]/[Citrato].

Referências

CASANOVA, M. C. R. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências, Universidade de São Paulo, 2010.

CHEN, H., KOU, X., YANG, Z., NI, W., WANG, J. Shape and size dependent refractive index sensitivity of gold nanoparticles. **Langmuir**, Washington n. 24, pp. 5233-5237, abril 2008.

GURE, A, CHANDRVANSHIL, B. S.; GODETO, T. W. Assessment of metals in roasted indigenous coffee varieties of Ethiopia. **Bulletin of Chemical Society of Ethiopia**, Addis Ababa, v. 32, n. 1, pp. 27-38, 2018.

KATSNELSON A. Building a healthy herd without antibiotics. **ACS Central Sciences**, Washington, v. 6, pp. 8-10, 2020.

PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 85, n. 12, pp. 3533-3539, 1963.