

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**UTILIZAÇÃO DA VOLTAMETRIA DE REDISSOLUÇÃO ANÓDICA  
PARA O ESTUDO DA INTERAÇÃO DE TRÊS FRAGMENTOS  
PEPTÍDICOS SINTÉTICOS DA PROTEÍNA *PRION* COM OS ÍONS  
COBRE(II)**

**WALDEMAR PACHECO DE OLIVEIRA FILHO**

Dissertação apresentada como requisito  
parcial à obtenção do título de Mestre.  
Curso de Pós-Graduação em Química,  
Laboratório de Química Analítica e Ambiental,  
Instituto de Química,  
Universidade de Brasília.

Orientadora: Dra. Clarissa Silva Pires de Castro

Co-orientador: Prof. Dr. Jurandir Rodrigues de Souza

BRASÍLIA

2006

Ao meu pai, mãe e irmã, que com incansável presença e amor, contribuíram para que este momento tenha se tornado realidade.

## **Agradecimentos**

Ao Senhor, pelo alimento diário, e por ter tornado possível a conclusão deste trabalho.

Á Dra. Clarissa Silva Pires de Castro, pela amizade, orientação presente e segura.

Ao Dr. Carlos Bloch Júnior, pelo auxílio em várias etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jurandir Rodrigues de Souza, pelo amparo e dissipação de dúvidas decorrentes durante o trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcello Porto Bemquerer, pelo apoio fundamental em vários experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Espectrometria de Massa, pela amizade e pelo excelente convívio.

Aos colegas do Laboratório de Química Analítica e Ambiental, pela ajuda e pelo companheirismo.

Á Fátima A. B. Barreto, pelo suporte em laboratório.

Aos membros do Laboratório de Pesquisa em Físico-Química de Proteínas, do Instituto de Biologia da UFMG, pelo rápido porém agradável convívio.

Aos professores do Instituto de Química, por terem contribuído de alguma forma para minha formação acadêmica.

Aos meus pais e à minha irmã, pelo incentivo diário.

Á CAPES, à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, à FAPEMIG e ao IQ/UnB, pelo suporte operacional e financeiro.

## RESUMO

O *prion* é uma proteína de superfície de membrana, presente no tecido nervoso da maioria dos mamíferos. É uma proteína de tamanho médio (250 resíduos de aminoácidos em sua estrutura primária) e que ainda possui sua função biológica indefinida, apesar de diversos estudos já realizados. O prion é responsável por um conjunto de doenças chamadas *Encefalopatias Espongiformes*, onde se incluem a Síndrome de *Creutzfeld-Jacob* e a *Encefalopatia Espongiforme Bovina (Mal da vaca Louca)*. Estas patologias podem estar relacionadas a eventos de mudança conformacional que ocorrem na proteína durante o transporte de íons cobre para o neurônio. Estudos realizados na última década comprovaram a existência de uma interação entre o prion e íons cobre(II), que ocorre em regiões definidas do prion: entre os resíduos de aminoácidos 60 e 91, e possivelmente entre os resíduos de aminoácidos 92 e 96 e 180 e 193. Diversas técnicas analíticas têm sido utilizadas para o estudo da interação cobre - prion (EPR, RMN, espectrometria de massa, espectroscopia CD-UV, Raman), no entanto ainda existe uma carência de dados e uma divergência de resultados no que se refere aos parâmetros quantitativos. Neste trabalho, utilizou-se a voltametria de redissolução anódica para estudar a interação do prion com os íons cobre (II). Inicialmente, fragmentos peptídicos, correspondentes aos sítios de ligação do cobre no prion (PHGGGWGQ: resíduos 60 a 91; GGGTH: resíduos 92 a 96; VNITKQHTVTTTT: resíduos 180 a 193), foram sintetizados pelo método Fmoc de fase sólida. Em seguida, realizou-se a clivagem dos peptídeos da resina e a remoção de seus grupos protetores com reagentes orgânicos. Os peptídeos foram posteriormente purificados utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa e padronizados por espectroscopia UV-Vis utilizando a Lei de Beer e os métodos de Edelhoch e Murphy & Kies. A espectrometria de massa foi utilizada para a identificação e verificação da pureza (determinação da massa molecular e seqüência) dos peptídeos. Para todos os peptídeos estudados, observou-se a formação de um complexo com os íons cobre(II). A estequiometria da reação de complexação do  $\text{Cu}^{2+}$  com os peptídeos foi de 1 mol de peptídeo para 1 mol de íon cobre(II), em todos os sistemas estudados, estando em concordância com a literatura. Duas metodologias foram utilizadas para o cálculo da constante de dissociação ( $K_d$ ) dos complexos: Lei da Ação das Massas ( $K_d = 4,371 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  - complexo  $\text{Cu}^{2+}$ -Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>;  $K_d = 4,334 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  - complexo  $\text{Cu}^{2+}$ -Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> e  $K_d = 5,240 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  - complexo  $\text{Cu}^{2+}$ -Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub>) e Titulação Amperométrica ( $K_d = 2,683 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  - complexo  $\text{Cu}^{2+}$ -Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>;  $K_d = 1,830 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  - complexo  $\text{Cu}^{2+}$ -Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> e  $K_d = 3,500 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$  - complexo  $\text{Cu}^{2+}$ -Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub>), Com base nestes resultados, foi proposto um mecanismo para explicar a participação dos íons cobre(II) nos eventos de mudança conformacional característicos das síndromes. Os íons cobre(II) que se ligam ao prion na região entre os resíduos 60 e 91 (complexo mais estável) teriam participação direta na mudança conformacional, enquanto que os íons cobre(II) que se ligam às outras regiões do prion (resíduos 92 a 96 e 180 a 193) atuariam no papel biológico da proteína, que consiste em transportar íons cobre até enzimas que previnem danos oxidativos nos neurônios.

## ABSTRACT

*Prion* is a protein of membrane surface, which is present in the majority of the mammals. It is a protein of average size (250 amino acid residues in its primary structure) that still has its biological function unclear, although many studies have been already done. Prion is responsible for a group of diseases called *Spongiforms Encefalopatias*, such as *Creutzfeld-Jacob Disease* and *Bovine Spongiform Encefalopatya (Mad Cow Disease)*. The occurrence of these diseases can be related to conformational changes that occur in the structure of the protein during the transport of copper ions to neurons. Many studies, which have been carried out in the last decade, demonstrated that there is an interaction between prion and copper(II) ions, that occurs at certain peptide fragments of prion: between 60 and 91 amino acids residues and possibly between 92 and 96 and 180 and 193 amino acids residues. Many analytical techniques have been used to study the interaction between copper and prion (EPR, RMN, mass spectrometry, CD-UV spectroscopy, Raman). However, the quantitative data obtained in the studies differ significantly and there is still many information about the interaction that remains unclear. In this work, the anodic stripping voltammetry was used to study the interaction between copper (II) ions and prion. Initially, peptide fragments, which correspond to copper binding sites at prion (PHGGGWGQ: 60 to 91 amino acid residues; GGGTH: 92 to 96 amino acid residues; VNITKQHTVTTTT: 180 to 193 amino acid residues), were synthesized by Fmoc-solid phase method. Then, the peptides were cleaved from the resin and its protecting groups removed with organic reagents. The peptides were then purified by reverse phase high performance liquid chromatography and their concentrations were determined by UV-Vis spectroscopy using the beer law, and Edelhoch and Murphy & Kies methods. Mass spectrometry was used to identify and characterize the peptides (molecular mass and amino acid sequence determination). The formation of a complex with copper(II) ions was observed for all the three studied peptides. The stoichiometry rate was found to be 1 mol of peptide to 1 mol of  $\text{Cu}^{2+}$  ion for all the three studied systems. These obtained values are in agreement with literature. Two methodologies were used to determine the dissociation constant ( $K_d$ ) of the complexes: Action Law Mass ( $K_d = 4.371 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1} - \text{Cu}^{2+}\text{-Ac-VNITKQHTVTTTT-NH}_2$  complex;  $K_d = 4.334 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1} - \text{Cu}^{2+}\text{-Ac-GGGTH-NH}_2$  complex and  $K_d = 5.240 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} - \text{Cu}^{2+}\text{-Ac-PHGGGWGQ-NH}_2$  complex) and Amperometric Titration ( $K_d = 2.683 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} - \text{Cu}^{2+}\text{-Ac-VNITKQHTVTTTT-NH}_2$  complex;  $K_d = 1.830 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} - \text{Cu}^{2+}\text{-Ac-GGGTH-NH}_2$  complex and  $K_d = 3.500 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1} - \text{Cu}^{2+}\text{-Ac-PHGGGWGQ-NH}_2$  complex). Based on these results, a mechanism was proposed to explain the involvement of copper(II) ions in the conformational change events that are observed in the occurrence of the *Spongiforms Encefalopatias*. The copper(II) ions, which bind to the fragment between 60 and 91 amino acid residues (more stable complex), would have direct participation in the conformational changes, while the copper(II) ions, which bind to the others fragments in the prion (92 to 96 and 180 to 193 amino acid residues) would act in the biological function of the protein, that is to transport the copper(II) ions to anti-oxidative enzymes in the neurons.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	X
<b>LISTA DE TABELAS</b>	XII
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	XIV
<b>I. Introdução</b>	1
<b>II. Objetivos do Trabalho</b>	2
<b>III. Revisão Bibliográfica</b>	3
<b>1. O cobre</b>	3
1.1 Características Gerais	3
1.2 Proteínas de cobre	3
<b>2. O prion</b>	10
2.1 Características Gerais	10
2.2 As “doenças do prion”	13
2.3 Interações prion – cobre	16
2.3.1 A interação nos sítios das octarepetições	16
2.3.2 As interações nos demais sítios de ligação no prion	25
<b>3. Voltametria</b>	33
3.1 Definição e características	33
3.2 Voltametria de Redissolução Anódica	41
3.3 O uso da Voltametria para o estudo qualitativo e quantitativo das proteínas	43
<b>IV. Experimental</b>	46
<b>1. Material</b>	46
1.1 Reagentes e solventes	46
1.2 Soluções	48
1.2.1 Solução utilizada na síntese dos peptídeos	48
1.2.2 Soluções utilizadas no teste de verificação de acoplamento/desproteção durante a síntese	48
1.2.3 Soluções utilizadas na clivagem e desproteção dos peptídeos	48
1.2.4 Soluções utilizadas na purificação dos peptídeos	49
1.2.5 Soluções utilizadas na caracterização e verificação da pureza dos peptídeos	49

1.2.6 Soluções utilizadas nas análises voltamétricas qualitativas e quantitativas dos sistemas peptídeos – Cu <sup>2+</sup>	49
1.3 Vidraria	49
1.4 Eletrodo	50
1.5 Instrumentação	50
1.5.1 Aparelhagem utilizada nos experimentos de clivagem e desproteção dos peptídeos	50
1.5.2 Aparelhagem utilizada nos experimentos de purificação dos peptídeos	50
1.5.3 Aparelhagem utilizada nos experimentos de caracterização e verificação da pureza dos peptídeos	51
1.5.4 Aparelhagem utilizada nos experimentos de padronização dos peptídeos	52
1.5.5 Aparelhagem utilizada nos experimentos de voltametria de redissolução anódica	52
<b>2. Metodologia</b>	<b>53</b>
2.1 Síntese dos peptídeos Ac-VNITKQHTVTTTT-NH <sub>2</sub> , Ac-GGGTH-NH <sub>2</sub> e Ac-PHGGGWGQ-NH <sub>2</sub>	53
2.2 Clivagem da resina e remoção dos grupos protetores dos peptídeos	56
2.3 Purificação dos peptídeos do prion	56
2.4 Caracterização e verificação da pureza dos peptídeos	58
2.5 Padronização dos peptídeos do prion	60
2.6 Estudo da interação dos peptídeos do prion com Cu <sup>2+</sup>	61
<b>V. Resultados e Discussão</b>	<b>64</b>
<b>1. Síntese dos peptídeos Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>, Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> e Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub></b>	<b>64</b>
<b>2. Clivagem da resina e remoção dos grupos protetores dos peptídeos</b>	<b>64</b>
<b>3. Purificação, caracterização e verificação da pureza dos peptídeos</b>	<b>65</b>
3.1 Ac-VNITKQHTVTTTT-NH <sub>2</sub>	65
3.2 Ac-GGGTH-NH <sub>2</sub>	69
3.3 Ac-PHGGGWGQ-NH <sub>2</sub>	75

<b>4. Padronização dos peptídeos do prion</b>	<b>80</b>
<b>5. Interação do cobre com os peptídeos do prion</b>	<b>82</b>
5.1 Sistema $\text{Cu}^{2+}$ - Ac-VNITKQHTVTTTT-NH <sub>2</sub>	82
5.2 Sistema $\text{Cu}^{2+}$ - Ac-GGGTH-NH <sub>2</sub>	90
5.3 Sistema $\text{Cu}^{2+}$ - Ac-PHGGGWGQ-NH <sub>2</sub>	96
5.4 Proposta do papel dos íons $\text{Cu}^{2+}$ no mecanismo das doenças do prion	103
<b>VI. Conclusão</b>	<b>106</b>
<b>VII. Referências Bibliográficas</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO 1 – Reagentes usados na síntese de peptídeos</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO 2 – Trabalhos publicados</b>	<b>119</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ATP – ADENOSINA TRIFOSFATO  
BSA – ALBUMINA SÉRICA BOVINA  
CD – DICROÍSMO CIRCULAR  
Da – DALTON  
DC – CORRENTE DIRETA  
DCT – CORRENTE DIRETA DE TESTE  
DIC – DIISOPROPILCARBODIIMIDA  
DIPEA – N,N - DIISOPROPILETILAMINA  
DME – ELETRODO GOTEJANTE DE MERCÚRIO  
DMF – DIMETILFORMAMIDA  
DPI – PULSO DIFERENCIAL IRREVERSÍVEL  
DPN – PULSO DIFERENCIAL NORMAL  
DPR – PULSO DIFERENCIAL REVERSÍVEL  
EDT - ETANODITIOL  
EPR – RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA  
ESI – IONIZAÇÃO POR SPRAY DE ELÉTRONS  
ESR – RESSONÂNCIA ELETRÔNICA DE SPIN  
FMOC - 9-FLUORENILMETOXCARBONIL  
G – GLICINA  
H – HISTIDINA  
HMDE – ELETRODO DE MERCÚRIO GOTA PENDENTE  
HOBt – 1-HIDROXIBENZOTRIAZOL  
HPLC – HIGH PERFORMANCE LIQUID CROMATOGRAPHY  
HSA – ALBUMINA SÉRICA HUMANA  
I – ISOLEUCINA  
K – LISINA  
K<sub>d</sub> – CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO  
MALDI – IONIZAÇÃO/DESSORÇÃO A LASER ASSISTIDA POR MATRIZ  
MS – ESPECTROMETRIA DE MASSA  
N – ASPARAGINA

P – PROLINA

P.E. – PONTO DE EQUIVALÊNCIA

PRPC – PRION NA ISOFORMA NORMAL

PRPSC – PRION NA ISOFORMA INFECCIOSA

Q – GLUTAMINA

RMN – RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

RP – FASE REVERSA

SMDE – ELETRODO DE MERCÚRIO DE GOTA ESTÁTICA

SQW – VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA

T – TREONINA

TBTU - O-(BENZOTRIAZOL-1-IL)-N,N,N,N- TETRAMETILURÔNIO

TETRAFLUOROBORATO

TFA – ÁCIDO TRIFLUOROACÉTICO

TIS - TRIISOPROPILSILANO

TOF – ANALISADOR POR DE TEMPO DE VÔO

TSE – ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME TRANSMISSÍVEL

V – VALINA

W – TRIPTOFANO

Y - TIROSINA

## LISTA DE TABELAS

1. Características de centros de cobre clássicos em proteínas _____	4
2. Algumas proteínas de cobre representativas _____	5
3. Correspondência de proteínas de ferro e de cobre _____	8
4. Métodos voltamétricos _____	35
5. Proteínas estudadas por técnicas voltamétricas _____	43
6. Reagentes e solventes _____	47
7. Programa de eluição/ RP-HPLC _____	58
8. Concentrações e volumes utilizados de solução padrão de cobre e de peptídeo nos experimentos de voltametria de redissolução anódica _____	62
9. Resultados obtidos na síntese dos peptídeos do prion _____	64
10. Resultados obtidos após a clivagem e desproteção dos peptídeos _____	65
11. Picos observados no espectro MS/MS do peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH <sub>2</sub> _____	68
12. Picos observados no espectro MS/MS do peptídeo Ac-GGGTH-NH <sub>2</sub> _____	74
13. Picos observados no espectro MS/MS do peptídeo Ac-PHGGGWGQ-NH <sub>2</sub> _____	80
14. Valores de absorvância determinados para os peptídeos Ac-VNITKQHTVTTTT-NH <sub>2</sub> e Ac-GGGTH-NH <sub>2</sub> _____	81
15. Constantes de dissociação obtidas através do método da Lei da ação das massas _____	86
16. Valores de K <sub>d</sub> obtidos através do método da Titulação amperométrica _____	87
17. Valores de K <sub>d</sub> _____	88
18. Valores de potencial padrão de redução para o sistema Cu – Ac-VNITKQHTVTTTT-NH <sub>2</sub> _____	89
19. Constantes de dissociação obtidas através do método da Lei da ação das massas _____	93
20. Valores de K <sub>d</sub> obtidos através do método da Titulação amperométrica _____	94
21. Valores de K <sub>d</sub> _____	94

22. Valores de potencial padrão de redução para o sistema Cu – Ac-GGGTH-NH <sub>2</sub> _____	96
23. Constantes de dissociação obtidas através do método da Lei da ação das massas _____	100
24. Valores de K <sub>d</sub> obtidos através do método da Titulação amperométrica _____	101
25. Valores de K <sub>d</sub> _____	101
26. Valores de potencial padrão de redução para o sistema Cu – Ac-PHGGGWGQ-NH <sub>2</sub> _____	103
27. Estruturas dos reagentes de acoplamento _____	114
28. Estruturas dos Fmoc-aminoácidos _____	116

## LISTA DE FIGURAS

1. Estrutura primária do Prpc _____	12
2. Modelos do Prpc e do Prpsc _____	13
3. Cérebro de animal contaminado com BSE _____	14
4. Espectros Raman referentes ao Prp [84-103] na ausência e na presença de $\text{Cu}^{2+}$ _____	17
5. Primeiro modelo do complexo $\text{Cu}^{2+}$ - prion, na região onde sabia-se que ligava o íon metálico _____	18
6. Espectro UV de Dicroísmo Circular (CD) do prion purificado de ratos na ausência e na presença de $\text{Cu}^{2+}$ _____	18
7. Modelo proposto por Viles e colaboradores _____	19
8. Esprctro UV-CD da região do prion entre os resíduos 58 e 91 na ausência de $\text{Cu}^{2+}$ e em adições sucessivas de equivalentes de $\text{CuSO}_4$ ____	20
9. Espectro CD do Ac-(PHGGGWGQ) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> após adição de equivalentes de $\text{Cu}^{2+}$ em pH 5.3, 6.2 e 6.3 _____	20
10. Estudo da variação do pH e o número de íons cobre (II) ligados Ac-(PHGGGWGQ) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> _____	22
11. Espectros de massa ESI-TOF do Prp (57-91) livre, na presença de $\text{CuSO}_4$ , de $\text{NiSO}_4$ e $\text{ZnSO}_4$ _____	22
12. Representação molecular do complexo $\text{Cu}^{2+}$ - PHGGGWGQ _____	23
13. Comparação dos arranjos 3D anterior e posterior à formação do complexo com $\text{Cu}^{2+}$ _____	24
14. Espectro de absorção no visível em Dicroísmo Circular para Ac-PHGGGWGQ-NH <sub>2</sub> na presença de $\text{Cu}^{2+}$ _____	24
15. Espectros de massa ESI para Prp (121-231) e para Prp (23-231) em concentrações crescentes de $\text{Cu}^{2+}$ _____	26
16. Espectros EPR banda X para Prp (23-231) na presença de $\text{Cu}^{2+}$ em pH 3, 4, 5 e 6. Espectros sob as mesmas condições para o Prp (121-231) _____	27
17. Gráfico da relação $[\text{Cu}]/[\text{Prp}]$ em função dos equivalentes de $\text{Cu}^{2+}$ adicionado, baseado em dados de EPR _____	28
18. Esferas de coordenação propostas para $\text{Cu}^{2+}$ em diferentes regiões do prion _____	29

19. Modelos em 3D propostos para as regiões dos cinco primeiros Cu <sup>2+</sup> no prion _____	29
20. Espectro de massa ESI para Ac-VNITKQHTVTTTT-NH <sub>2</sub> _____	30
21. Espectro de massa ESI para Ac-VNITKQHTVTTTT-NH <sub>2</sub> na presença de quantidade estequiométrica de CuSO <sub>4</sub> _____	31
22. Possível mecanismo de envolvimento dos íons Cu <sup>2+</sup> com a mudança conformacional responsável pelo aparecimento do Prpsc _____	32
23. Equipamentos básicos de polarografia _____	33
24. Sinal de excitação da polarografia clássica DC: varredura linear _____	34
25. Polarograma característico da técnica DC _____	34
26. Sinal de excitação da Voltametria de Pulso Normal: Pulso normal _____	36
27. Voltamograma característico da Voltametria de Pulso Normal _____	36
28. Sinal de excitação da Voltametria de Pulso Diferencial: Pulso diferencial _____	37
29. Voltamograma característico da Voltametria de Pulso Diferencial _____	37
30. Sinal de excitação da Voltametria de Ondas Quadradas: Ondas Quadradas _____	38
31. Voltamograma característico da Voltametria de Ondas Quadradas _____	38
32. Sinal de excitação da Voltametria cíclica: Onda triangular _____	39
33. Voltamograma característico da Voltametria Cíclica _____	39
34. Etapas em Voltametria de Redissolução Anódica _____	42
35. Estratégia geral de síntese de peptídeos em fase sólida _____	54
36. Cromatograma obtido para Ac-VNITKQHTVTTTT-NH <sub>2</sub> _____	66
37. Espectro de massa ESI-MS (Q-TOF) para a fração cromatográfica correspondente ao peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH <sub>2</sub> _____	67
38. Espectro ESI-MS/MS para a fração cromatográfica correspondente ao peptídeo Ac-VNITHQHTVTTTT-NH <sub>2</sub> _____	68
39. Cromatograma obtido para o peptídeo Ac-GGGTH-NH <sub>2</sub> _____	70
40. Espectro de massa MALDI-TOF/TOF para fração A - que continha o peptídeo Ac-GGGTH-NH <sub>2</sub> _____	71
41. Cromatograma de recromatografia em coluna analítica para a fração A - que continha o peptídeo Ac-GGGTH-NH <sub>2</sub> _____	72

42. Espectro MALDI-TOF/TOF para a fração B - que continha o peptídeo Ac-GGGTH-NH <sub>2</sub> _____	73
43. Espectro MALDI-TOF/TOF MS/MS para a fração B – que continha o peptídeo Ac-GGGTH-NH <sub>2</sub> _____	74
44. Cromatograma obtido para o peptídeo Ac-PHGGGWGQ-NH <sub>2</sub> _____	76
45. Espectro de massa MALDI-TOF/TOF para fração C - que continha o peptídeo Ac-PHGGGWGQ-NH <sub>2</sub> _____	77
46. Cromatograma de recromatografia em coluna analítica para a Fração C - que continha o Ac-PHGGGWGQ-NH <sub>2</sub> _____	77
47. Espectro MALDI-TOF/TOF para a fração D - que continha o peptídeo Ac-PHGGGWGQ-NH <sub>2</sub> _____	78
48. Espectro MALDI-TOF/TOF MS/MS para a fração D – que continha o peptídeo Ac-PHGGGWGQ-NH <sub>2</sub> _____	79
49. Voltamogramas para o Cu <sup>2+</sup> na ausência e na presença de Ac-VNITKQHTVTTTT-NH <sub>2</sub> em KNO <sub>3</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> _____	83
50. Curva de titulação amperométrica do Cu <sup>2+</sup> com o peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT- NH <sub>2</sub> _____	84
51. Voltamogramas para o Cu <sup>2+</sup> na ausência e na presença de Ac-GGGTH-NH <sub>2</sub> em KNO <sub>3</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> _____	90
52. Curva de titulação amperométrica do Cu <sup>2+</sup> com o peptídeo Ac-GGGTH- NH <sub>2</sub> _____	91
53. Voltamogramas para o Cu <sup>2+</sup> na ausência e na presença de Ac-PHGGGWGQ-NH <sub>2</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> _____	97
54. Curva de titulação amperométrica do Cu <sup>2+</sup> com o peptídeo Ac-PHGGGWGQ- NH <sub>2</sub> _____	98
55. Possível mecanismo de envolvimento dos íons cobre (II) com o evento de mudança conformacional do prion _____	105
56. Estrutura da piperidina _____	115
57. Estrutura da ninhidrina _____	115
58. Estrutura do grupo Fmoc _____	115

## I. INTRODUÇÃO

Dentre os elementos químicos conhecidos, somente treze são considerados essenciais para plantas e animais, sendo que quatro (Na, K, Mg e Ca) estão presentes nos organismos vivos de forma abundante e os outros nove (V, Cr, Mo, Mn, Fe, Co, Ni, Cu e Zn) estão presentes em pequenas quantidades e são denominados de elementos traços. Os diferentes papéis exercidos por estes elementos nos sistemas biológicos podem ser classificados como estruturais (onde o íon metálico ajuda a estabilizar a molécula) e funcionais (quando o íon metálico está envolvido na reatividade do sítio biológico) (1).

O cobre é um dos elementos de transição mais abundantes nos organismos vivos. Este íon metálico está presente em várias proteínas que estão envolvidas em diversos processos essenciais à vida, incluindo a respiração e o controle de espécies radicalares decorrentes da reatividade do oxigênio. A grande diversidade de estruturas e reatividades apresentadas por estas proteínas de cobre motivou inúmeros estudos bioinorgânicos, visando mimetizar aspectos espectroscópicos e magnéticos, além de suas características funcionais (2). O *prion* é uma proteína presente no tecido nervoso de mamíferos em geral, e que no homem apresenta 250 resíduos de aminoácidos em sua estrutura (3). Nos últimos anos, o interesse pelo *prion* aumentou bastante devido a seu envolvimento com síndromes denominadas encefalopatias espongiformes, onde incluem-se no grupo destas doenças, por exemplo, a *Síndrome de Creutzfeld-Jacob* (manifestada no homem) e a *Encefalopatia Espongiforme Bovina* (manifestada em bovinos), mais conhecida como *Doença da Vaca Louca*. Trabalhos recentes (4,18) têm sugerido que íons cobre(II) ligam-se a regiões específicas do *prion*, promovendo mudanças conformacionais na molécula, as quais estão diretamente relacionadas às respectivas síndromes. Porém, a descrição de todos os parâmetros qualitativos e quantitativos desta interação ainda é questionada e incerta, o que tem aberto um amplo debate no sentido de investigar quantitativamente as suas características, e com isto elucidar o envolvimento do  $\text{Cu}^{2+}$  na manifestação das encefalopatias espongiformes transmissíveis. Várias técnicas analíticas

têm sido utilizadas (4), em sua maioria, as espectroquímicas, para estudar o sistema cobre(II) -prion. No entanto, os resultados obtidos até o momento ainda não explicam definitivamente como ocorre a interação e qual seria sua relação com as patologias.

## II. OBJETIVOS DO TRABALHO

Este trabalho tem como objetivo principal estudar a interação dos íons cobre (II) com o *prion*, utilizando técnicas voltamétricas. Para a investigação de tal sistema, foram propostas as seguintes etapas:

**1) Sintetizar os peptídeos que representam os possíveis sítios de ligação do cobre no *prion*, pelo método Fmoc de fase sólida;**

- Sintetizar os peptídeos com as seguintes seqüências: Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>, Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub>, Ac-PQGGGGWGQ-NH<sub>2</sub> e Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub>, utilizando como suporte uma resina.
- Clivar (remover) os peptídeos do suporte polimérico e retirar grupos protetores provenientes da síntese.

**2) Purificar os peptídeos do prion utilizando a técnica da cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa;**

**3) Caracterizar os peptídeos do prion por espectrometria de massa (comprovação da pureza e da seqüência);**

**4) Padronizar as soluções dos peptídeos do prion por espectroscopia UV-Vis utilizando os métodos de Edelhoch (para peptídeos que contêm Triptofano) e de Murphy e Kies (para os que não contêm Triptofano);**

**5) Determinar os parâmetros quantitativos dos sistemas peptídeos do prion – Cu<sup>2+</sup> (K<sub>d</sub>, estequiometria, sítios de ligação) utilizando a técnica de Voltametria de Redissolução Anódica.**

### III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1. O cobre

### 1.1 Características gerais

O íon cobre(II) (5-6) é uma forma oxidada do elemento de transição do grupo 11, que contém um sub-nível *d* incompleto ( $d^9$ ), o que lhe confere a capacidade de participar de reações redox, além de formar compostos de coordenação com vários ligantes, que apresentam geralmente cor azul. O cobre(II) aceita facilmente um par de elétrons (ácido de Lewis) e é moderadamente abundante, sendo o vigésimo-quinto elemento mais abundante, em peso, na crosta terrestre. O cobre(II) exerce várias funções estruturais e bioquímicas, regulando alguns sistemas biológicos (5).

O íon cobre(II) é uma espécie essencial à vida e uma pessoa adulta tem no organismo cerca de 100 mg de Cu. É o terceiro elemento de transição em quantidade, sendo superado apenas pelo Fe (4 g) e pelo Zn (2 g). Embora em pequenas quantidades o cobre seja um elemento essencial, em quantidades maiores é tóxico. Cerca de 4 a 5 mg de Cu são necessários na dieta diária. 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* (5-6).

### 1.2 Proteínas de cobre

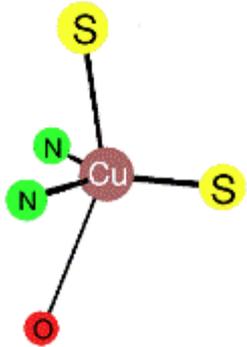
O cobre pode estar presente em uma metaloproteína (quando o metal faz parte da estrutura da proteína, irreversivelmente) ou como um complexo proteína-metal (quando o metal se liga à proteína de forma reversível) (6). Existem basicamente três tipos de centros de cobre em proteínas: os centros

“azuis” do cobre, os centros normais, chamados “não-azuis” e os dímeros de cobre (Tabela 1).

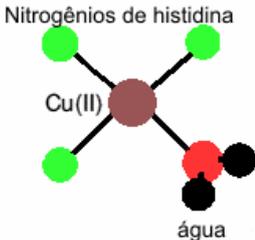
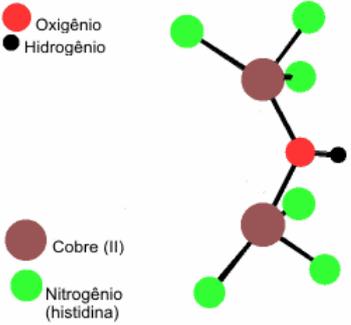
Em relação aos centros cobre-ligantes em uma proteína, estudos mais recentes têm sugerido combinações especiais, além dos modelos clássicos (Tabela 1), onde existem por exemplo trímeros combinando os tipos 2 e 3 (os dois centros de cobre na citocromo c oxidase). A Tabela 2 mostra algumas proteínas de cobre e o tipo de centro de cobre característico.

Para muitas proteínas contendo ferro, existem proteínas “paralelas” de cobre análogas com funções compatíveis (Tabela 3). A correspondência entre a reversibilidade da ligação do  $O_2$  com hemoglobina e hemocianina é um exemplo clássico: ambos metais estão envolvidos em processos protéicos de transferência eletrônica, na fotossíntese e respiração celular, em oxidases e oxigenases, e na desativação de intermediários tóxicos da redução de  $O_2$  (6).

**TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS DE CENTROS DE COBRE CLÁSSICOS EM PROTEÍNAS.**

Geometria de coordenação geral	Função, estrutura e característica
	<p>Tipo 1: centros “azuis” de cobre</p> <p>Função: transferência eletrônica reversível</p> <p>Estrutura: Fortemente distorcida, coordenação bipiramidal.</p> <p>Geralmente duas histidinas como ligantes, uma metionina, uma cisteína e uma molécula de água.</p>

**TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS DE CENTROS DE COBRE CLÁSSICOS EM PROTEÍNAS (continuação).**

Geometria de coordenação geral	Função, estrutura e característica
 <p>Nitrogênios de histidina</p> <p>Cu(II)</p> <p>água</p>	<p>Tipo 2: centros “não-azuis” de cobre</p> <p>Função: ativação de O<sub>2</sub> do estado Cu<sup>+</sup> em cooperação com coenzimas</p> <p>Estrutura: quadrado-planar, com fraca coordenação adicional (efeito Jan-Teller para Cu<sup>2+</sup>). Geralmente 3 histidinas e uma molécula de água como ligantes.</p>
 <p>● Oxigênio ● Hidrogênio</p> <p>● Cobre (II)</p> <p>● Nitrogênio (histidina)</p>	<p>Tipo 3: dímeros de cobre</p> <p>Função: Redução de O<sub>2</sub> do estado Cu<sup>+</sup>-Cu<sup>+</sup></p> <p>Estrutura: dímero em ponte, distância Cu-Cu de aproximadamente 360 pm. Geralmente histidinas como ligantes e um hidróxido em ponte.</p>

**Fonte:** KAIM, W. SCHWEDERSKI, B., "Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life", 1st ed. John Wiley & Sons, USA, 1994.

**TABELA 2 – ALGUMAS PROTEÍNAS DE COBRE REPRESENTATIVAS.**

Função e proteína típica	Massa molecular (kDa)	Quantidade e tipo de centros de cobre	Ocorrência
<p><b>Transferência de elétrons(Cu<sup>+</sup> ↔ Cu<sup>2+</sup> + e<sup>-</sup>)</b></p>			
Plastocianina	10,5	1 centro tipo 1	Participação na fotossíntese

**TABELA 2 – ALGUMAS PROTEÍNAS DE COBRE REPRESENTATIVAS  
(continuação).**

<b>Função e proteína típica</b>	<b>Massa molecular (kDa)</b>	<b>Quantidade e tipo de centros de cobre</b>	<b>Ocorrência</b>
Azurina	15	1 centro tipo 1	Participação na fotossíntese bacteriana
<b>Oxidases “azuis” (<math>O_2 \leftrightarrow 2 H_2O</math>)</b>			
Laccase	60-140 (trímero)	1 centro tipo 1	Oxidação de polifenóis e poliaminas em plantas
Ascorbato oxidase	150	2 centros tipo 1	Oxidação de ascorbato em plantas
Ceruloplasmina	130	2 centros tipo 1	Transporte e armazenamento de cobre; função antioxidante no plasma sanguíneo
<b>Oxidases “não-azuis” (<math>O_2 \leftrightarrow H_2O_2</math>)</b>			
Galactose oxidase	68	1 centro tipo 2	Oxidação alcoólica em fungos
Amino-oxidases	>70	1 centro tipo 2	Degradação de aminas para compostos carbonílicos
<b>Monooxigenases (<math>O_2 \rightarrow H_2O + \text{substrato-O}</math>)</b>			
Dopamina $\beta$ – monooxigenase	280	8 centros tipo 2	Oxidação de cadeia lateral da dopamina para norepinefrina no córtex da adrenal

**TABELA 2 – ALGUMAS PROTEÍNAS DE COBRE REPRESENTATIVAS  
(continuação).**

<b>Função e proteína típica</b>	<b>Massa molecular (kDa)</b>	<b>Quantidade e tipo de centros de cobre</b>	<b>Ocorrência</b>
Tirosinase	42	2 centros tipo 3	Orto-hidroxilação de fenóis e subsequente oxidação para o-quinonas na pele, polpa de frutas, etc
<b>Dioxigenases (<math>O_2 \rightarrow 2</math> substrato-O)</b>			
Quercetinaase	110	2 centros tipo 2	Clivagem oxidativa de quercetina em fungos
<b>Oxidases terminais (<math>O_2 \rightarrow 2 H_2O</math>)</b>			
Citocromo-c oxidase	>100	1 centro tipo 1 e 1 centro tipo 2	Ponto final da cadeia respiratória
<b>Degradação de superóxido (<math>2 O_2^{\bullet -} \rightarrow O_2 + O_2^{2-}</math>)</b>			
Cu.Zn-superóxido-dismutase	32	2 centros tipo 2	Desprotonação de $O_2^{\bullet -}$ em eritrócitos
<b>Transporte de oxigênio</b>			
Hemocianina	n x 50 (moluscos) nx75 (artrópodos)	2 centros tipo 3 por cada subunidade (n)	Transporte de $O_2$ em hemolinfa de moluscos e artrópodos

**TABELA 2 – ALGUMAS PROTEÍNAS DE COBRE REPRESENTATIVAS (continuação).**

Função e proteína típica	Massa molecular (kDa)	Quantidade e tipo de centros de cobre	Ocorrência
<b>Funções no ciclo do nitrogênio</b>			
Nitrito-redutase	108	3 centros tipo 1 e 3 centros tipo 2	Redução de $\text{NO}_2^-$
$\text{N}_2\text{O}$ redutase	140	2 centros tipo 1 e 3 centros tipo 3	Redução de $\text{N}_2\text{O}$ para $\text{N}_2$ no ciclo do nitrogênio

**Fonte:** KAIM, W. SCHWEDERSKI, B., "Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life", 1st ed. John Wiley & Sons, USA, 1994.

**TABELA 3 – CORRESPONDÊNCIA DE PROTEÍNAS DE FERRO E DE COBRE.**

Função	Proteína de Fe	Proteína de Cu
Transporte de $\text{O}_2$	Hemoglobina Hemocianina	Hemocianina
Oxigenação	Citocromo P-450 Metano monooxigenase Catecol dioxigenase	Tirosinase
Atividade de oxidase	Peroxidases	Amino oxidases Laccase
Transferência eletrônica	Citocromos	Proteínas azuis de Cu
Função antioxidativa	Peroxidases Dismutases	Superóxido-dismutase
Redução de $\text{NO}_2^-$	Nitrito-redutase contendo heme	Nitrito redutase contendo Cu

**Fonte:** KAIM, W. SCHWEDERSKI, B., "Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life", 1st ed. John Wiley & Sons, USA, 1994.

Entretanto, ferro e cobre também mostram algumas diferenças gerais em sua função fisiológica:

- Contrariamente ao ferro no grupo heme, o cobre biológico não ocorre em compostos coordenados com tetrapirrol. Particularmente o cobre liga-se ao nitrogênio imínico no anel imidazólico da histidina que pode formar, uma forte e cineticamente inerte ligação nos dois estados de oxidação relevantes, (+I) e (+II). O cobre pode se manter ligado sem a necessidade de formação de um anel especial, como ocorre no grupo heme com o ferro.
- Como regra geral, os potenciais redox para a transição  $\text{Cu}^+ \rightleftharpoons \text{Cu}^{2+}$  são maiores que aqueles para o par  $\text{Fe}^{2+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{3+}$ , considerando ligantes fisiológicos e não-fisiológicos. Proteínas de cobre como a ceruloplasmina (que transporta de 80 a 95 % do cobre plasmático) podem inclusive catalizar a oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  para  $\text{Fe}^{3+}$  (reatividade da ferroxidase) (6).
- Em soluções aquosas neutras, e em água do mar, a forma oxidada  $\text{Cu}^{2+}$  é mais estável que  $\text{Cu}^+$  quando forma compostos com ligantes haleto ou sulfetos; em contraste, a forma oxidada é menos estável no sistema  $\text{Fe}^{2+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{3+}$ . Em vista da produção biogênica de  $\text{O}_2$  durante a evolução primitiva, essa diferença também teve implicações geoquímicas em termos de aumento da precipitação de ferro e mobilização de cobre (7).
- Devido ao seu aparecimento e biodisponibilidade mais tardios na evolução, o cobre(II) é essencialmente encontrado no espaço extracelular (ligado a proteínas), enquanto que o ferro ocorre principalmente no interior das células (8).

Considerando que um humano não requer proteínas de cobre para seu transporte estequiométrico de oxigênio, a quantidade total de aproximadamente 100 mg no corpo de um adulto é relativamente pequena. Porém, a tolerância é também pequena para grandes desvios dessa quantidade, principalmente por causa da regra essencial deste elemento-traço na desativação de superóxido e na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria. Neste contexto, quatro patologias relacionadas com o cobre podem ser mencionadas:

- *A Doença de Wilson* envolve uma disfunção hereditária da capacidade de armazenamento de cobre no corpo relacionada a proteína ceruloplasmina. O

íon metálico é então acumulado no fígado e no cérebro, levando à demência, falência do fígado e à morte. O tratamento para esta doença requer a administração de ligantes quelatos específicos para cobre, como a D-penicilamina. Este ligante contém sítios de coordenação de S (tiolato), e N (amina) para garantir a especificidade para cobre(I) e cobre(II) respectivamente, e uma função carboxílica hidrofílica, que faz com que o complexo resultante seja excretável (6).

- A deficiência de cobre pode ocorrer, particularmente em recém-nascidos, quando o transporte e os mecanismos de armazenamento do metal envolvendo a albumina sérica, ceruloplasmina e metalotioneína se estabilizam somente alguns meses após o nascimento. Devido ao papel essencial do cobre na respiração (envolvendo a citocromo c oxidase), esta deficiência pode causar uma insuficiente utilização de oxigênio no cérebro (6).

- A *Síndrome de Menke* é baseada em uma disfunção hereditária do transporte de cobre intracelular. Os sintomas resultantes da deficiência de cobre em crianças incluem graves distúrbios no desenvolvimento físico e mental, acompanhado pela ocorrência de cabelo enroscado: uma terapia efetiva baseada na administração intravenosa de compostos de cobre é necessária nestes casos. A ocorrência de cabelos enroscados devido a desordens no metabolismo de cobre ilustra que este elemento participa na formação de proteínas estruturais (colágeno, queratina). O gene responsável pela Síndrome de Menke foi localizado no cromossomo X e já foi clonado, e seis sítios Cys-X<sub>2</sub>-Cys foram estabelecidos como possíveis sítios de ligação de cobre (9).

- Mutações em superóxido-dismutases dependentes de cobre são responsáveis pela desordem neurodegenerativa conhecida como *Doença de Lou Gehrig* ou esclerose lateral amiotrófica familiar (6).

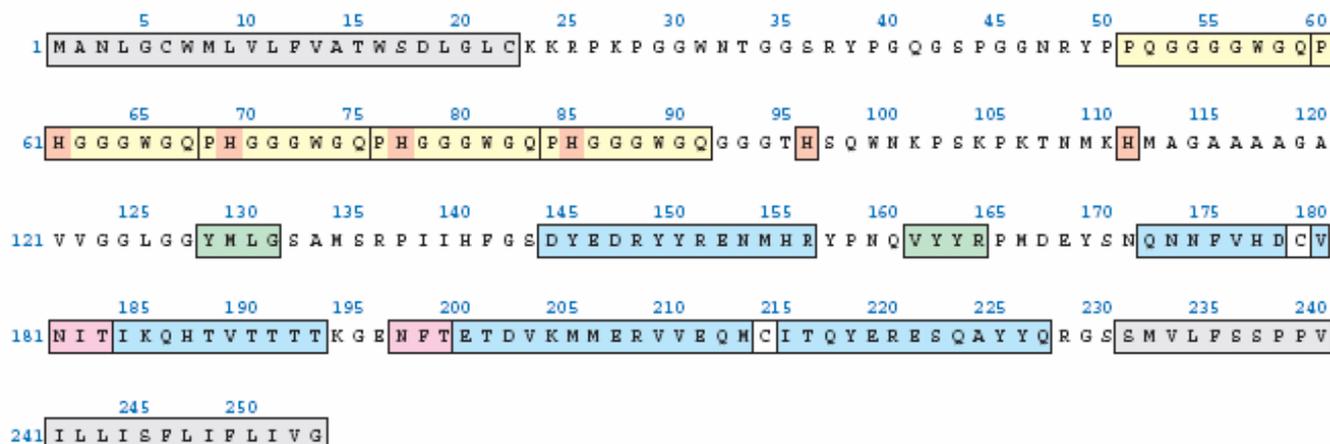
## **2. O prion**

### **2.1 Características gerais**

O *prion*, proteína presente no tecido nervoso de mamíferos em geral, possui função praticamente desconhecida em sua forma normal – chamada

*Prpc*. Experimentos com camundongos que eram deficientes do gene que codifica a Prpc, mostraram que estes animais viviam normalmente, porém com uma expectativa de vida de aproximadamente 70 semanas, sendo que os indivíduos normais apresentavam uma expectativa de vida média de 100 semanas (10-11). Além disso, camundongos deficientes do mesmo gene codificador de Prpc, apresentaram ritmo cardíaco alterado, mas eram clinicamente normais e aptos a reprodução (12).

A estrutura do prion (forma normal), composta por 250 resíduos de aminoácidos, é fortemente conservada em todas as espécies que apresentam o Prpc no tecido nervoso. Modificações pós-traducionais removem os primeiros 22 resíduos; e a proteína livre encontrada na superfície de membrana dos neurônios se estende, portanto do resíduo 23 até o 231. A estrutura secundária do Prpc foi elucidada por RMN multidimensional, onde três regiões de  $\alpha$ -hélice e 2 regiões de folha- $\beta$  foram observadas (13). Na estrutura primária do Prpc (Figura 1), observa-se um nonapeptídeo seguido de quatro octarepetições (peptídeo com oito resíduos – PHGGGWGQ - que se repete seguidamente quatro vezes) próximas à extremidade N-terminal, dois sítios de glicosilação e uma ponte dissulfeto. Além disso, a âncora de GPI (glicosilfosfatidilinositol) liga o Prpc à parte externa da superfície da membrana celular (14). Estudos recentes têm mostrado que a região de repetição da estrutura primária do Prpc (resíduos 60 a 91) interage com íons cobre(II) (4). Estes estudos desencadearam o uso de várias técnicas para investigar e conhecer melhor esta interação, além de propor uma possível relação com as encefalopatias espongiformes transmissíveis. Mais recentemente, outros trabalhos foram realizados para estudar as regiões entre os resíduos 92 e 96 e entre 180 e 193, consideradas também fortes sítios de ligação de íons cobre(II).



**Figura 1 – Estrutura primária do Prpc.**

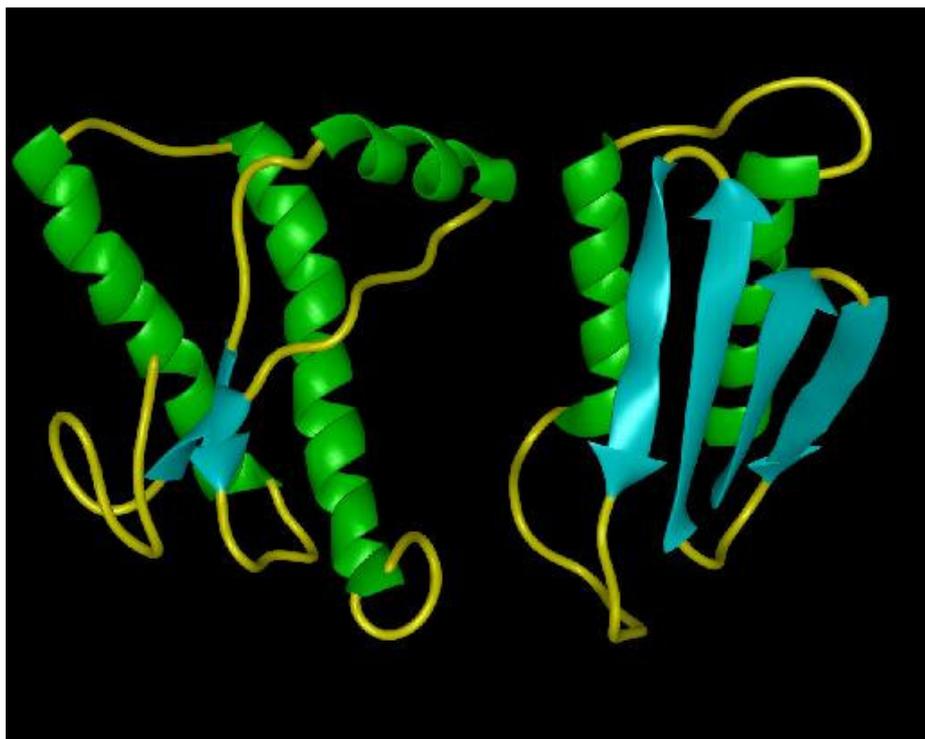
Em cinza, regiões de peptídeo-sinal removidas ainda na biossíntese. Em azul, regiões de  $\alpha$ -hélice; em verde, regiões de folha- $\beta$ ; em branco, resíduos de cisteína participantes de ponte de sulfeto; em amarelo, região de possível interação com íons metálicos. Em laranja, resíduos de histidina que estabelecem possíveis ligações com íons metálicos. [Retirado de LEHMANN, S. (2002) *Current Opinion in Chemical Biology* 6, 187]

As patologias ligadas ao Prpc são do grupo das encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSE's), doenças raras e neurodegenerativas, portanto, fatais. Podem se manifestar tanto no ser humano quanto na maioria dos mamíferos. Este grupo de doenças neurológicas inclui, entre outras, a *Síndrome de Creutzfeld-Jacob* (CJD), a *Insônia fatal*, a *Síndrome de Gerstmann-Straussler* (GSS), todas em humanos, assim como a *Encefalopatia Espongiforme Bovina* (BSE) em bovinos. O evento patológico está relacionado ao fato do Prpc causar um acúmulo protéico insolúvel no cérebro (14).

O Prpc é produto de um único gene, o *Pnrp*. O gene *Pnrp* codifica três glicofomas de Prpc: mono-glicosilada, di-glicosilada e não-glicosilada. Entretanto, nenhuma modificação de seqüência ou de diferença pós-translacional é observada quando da contaminação com qualquer patologia do grupo das TSE's. A isoforma patológica, conhecida como *Prpsc*, envolve somente uma alteração conformacional, na qual os domínios  $\alpha$ -hélice diminuem e os domínios folha- $\beta$  aumentam (13-14). Os modelos conformacionais do Prpc e do Prpsc podem ser observados na Figura 2.

Baseando-se nos modelos conformacionais, alguns especialistas conferem ao Prpsc similaridades com estruturas de toxinas que formam

agregados insolúveis. O Prpsc apresenta diferentemente do Prpc, um centro resistente a protease, conseqüência do processo de mudança conformacional (com detalhes ainda desconhecidos) do Prpc predominantemente  $\alpha$ -hélice para o Prpsc predominantemente folha- $\beta$  (15-16). Apesar da genética molecular, metabolismo, bioquímica e estrutura do Prpc serem bem elucidados, muito pouco é conhecido sobre o mecanismo patológico das “doenças do prion” (as TSE’s).



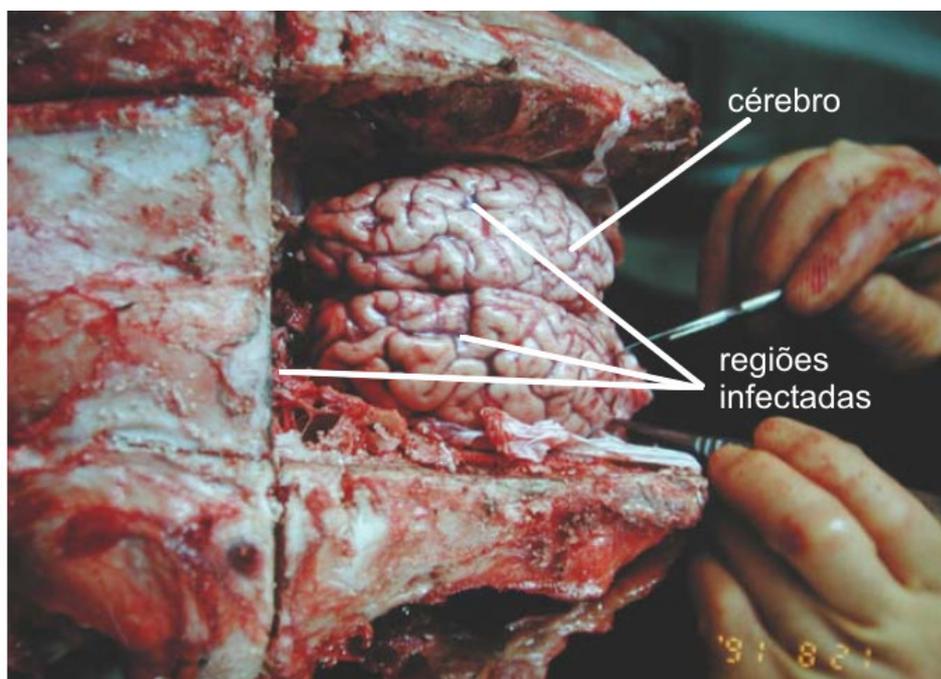
**Figura 2 – Modelos do Prpc (esquerda) e do Prpsc (direita).**

Destacadas em verde, os domínios  $\alpha$ -hélice. Em azul, domínios folha- $\beta$ . [Retirado de [www.cmpharm.ucsf.edu/cohen](http://www.cmpharm.ucsf.edu/cohen)]

## 2.2 As “doenças do prion”

Na maioria dos casos, as TSE’s não apresentam grandes anormalidades no cérebro infectado durante um bom tempo. Porém, pacientes infectados que sobreviveram por muitos anos, apresentaram variados graus de atrofiamento do cérebro, quando comparados com aqueles observados em outras doenças neurodegenerativas. Os eventos microscópicos típicos de uma TSE são: desidratação dos neurônios da matéria cinzenta; perda neuronal

drástica e variado grau de acúmulo de agregados de Prpsc. A degeneração espongiiforme consiste de um agrupamento difuso ou centralizado, pequeno, de vários vacúolos arredondados, como se fossem bolhas, que podem tornar-se rígidos e secos. A perda neuronal ocorre por apoptose (morte programada da célula) e a disfunção do cérebro ocorre em seguida (14). A Figura 3 mostra um cérebro, em autópsia, de animal contaminado.



**Figura 3 – Cérebro de animal contaminado com BSE.** [Retirado de [niah.naro.affrc.go.jp](http://niah.naro.affrc.go.jp)]

Todas as TSE's conhecidas em animais e humanos levam ao acúmulo de agregados de Prpc anormal no sistema nervoso central, às vezes na forma de placas amilóides, semelhante às lesões causadas por outros processos neurodegenerativos, como a Doença de Alzheimer (14).

A origem e o mecanismo infeccioso das TSE's, principalmente no tocante à conversão conformacional do Prpc, ainda são motivos de controvérsia. Observa-se que a patologia pode ocorrer por simples perda de função do Prpc, por atividade tóxica do Prpsc, ou pela combinação desses dois fatores. Muitos estudos têm sido realizados para elucidar a natureza do agente infeccioso das TSE's, mas os mais recentes têm se concentrado em duas questões: a função real do Prpc (pois a perda da função poderia causar a mudança conformacional) e no mecanismo infeccioso das TSE's. Estas investigações passam pelo estudo de interações biológicas que o Prpc possui

com outros agentes (íons metálicos, por exemplo), que podem explicar como é originado o Prpsc, e também pela obtenção de detalhes de como o Prpsc, já presente no organismo, se replica, contaminando outros Prpc's (14).

Uma das TSE's mais conhecidas, a BSE, ou simplesmente *Doença da Vaca Louca*, recebeu a atenção geral da comunidade científica pela primeira vez em novembro de 1986 com o surgimento de uma nova forma de doença neurológica na Inglaterra. Em 1996, o governo britânico foi alertado por um comitê de cientistas de que uma nova variante da Síndrome de Creutzfeldt-Jakob (CJD) tinha sido identificada e encontrada no gado, sendo logo relacionada à BSE. Dois meses depois, o governo anunciou o novo surto da doença. Em um período de 60 dias, foram confirmados 160 mil casos no país. A transmissão da BSE para seres humanos através do consumo da carne é facilitada pelo fato do Prpsc apresentar resistência a variações drásticas de temperatura (cozimento, pasteurização, desidratação e congelamento). Os estudos epidemiológicos sugeriram que a origem da doença era a ração para gado preparada a partir das carcaças de outros animais ruminantes, e que os processos de fabricação da ração introduzidos em 1981-1982 poderiam ter sido uma causa adicional. A interpretação dos estudos levou a conclusão de que animais mortos portadores da BSE estavam sendo utilizados como alimento de outros animais, o que aponta para uma contaminação em larga escala, como foi realmente observado na Grã-Bretanha. Até outubro de 1996, a BSE foi encontrada em 10 países. Em Portugal, França, Irlanda e Suíça, a doença ocorreu em gado nativo. No Canadá, Dinamarca, Ilhas Malvinas, Alemanha, Itália e Oman, houveram casos que foram atribuídos à importação de gado da Inglaterra. Possivelmente, a BSE presente no gado teria causado alguns casos de CJD em humanos através do consumo da carne. Conseqüentemente, milhares de cabeças de gado foram sacrificadas na Europa entre 1988 e 1997 (17).

A doença também chegou a ser registrada nos Estados Unidos, no estado de Washington, em 2003, devido a uma vaca importada do Canadá. Este caso bloqueou o equivalente a bilhões de dólares em exportações de carne dos Estados Unidos e levantou dúvidas sobre a segurança dos alimentos no país. Mais recentemente, foram também registrados casos em junho de 2005 e em janeiro de 2006, no estado do Alabama, mas as autoridades

asseguraram que em nenhum dos casos, dentro dos EUA, os animais contaminados chegaram a entrar na cadeia de alimentação humana (18).

A importação de carne americana foi proibida no Japão desde o primeiro caso registrado em 2003; no entanto, foi revogada em dezembro de 2005, após intensa pressão de Washington (O Japão é o mercado mais lucrativo para a carne americana). Porém, menos de um mês após a revogação, o Ministério da Agricultura Japonês voltou a suspender as importações, devido aos novos casos diagnosticados nos EUA e a um carregamento de carne americana que violou as regras de segurança, porque continha material da espinha dorsal de animais, região com alto risco de conter a infecção (18).

## **2.3 Interações prion-cobre**

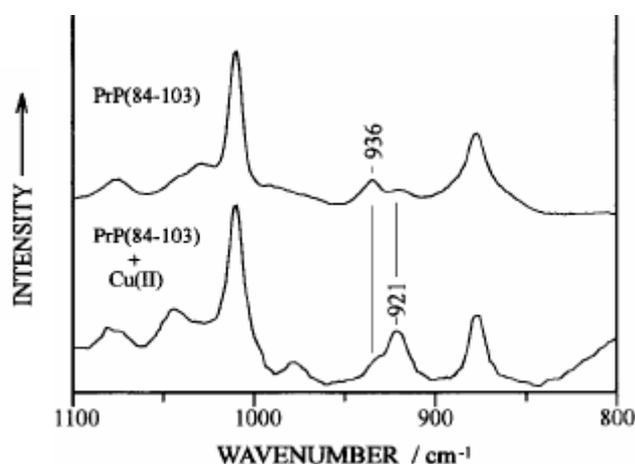
Trabalhos recentes têm mostrado que o Prpc liga-se a íons cobre(II), principalmente na região entre os resíduos 60 e 91, ou seja, na região das octarepetições (3-4). Desde então, diferentes técnicas (EPR, CD, Raman, espectrometria de massa, cristalografia de raios-X, RMN) têm sido utilizadas para investigar esta interação e tentar relacioná-la com as alterações na estrutura secundária da proteína, que causam as doenças do prion. Mas além da região das octarepetições, outros possíveis sítios também têm sido estudados (região entre os resíduos 92 e 96 e região entre os resíduos 180 e 193) (28,30).

### **2.3.1 A interação dos íons cobre(II) nos sítios das octarepetições do prion**

Hornshaw e colaboradores (19) apresentaram as primeiras evidências da existência da ligação  $\text{Cu}^{2+}$  - prion, utilizando a espectrometria de massa e os peptídeos sintéticos  $\text{Ac}-(\text{PHGGGWGQ})_3\text{-NH}_2$  e  $\text{Ac}-(\text{PHGGGWGQ})_4\text{-NH}_2$  (região das octarepetições no prion). Na presença de soluções de sais de cobre, Hornshaw e colaboradores verificaram o aparecimento de íons com massa

correspondente aos peptídeos ligados a  $\text{Cu}^{2+}$  no espectro de massa MALDI-TOF, que indicavam a ligação.

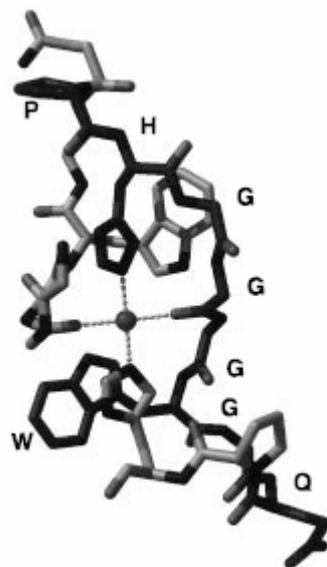
Miura e colaboradores (3), a partir de dados obtidos por espectroscopia Raman, sugeriram que a ligação do íon cobre(II) à região das octarepetições estabilizava, de certa forma, uma estrutura de  $\alpha$ -hélice. Desta forma, a região do resíduo 84 a 103, poderia ser promotora de formação de  $\alpha$ -hélice, o que de certa forma impediria a conversão conformacional responsável pelas patologias (Figura 4).



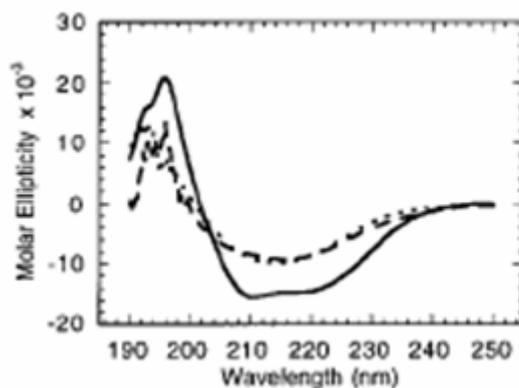
**Figura 4 – Espectros Raman referentes ao Prp [84-103] na ausência (acima) e na presença (abaixo) de  $\text{Cu}^{2+}$ .** Observa-se um aumento da banda em  $921\text{ cm}^{-1}$  relativa a um estiramento C-C característico de interações de  $\alpha$ -hélice. [Retirado de MIURA, HORI-I A., TAKEUCHI, H. (1996) FEBS Letters 396, 248].

Apesar dos estudos realizados, ainda era necessário obter informações mais detalhadas referentes à essa interação, como por exemplo as regiões onde efetivamente havia ligações com  $\text{Cu}^{2+}$ , a correta estequiometria (quantos  $\text{Cu}^{2+}$  para cada proteína) e o  $K_d$  destes complexos. Neste sentido, Stockel e colaboradores inicialmente propuseram um modelo para o complexo  $\text{Cu}^{2+}$ -prion (Figura 5), utilizando o prion purificado a partir do tecido nervoso de ratos. Além disso, lançaram uma possível função para o prion, que ainda não era cogitada: a de ser responsável pelo transporte de íons cobre(II) até enzimas cujas funções são de prevenir danos oxidativos. Stockel e colaboradores também introduziram técnicas de espectroscopia UV de Dicroísmo Circular (CD) e de Fluorescência no estudo da interação do prion com o cobre(II). Baseados nos

resultados obtidos com essas técnicas, também sugeriram que a ligação com o  $\text{Cu}^{2+}$  induzia à formação de agregados de folhas- $\beta$  (Figura 6), contrariamente ao que se pensava até então (20).



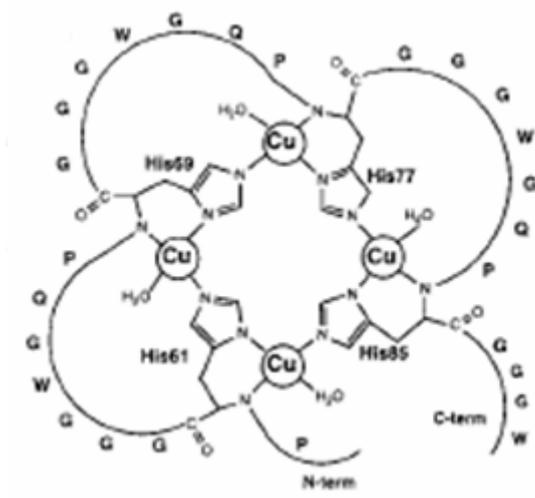
**Figura 5 – Primeiro modelo do complexo  $\text{Cu}^{2+}$  - prion, na região onde se sabia que ligava o íon metálico.** A geometria seria quadrado-planar, ligando-se a dois anéis imidazólicos de resíduos de histidina, de duas octarepetições seguidas. Os demais ligantes seriam grupos carbonila de resíduos de glicina. [Retirado de STOCKEL, J., SAFAR, J. WALLACE, A.C., COHEN, F.E., PRUSINER, S.B. (1998), *Biochemistry*, 37, 7185].



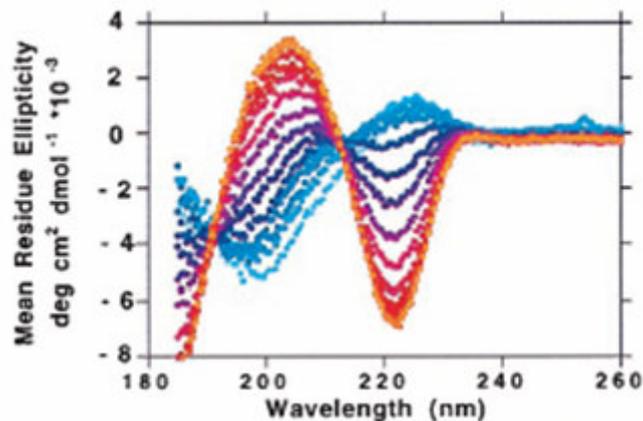
**Figura 6 – Espectro UV de Dicroísmo Circular (CD) do prion purificado de ratos na ausência (linha contínua) e na presença (linha tracejada) de  $\text{Cu}^{2+}$ .** As alterações observadas no espectro quando da presença de  $\text{Cu}^{2+}$  mostraram uma diminuição da contribuição de  $\alpha$ -hélices na estrutura secundária da proteína (fato observado no diferente formato da curva no espectro, formato este não característico de uma estrutura de  $\alpha$ -hélice), e um aumento de contribuição de folhas- $\beta$ . [Retirado de STOCKEL, J., SAFAR, J. WALLACE, A.C., COHEN, F.E., PRUSINER, S.B. (1998), *Biochemistry*, 37, 7185].

Tomando como base os resultados obtidos por Stockel e colaboradores (20), poder-se-ia imaginar uma estequiometria de apenas dois  $\text{Cu}^{2+}$  por proteína, pois são quatro octarepetições, cada duas ligando a um  $\text{Cu}^{2+}$ . Porém, Viles e colaboradores (21), utilizando peptídeos sintéticos, e as técnicas de Dicroísmo Circular (CD), Ressonância Magnética Nuclear de próton ( $^1\text{H}$  RMN) e Ressonância Eletrônica de Spin (ESR), propuseram uma estequiometria de 4  $\text{Cu}^{2+}$  por proteína, a partir de ligações cooperativas (Figura 7). Isto foi observado após indicação da geometria quadrado-planar sugerida pelos dados de ESR e  $^1\text{H}$  RMN.

Com os dados espectroscópicos, Viles e colaboradores não chegaram a nenhuma conclusão a respeito da influência do  $\text{Cu}^{2+}$  na estrutura secundária do prion. As alterações observadas nos espectros CD sinalizaram uma mudança conformacional, quando ocorria a complexação (Figura 8). No entanto, esta estrutura não seria definida como uma  $\alpha$ -hélice ou uma folha- $\beta$  típica. As mudanças conformacionais observadas nos espectros CD (UV e visível) foram atribuídas à formação de um *loop* simples (21).

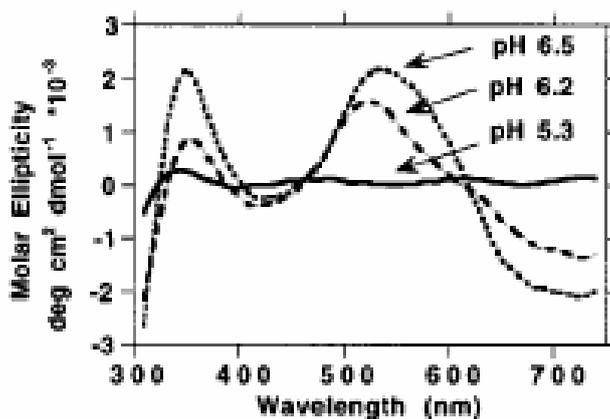


**Figura 7 – Modelo proposto por Viles e colaboradores.** Cada resíduo de histidina participaria da ligação com dois  $\text{Cu}^{2+}$ , e o quarto ligante seria uma molécula de água. Geometria seria realmente quadrado-planar. [Retirado de VILES, J.H., et al (1999) Proc. Natl. Acad. Science 96, 2042.



**Figura 8 – Espectro UV-CD da região do prion entre os resíduos 58 e 91 na ausência de  $\text{Cu}^{2+}$  e em adições sucessivas de equivalentes de  $\text{CuSO}_4$  (azul-claro→ laranja).** Claramente observa-se a formação de uma nova estrutura conformacional, porém não podendo classificá-la como  $\alpha$ -hélice ou folha- $\beta$ . Observa-se na figura a presença de um ponto isobéptico em aproximadamente 210 nm, indicando um provável equilíbrio de estruturas [Retirado de VILES, J.H., et al (1999) Proc. Natl. Acad. Science 96, 2042].

Outro parâmetro importante estudado por Viles e colaboradores foi a influência do pH na interação do  $\text{Cu}^{2+}$  com a região das octarepetições. Experimentos de espectroscopia CD no visível mostraram que a formação do complexo era extremamente sensível à variação de pH e poderia haver interação em um valor de pH mais baixo que o fisiológico. (Figura 9).



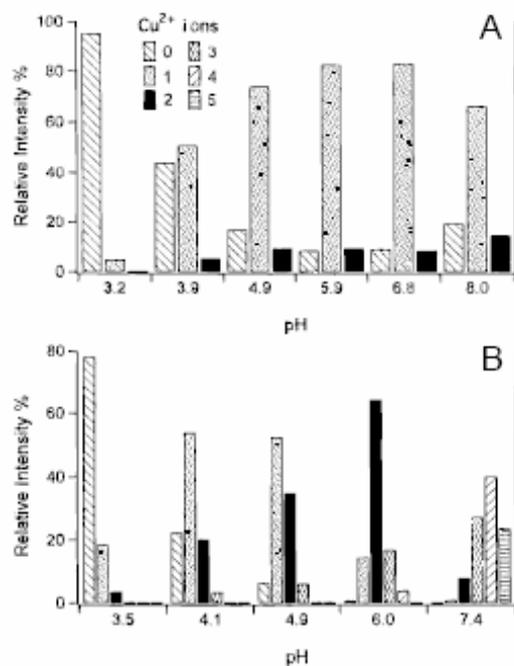
**Figura 9 – Espectro CD do  $\text{Ac}-(\text{PHGGGWGQ})_4\text{-NH}_2$  após adição de equivalentes de  $\text{Cu}^{2+}$  em pH 5.3, 6.2 e 6.3.** Observa-se claramente que a ligação não ocorre do mesmo modo em cada pH. [Retirado de VILES, J.H., et al (1999) Proc. Natl. Acad. Science 96, 2042].

Esta influência do pH foi melhor investigada por Whittal e colaboradores (22), utilizando a espectrometria de massa ESI-TOF e o peptídeo sintético Ac-(PHGGGWGQ)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>. Neste estudo, foi constatado que o pH, além de influenciar a interação propriamente dita, também poderia influenciar decisivamente a estequiometria da reação. Observou-se que em valores de pH mais próximos do fisiológico, em concentrações mais altas de Cu<sup>2+</sup>, eram registrados íons com massa correspondente ao peptídeo complexado com até 5 Cu<sup>2+</sup> (Figura 10).

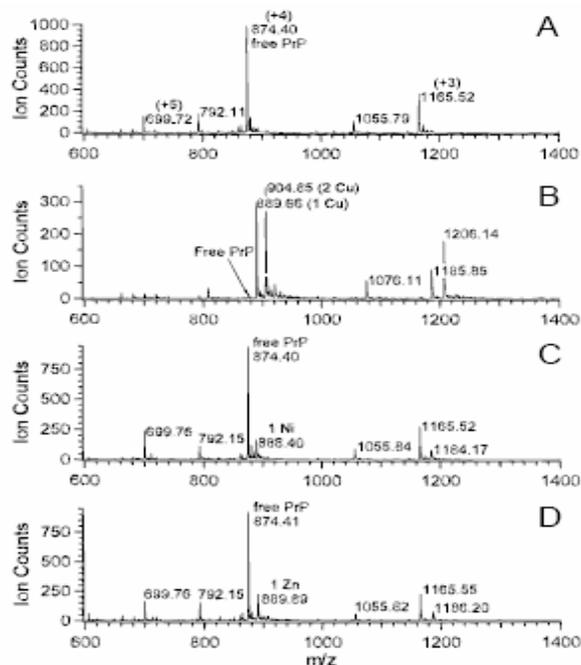
Whittal e colaboradores realizaram uma análise da extensão da mudança conformacional causada pelo pH, utilizando espectroscopia CD UV-Vis. Estudos realizados a pH 6,0 mostraram que a alteração conformacional provocada pela interação do Ac-(PHGGGWGQ)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> com íons Cu<sup>2+</sup>, observada em espectros CD era bem menor que em pH 7,4. Porém, utilizando espectrometria de massa ESI-TOF, constatou-se que ocorre ligação em pH 6,0, ao contrário do que se imaginava, porém com menor estequiometria.

Outro parâmetro importante estudado por Whittal e colaboradores foi a especificidade da ligação. Em experimentos de espectrometria de massa ESI-TOF (22), o comportamento do Ac-(PHGGGWGQ)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> na presença de CuSO<sub>4</sub>, NiSO<sub>4</sub> e ZnSO<sub>4</sub> (Figura 11) foi investigado e verificou-se que o peptídeo não se ligava a outros metais divalentes, ao contrário do que ocorreu com Cu<sup>2+</sup>.

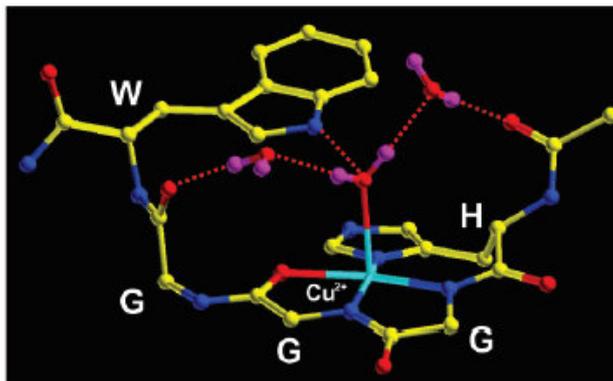
Burns e colaboradores (23) resolveram a estrutura do complexo Cu<sup>2+</sup>-PHGGGWGQ (um peptídeo) por cristalografia de raios-X, mostrando que possivelmente a esfera de coordenação seria uma pirâmide de base quadrada, ou seja, uma pentacoordenação (Figura 12). No mesmo estudo, Burns e colaboradores verificaram que o modelo proposto a partir da cristalografia de raios-X estava em concordância com os dados de EPR, que apontavam a participação dos primeiros resíduos de glicina do peptídeo na interação com o centro metálico (23).



**Figura 10 - Estudo da variação do pH e o número de íons cobre(II) ligados Ac-(PHGGWGQ)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>. (A) Adição de 10 μM de CuSO<sub>4</sub>. (B) Adição de 50 μM de CuSO<sub>4</sub>. Observou-se que em determinados valores de pH, o número de íons cobre(II) complexados aumenta [Retirado de WHITTAL, R.M., et al (2000) Protein Science, 9, 332].**



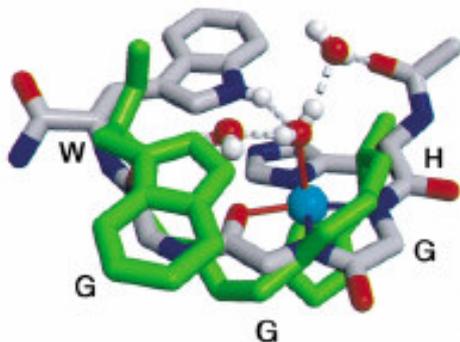
**Figura 11 – Espectros de massa ESI-TOF do Prp (57-91) livre (A), na presença de CuSO<sub>4</sub> (B), de NiSO<sub>4</sub> (C) e ZnSO<sub>4</sub> (D). Observou-se picos correspondentes a Cu<sup>2+</sup> ligados, e ausência de Prp (57-91) livre em (B), mas em (C) e (D) observou-se o Prp (57-91) livre [Retirado de WHITTAL, R.M., et al (2000) Protein Science, 9, 332].**



**Figura 12 – Representação molecular do complexo  $\text{Cu}^{2+}$  - PHGGGWGQ.** Observa-se que a esfera de coordenação é uma pirâmide de base quadrada, sendo que o ligante axial seria uma molécula de água [Retirado de BURNS, C.S., et al (2002) *Biochemistry*, 41, 3991].

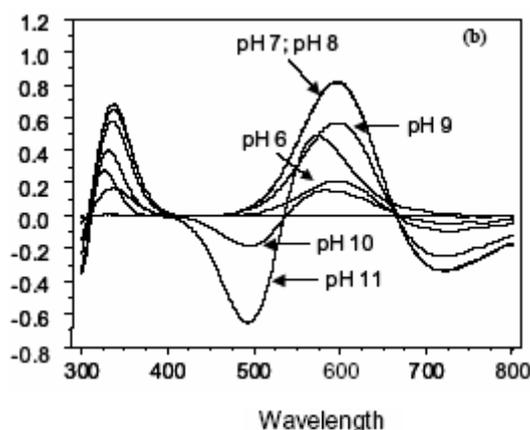
Viles e colaboradores, tomando como base os resultados de espectroscopia UV-CD, propuseram também uma característica de *cooperatividade* entre os sítios de ligação de  $\text{Cu}^{2+}$ , na região das octarepetições. A resposta espectroscópica de um peptídeo contendo as quatro octarepetições foi diferente de uma octarepetição isolada, tendo seu resultado multiplicado por quatro. Além disso, confirmou-se também a especificidade da ligação, não sendo observado nenhum outro íon metálico divalente ligando-se aos sítios (24).

Zahn (25) utilizou a Ressonância Magnética Nuclear para confirmar que o arranjo dos peptídeos das octarepetições que se ligavam ao cobre era diferente antes da formação do complexo (Figura 13). Este estudo reforça hipótese anterior, que postulava que as mudanças conformacionais observadas em espectros CD não eram oriundas de alterações de elementos de estrutura secundários no prion ( $\alpha$ -hélice para folha- $\beta$  ou vice-versa), mas sim da formação de um simples *loop* na região para que o complexo  $\text{Cu}^{2+}$ -prion possa ser formado.



**Figura 13 – Comparação dos arranjos 3D anterior e posterior à formação do complexo com  $\text{Cu}^{2+}$ .** Em verde, a cadeia principal e as cadeias laterais da seqüência HGGGW; as demais cores representam a resolução estrutural por cristalografia de raios-X mostrada anteriormente [Retirado de ZAHN, R. (2003) *Journal of Molecular Biology*, 334, 477].

A formação de complexos entre o cobre e peptídeos que simulam as octarepetições no prion foi estudada também em pH mais básico, e constatou-se que em valores de pH acima de oito já não ocorria a interação da mesma forma que ocorria em pH fisiológico. A figura 14 mostra espectros no visível, de Dicroísmo Circular, que apresentam o diferente comportamento do peptídeo da octarepetição em diferentes valores de pH na presença de  $\text{Cu}^{2+}$  (26).



**Figura 14 – Espectro de absorção no visível de Dicroísmo Circular para Ac-PHGGGWGQ- $\text{NH}_2$  na presença de  $\text{Cu}^{2+}$ .** Observou-se neste espectro que em valores de pH mais básicos a interação entre o peptídeo e o  $\text{Cu}^{2+}$  era mais fraca, devido a elipicidade negativa das bandas observadas para pH 10,0 e 11,0. [Retirado de PAPPALARDO, G., IMPELLIZZERI, G., CAMPAGNA, T. (2004) *Inorganica Chimica Acta*, 357, 185].

Poucos estudos foram feitos até o momento em termos de cálculo de  $K_d$  para os diferentes complexos formados com  $\text{Cu}^{2+}$  ao longo do prion. O único

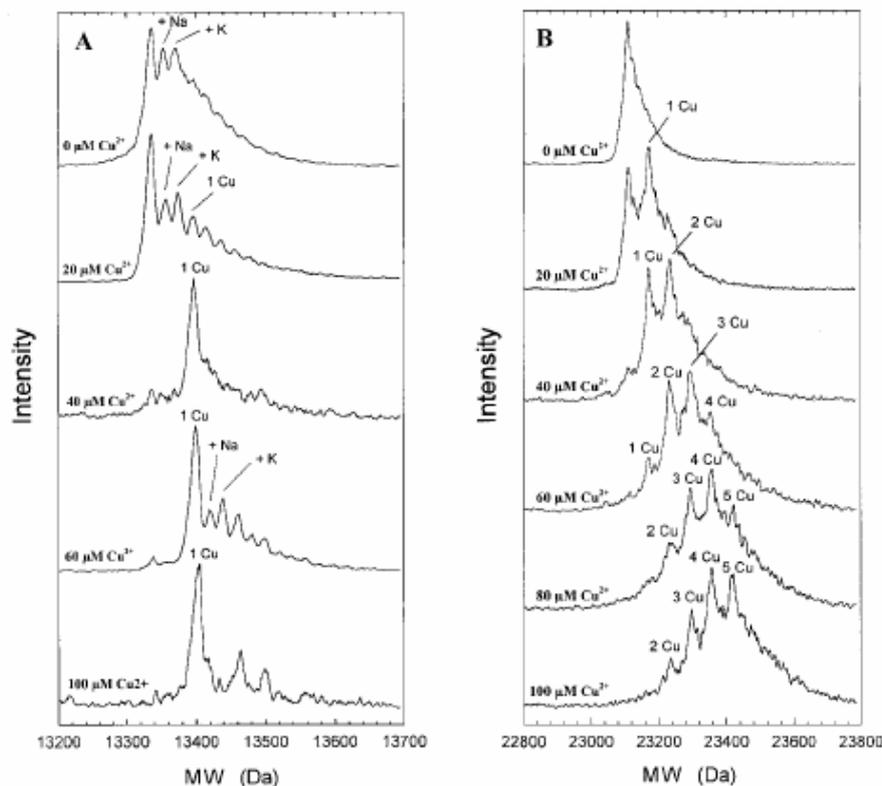
que se tem disponível na literatura é para o complexo Cu(II)-Ac-(PHGGGWGQ)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> – peptídeo contendo as quatro octarepetições em seqüência - , que em pH 6,0 tem o valor  $7,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , e em pH 7,4 possui o valor de  $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . Estes dados foram obtidos de espectros de massa ESI calculados pela equação abaixo (22):

$$K_d n = \frac{[\text{peptídeo} \cdot (n-1) \text{Cu}^{2+}][\text{Cu}^{2+}]}{[\text{peptídeo} \cdot n \text{Cu}^{2+}]}, \quad \text{onde:}$$

$n$  = número de íons cobre (II) ligados.

### 2.3.2 A interação dos íons cobre(II) nos demais sítios de ligação do prion

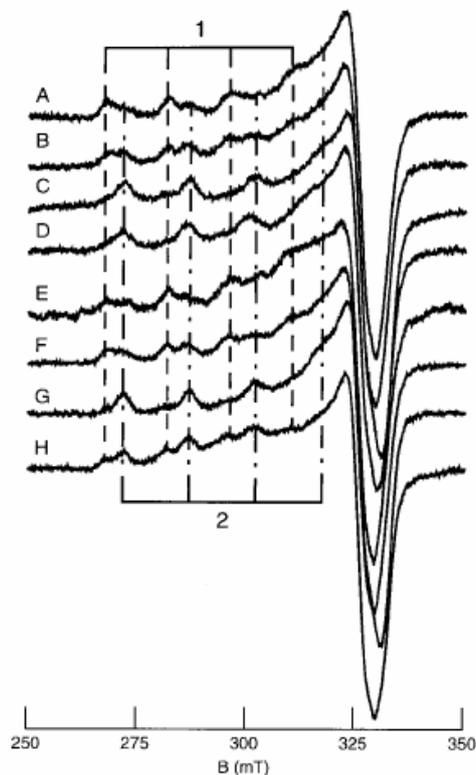
Os diversos estudos realizados para investigar a interação Cu<sup>2+</sup>-prion (19-22) apontaram para valores de estequiometria entre 2 e 5 íons cobre(II) por molécula de prion. No entanto, se até o momento apenas as quatro octarepetições haviam sido identificadas como os sítios de ligação de cobre no prion, onde estaria o quinto sítio de ligação do Cu<sup>2+</sup>? Kramer e colaboradores (27) realizaram um estudo da interação de diferentes peptídeos sintéticos com íons Cu<sup>2+</sup> por espectrometria de massa ESI-TOF, e verificaram a possibilidade da existência de um sítio de ligação de Cu<sup>2+</sup> entre os resíduos 121 e 231 do prion (obtido por métodos de engenharia genética), ou seja, em região mais próxima da extremidade C-terminal (Figura 15).



**Figura 15 – Espectros de massa ESI para Prp (121-231) (A) e para Prp (23-231) (B) em concentrações crescentes de  $\text{Cu}^{2+}$  (de cima para baixo).** Observou-se que em sua extensão total (23-231) apareciam picos correspondentes a até 5  $\text{Cu}^{2+}$  complexados, e em extensão correspondente aos resíduos 121 ao 231, houve o aparecimento de um pico correspondente a 1  $\text{Cu}^{2+}$  complexado. Este resultado indicou que poderia existir um sítio de ligação para o  $\text{Cu}^{2+}$  em região mais próxima ao C-terminal do prion. [Retirado de KRAMER, M.L., et al (2001) The Journal Of Biological Chemistry, 276, 16711].

A hipótese de existir um sítio de ligação para o  $\text{Cu}^{2+}$ , além do sítio das octarepetições, foi reforçada pelo estudo realizado por Cereghetti e colaboradores (28), utilizando a Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR). Observou-se neste trabalho, outro sítio de ligação de  $\text{Cu}^{2+}$ , localizado próximo da extremidade C-terminal (resíduos 121 a 231), que possivelmente teria uma esfera de coordenação diferente e estaria apto a ligar-se com íons cobre(II) em valores de pH mais ácidos. Estes resultados deram início a uma nova discussão, pois um complexo com  $\text{Cu}^{2+}$  mais próximo da extremidade C-terminal, com esfera de coordenação diferente dos complexos das regiões das octarepetições, poderia indicar que os íons cobre(II) estariam desempenhando diferentes funções para a mesma proteína. A figura 16 mostra espectros de

EPR obtidos para diferentes peptídeos, representando diferentes regiões do prion, na presença de  $\text{Cu}^{2+}$  e em diferentes valores de pH.



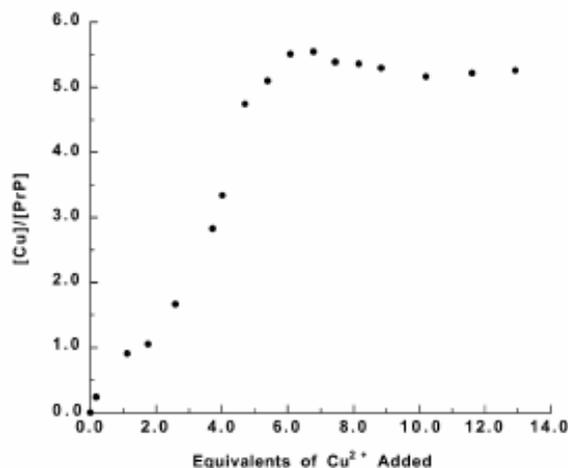
**Figura 16 – Espectros EPR banda X para Prp (23-231) na presença de  $\text{Cu}^{2+}$  em pH 3, 4, 5 e 6 (A a D). Espectros sob as mesmas condições para o Prp (121-231) (E a H).** Observou-se aqui que havia um complexo formado também na região próxima ao C-terminal, com esfera de coordenação diferente do complexo formado nas octarepetições (pois na região C-terminal - E a H - são observados sinais de complexação em regiões diferentes do espectro) [Retirado de CEREGHETTI, G.M. et al (2001) Biophysical Journal, 81, 516].

Qin e colaboradores (28) realizaram estudos de espectrometria de massa MALDI, com o objetivo de mapear os sítios de ligação do cobre no prion. Os resultados obtidos indicaram a ligação de cinco íons  $\text{Cu}^{2+}$  ao prion, entre os resíduos 49 e 105. No experimento, utilizou-se dietil-pirocarbonato (DEPC) que reage especificamente com anéis imidazólicos de histidina, e observou-se que esses íons de cobre(II) “protegiam” resíduos de histidina específicos, dentre os quais as histidinas das octarepetições e também a histidina localizada no resíduo 96.

Qin e colaboradores, (29) novamente utilizando a espectrometria de massa MALDI também realizaram estudos que evidenciaram a existência de sítios de ligação de  $\text{Cu}^{2+}$  fora da região das octarepetições (região do prion

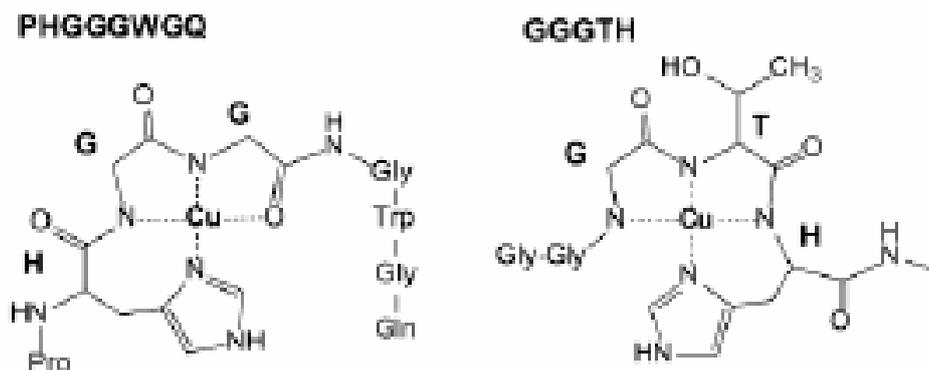
entre os resíduos 92 e 231), que eram também específicos, ou seja, não se ligavam a outros metais divalentes, como  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ .

Burns e colaboradores (30), utilizando a técnica de EPR, investigaram também a estequiometria da reação entre  $\text{Cu}^{2+}$  e o prion, e constataram, por meio do método de Job, que o número de íons cobre(II) ligados à proteína poderia ser maior que 5,0 em um valor de pH fisiológico (7,4) (Figura 17).

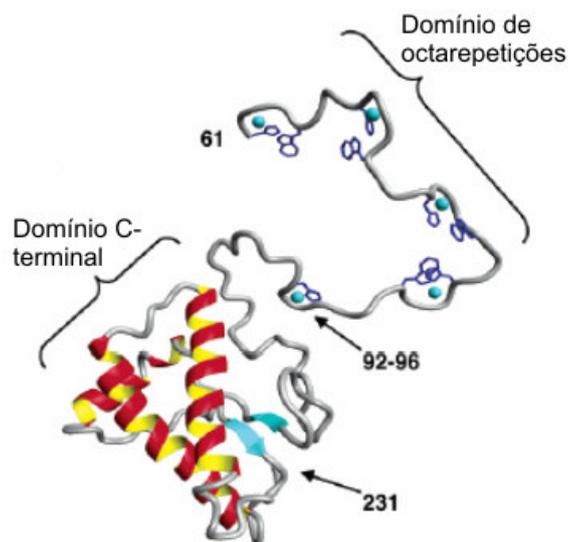


**Figura 17 – Gráfico da relação [Cu]/[Prp] em função dos equivalentes de  $\text{Cu}^{2+}$  adicionado, baseado em dados de EPR. [Retirado de BURNS, C.S., et al (2003) Biochemistry, 42, 6794].**

Burns e colaboradores propuseram ainda que o peptídeo de seqüência GGGTH (resíduo 92 a 96) seria a região de ligação no prion do quinto íon cobre (região adjacente às octarepetições). Foi proposta uma estequiometria de 1  $\text{Cu}^{2+}$  : 1 Ac-GGGTH- $\text{NH}_2$  para o complexo e uma esfera de coordenação diferente da proposta para o complexo formado com as octarepetições (Figura 18). A Figura 19 mostra um modelo espacial mais amplo dos sítios de ligação de íons cobre(II) no prion propostos por Burns e colaboradores.



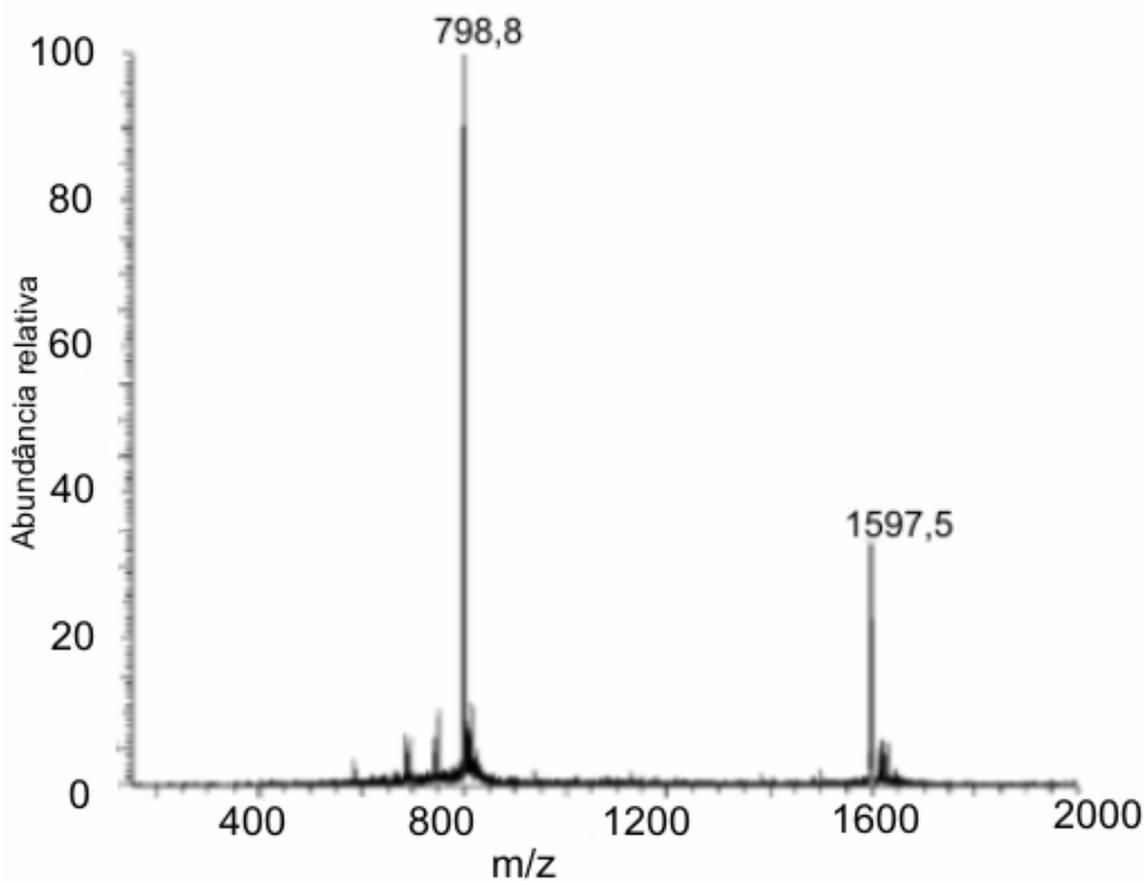
**Figura 18 – Esferas de coordenação propostas para  $\text{Cu}^{2+}$  em diferentes regiões do prion.** Observa-se que em GGGTH – Prp(92-96) a coordenação é diferente de PHGGGWGQ – Prp(58-91). Não se descarta que um dos dois primeiros resíduos de glicina presentes em GGGTH participe de uma interação de quinto ligante, através de uma molécula de água [Retirado de BURNS, C.S., et al (2003) *Biochemistry*, 42, 6794].



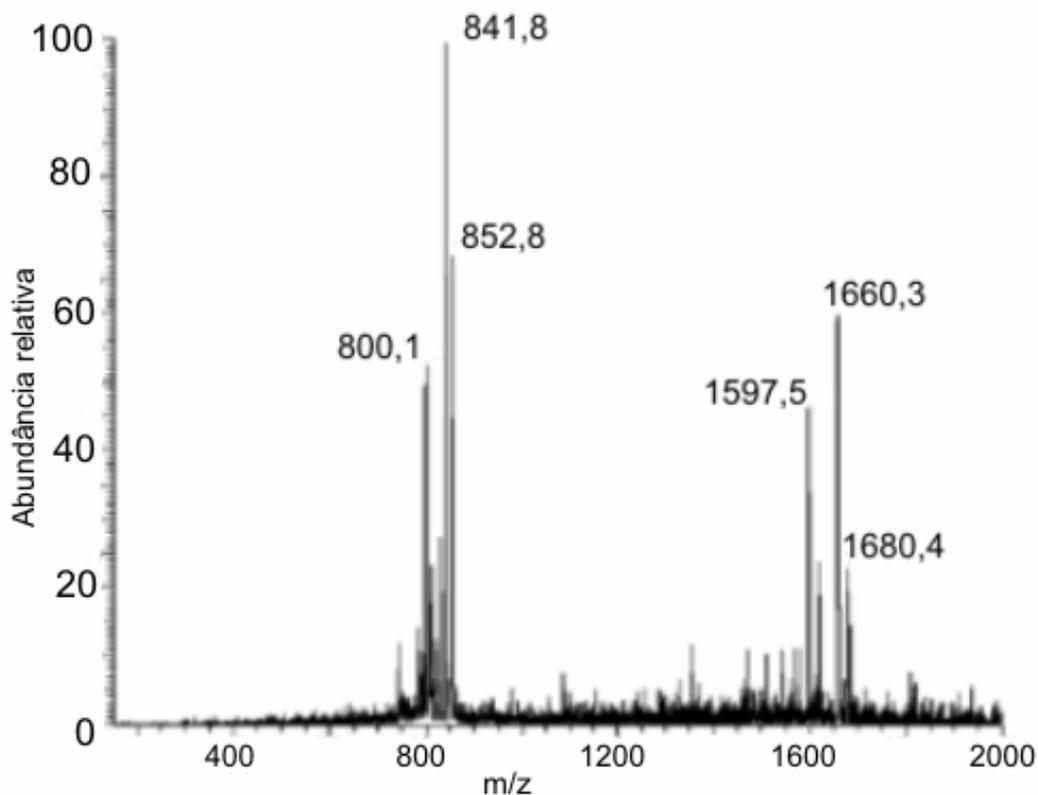
**Figura 19 – Modelos em 3D propostos para as regiões dos cinco primeiros  $\text{Cu}^{2+}$  no prion.** Observa-se 4 íons cobre(II) ligados nas regiões das octarepetições, e mais um íon cobre(II) entre os resíduos 92 e 96 [Retirado de BURNS, C.S., et al (2003) *Biochemistry*, 42, 6794].

Novos estudos postularam a hipótese de que havia um sítio-ligante de  $\text{Cu}^{2+}$  mais próximo à extremidade C-terminal do prion do que se imaginava, e corresponderia aos resíduos 180 a 193, de seqüência VNITKQHTVTTTT. Esta hipótese foi levantada após experimentos de espectrometria de massa ESI, onde a interação do peptídeo sintético Ac-VNITKQHTVTTTT- $\text{NH}_2$  foi investigada na presença e na ausência de  $\text{Cu}^{2+}$  (Figuras 20 e 21). O resultado

foi confirmado por dados de EPR e UV-CD, que foram muito semelhantes aos conhecidos para o Ac-(PHGGGWGQ)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>, ou seja, a região das octarepetições (31).



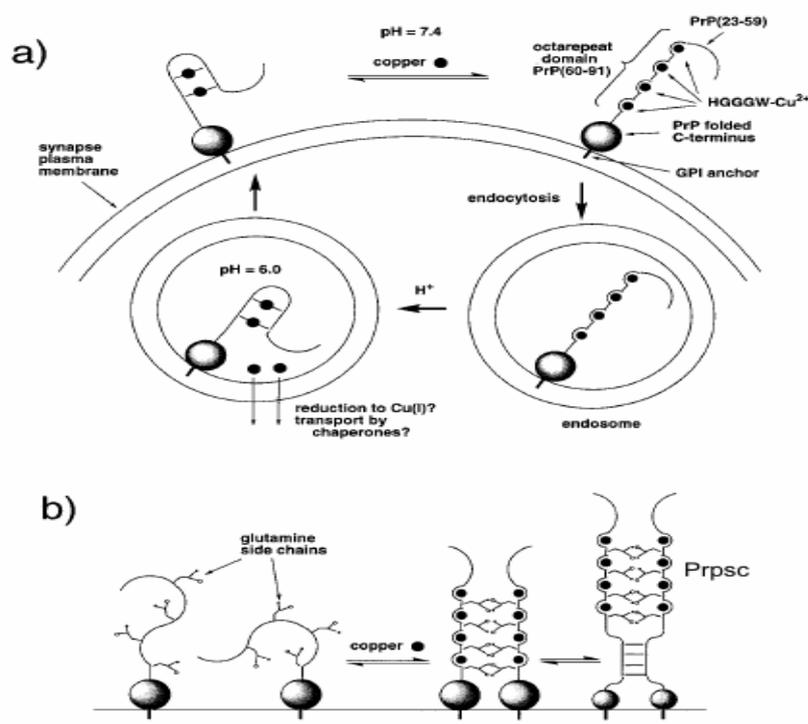
**Figura 20 – Espectro de massa ESI para Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>.** [Retirado de BROWN, D.R., et al (2004) *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98, 133].



**Figura 21 – Espectro de massa ESI para Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub> na presença de quantidade estequiométrica de CuSO<sub>4</sub>.** Observou-se o aparecimento de picos referentes à formação do complexo Cu-Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub> [Retirado de BROWN, D.R., et al (2004) *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98, 133].

Pode-se dizer então, que até o momento, o que se sabe ao certo a respeito da interação cobre-prion diz respeito à região das octarepetições, onde ligam-se quatro íons cobre(II) em pH fisiológico. No entanto, outros trabalhos sugerem a existência de mais dois sítios de ligação de Cu<sup>2+</sup> no prion, um em região próxima às octarepetições (entre os resíduos 92 e 96), e o outro mais próximo à extremidade C-terminal (resíduo 180 a 193). Apesar das evidências observadas nestes trabalhos, outros resultados ainda são necessários para a comprovação de tais sítios. Quanto à função do prion e o papel dos íons cobre(II), Burns e colaboradores (23) postularam uma hipótese (atualmente a mais aceita) para o mecanismo de ação da proteína. O prion atuaria como um transportador de íons cobre(II) para o interior do neurônio, e no meio extracelular (pH 7,4), facilmente ligar-se-ia a estes. No interior da célula, seria captado pelo *endossomo*, (pH 6,0), e então neste pH, algumas coordenações

se desfariam, ficando ligados apenas dois íons cobre(II). Ao sair do endossomo, o prion voltaria para a superfície da membrana plasmática do neurônio, e ao ficar mais flexível (com menos íons metálicos coordenados) suas cadeias interagiriam entre si e com íons cobre(II) ainda coordenados, principalmente na região entre os resíduos 90 e 120 (26-32). Desse modo, haveria uma reorganização estrutural, que acompanhada de eventos raros (não muito claros ainda), poderia favorecer a formação do Prpsc (o responsável pelas doenças do prion). Mas ainda não se sabe ao certo se os íons cobre(II) participam decisivamente destes eventos. Burns e colaboradores observaram que mesmo depois da formação do Prpsc ainda haviam quatro íons cobre(II) coordenados no prion. Este fato ficou sem explicação, pois imaginava-se que ao sair da célula, restariam apenas dois íons cobre(II) ligados ao prion. Porém, esta observação pode talvez ser explicada pela existência de dois sítios cobre – ligantes fora da região das octarepetições, fato não considerado pelo estudo de Burns e colaboradores (Figura 22).



**Figura 22 – Possível mecanismo de envolvimento dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  com a mudança conformacional responsável pelo aparecimento do Prpsc.** (a) Uma vez no citoplasma, o prion perderia dois íons cobre(II), em pH 6,0, no interior do endossomo, e retornaria para a superfície da membrana. (b) Na própria superfície da membrana, interações anormais dos íons cobre (II) com cadeias laterais livres de glutamina poderiam causar a mudança conformacional [Retirado de BURNS, C.S., et al (2002) *Biochemistry*, 41, 3991].

### 3. Voltametria

#### 3.1 Definição e características

A voltametria é uma técnica eletroquímica que estuda as relações entre a voltagem, a corrente e o tempo, durante a eletrólise da espécie química de interesse (analito). Nesta técnica, um potencial variável (sinal de excitação) é aplicado sobre uma célula eletroquímica e uma resposta de corrente, que é proporcional à concentração do analito, se desenvolve em função deste sinal de excitação (1).

O primeiro método voltamétrico a ser desenvolvido foi a polarografia clássica DC, onde o eletrodo de trabalho é um eletrodo gotejante de mercúrio. O diagrama da figura 23 mostra os equipamentos básicos utilizados nesta técnica.

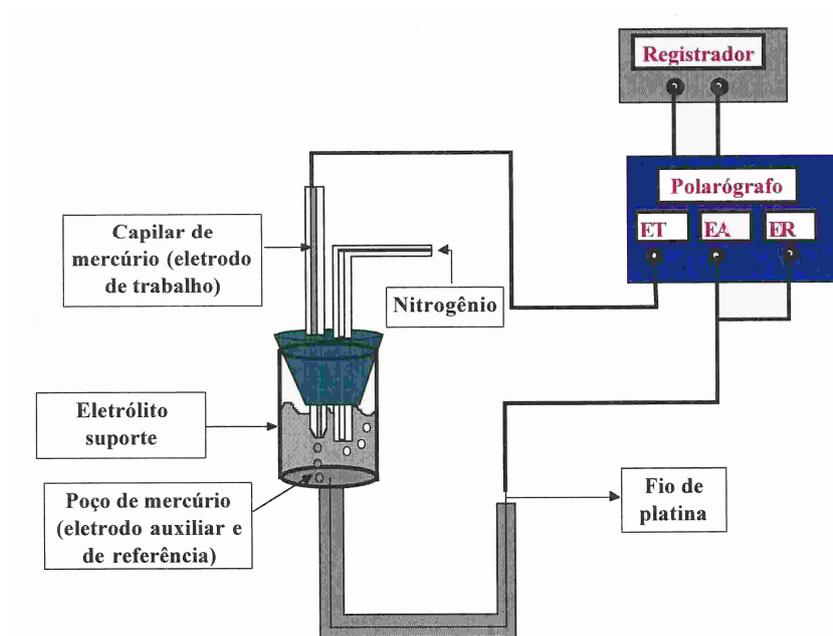
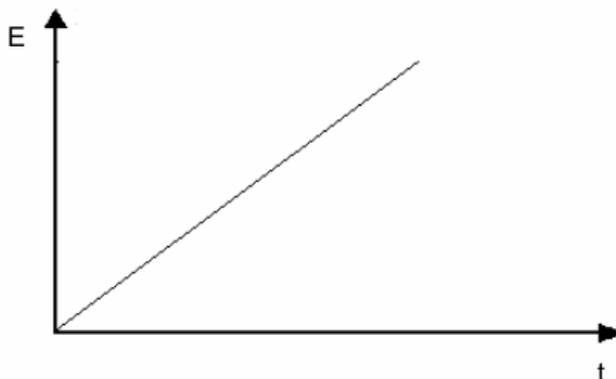


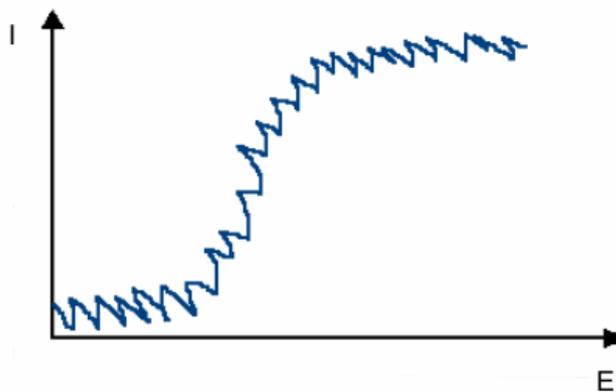
Figura 23 – Equipamentos básicos de polarografia.

A célula eletroquímica (figura 23) é composta por três eletrodos: **eletrodo de trabalho** (onde ocorre a eletrólise), **eletrodo de referência** (utilizado para determinar o potencial do eletrodo de trabalho) e o **eletrodo auxiliar** (contra eletrodo) imersos numa solução contendo o eletrólito suporte e

o analito (1). O sinal de excitação e o polarograma característicos para a técnica DC são mostrados nas figuras 24 e 25.



**Figura 24 – Sinal de excitação da polarografia clássica DC: varredura linear.**



**Figura 25 – Polarograma característico da técnica DC.**

No final da década de 50, a Polarografia clássica DC encontrou uma série de dificuldades que a tornaram uma técnica obsoleta para os trabalhos analíticos de rotina, frente aos métodos espectroscópicos. Entre essas dificuldades, podemos citar os baixos limites de detecção oferecidos por esta técnica e a difícil interpretação dos resultados obtidos. A causa destas dificuldades está associada à corrente capacitiva, corrente não-faradáica originada da dupla camada, que possui comportamento semelhante ao de um capacitor. Esta corrente limita a sensibilidade e a exatidão das determinações

quantitativas em baixas concentrações (da ordem de  $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>), onde a corrente capacitiva é usualmente maior que a faradáica, corrente originada da oxidação ou redução das espécies presentes na solução. Neste caso, a precisão das determinações torna-se dependente principalmente da exatidão com que a corrente capacitiva é estimada, compensada e minimizada no potencial onde a corrente de difusão é medida (1).

No final da década de 60, com várias modificações introduzidas nas técnicas voltamétricas clássicas e o desenvolvimento de amplificadores operacionais estáveis, rápidos e de baixo custo, a Voltametria se tornou uma das técnicas de análise mais sensíveis e mais utilizadas por químicos e bioquímicos para estudar os processos de oxidação e redução, os processos de adsorção nas superfícies e os mecanismos de transferência de elétrons nas superfícies de eletrodos quimicamente modificados (33).

As modificações introduzidas nas técnicas voltamétricas clássicas, todas com o objetivo de minimizar a corrente capacitiva e conseqüentemente melhorar os limites de detecção, deram origem aos diversos métodos voltamétricos atualmente conhecidos (tabela 4). Cada um destes métodos possui um sinal de excitação e um voltamograma característico (figuras 26 a 33) (1).

**TABELA 4 – MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS**

<b>Sinal de excitação</b>	<b>Método voltamétrico</b>
Varredura linear	Polarografia clássica DC
Pulso normal	Voltametria de pulso normal
Pulso diferencial	Voltametria de pulso diferencial
Onda quadrada	Voltametria de onda quadrada
Onda triangular	Voltametria cíclica

#### **Voltametria de Pulso Normal:**

Na voltametria de pulso normal, uma série de pulsos de amplitudes crescentes são superpostos a um potencial corrente contínua (c.c) constante (figura 26). A corrente é amostrada próximo ao final de cada pulso (16,7 ms).

Isto fornece tempo para que a corrente capacitiva diminua para um valor próximo de zero. A corrente faradáica também diminui, mas até o nível da corrente de difusão. O voltamograma resultante é semelhante a um voltamograma convencional c.c., exceto pela figura serrilhada deste voltamograma ser substituída por uma curva escalonada (figura 27) (1).

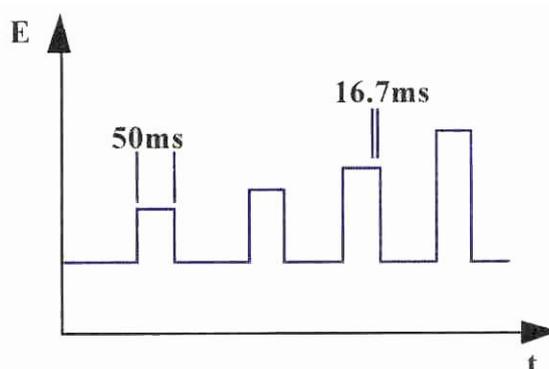


Figura 26 – Sinal de excitação da Voltametria de Pulso Normal: Pulso normal.

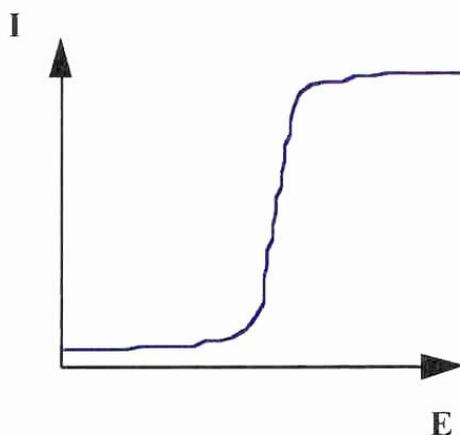


Figura 27 – Voltamograma característico da Voltametria de Pulso Normal.

### Voltametria de Pulso Diferencial:

Na voltametria de pulso diferencial, uma série de pulsos de amplitudes constantes (10-100 mV) são superpostos a um potencial c.c crescente (figura 28). São feitas duas amostragens de corrente durante o tempo de vida de cada gota. Uma é feita logo antes da aplicação do pulso e a outra nas proximidades do final do pulso (17 ms finais da duração do pulso) e exatamente antes da gota ser eliminada (figura 28). Para cada ciclo, o 1º. Valor de corrente é instrumentalmente subtraído do 2º. Esta diferença entre as correntes plotada

em função do potencial c.c aplicado será, portanto, uma curva com um pico (figura 29), cuja altura é proporcional à concentração do analito, exatamente como num polarograma derivado (1).

Os limites de detecção desta técnica podem ser até 1000 vezes menores que os da Polarografia Clássica D.C. O aumento desta sensibilidade é atribuído à diminuição da corrente capacitiva e um aumento da corrente faradáica.

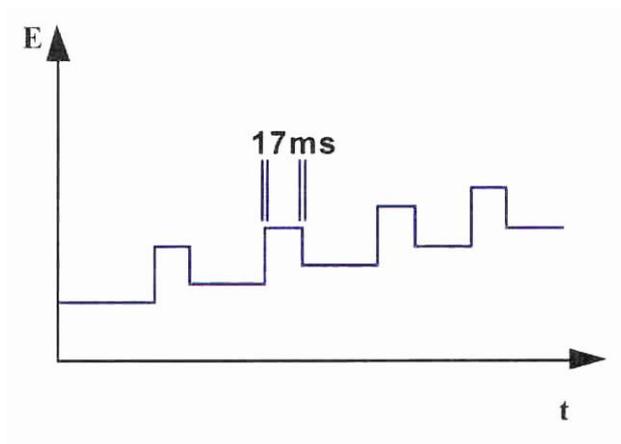


Figura 28 – Sinal de excitação da Voltametria de Pulso Diferencial: Pulso diferencial.

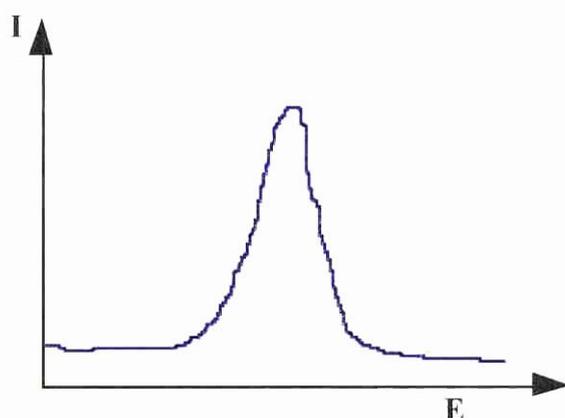


Figura 29 – Voltamograma característico da Voltametria de Pulso Diferencial.

### **Voltametria de Ondas Quadradas:**

A voltametria de ondas quadradas é um tipo de Voltametria de Pulso que oferece vantagens como rapidez e alta sensibilidade. Um voltamograma

completo é obtido em poucos segundos. A figura 30 mostra o sinal de excitação da SQW, o qual é obtido superpondo uma série de pulsos sobre uma escala de potencial. A corrente ( $\Delta i$ ) é a diferença entre a corrente observada no ponto 1 e a corrente observada no ponto 2 e é proporcional à concentração da espécie de interesse (analito) (figuras 29 e 30). Os limites de detecção desta técnica são da ordem de  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> (1).

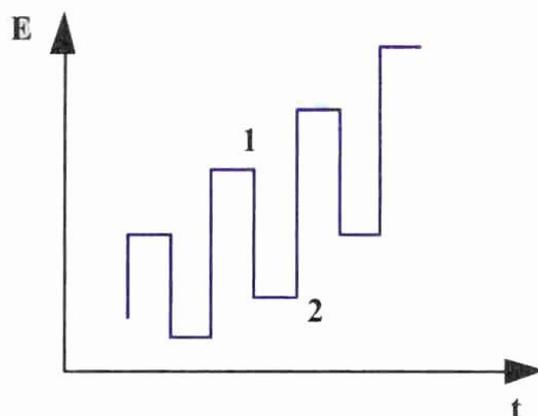


Figura 30 – Sinal de excitação da Voltametria de Ondas Quadradas: Ondas Quadradas.

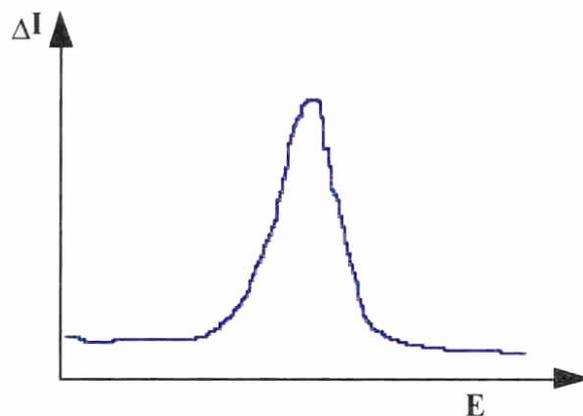


Figura 31 – Voltamograma característico da Voltametria de Ondas Quadradas.

### Voltametria Cíclica:

A voltametria cíclica é uma técnica que consiste na ciclização do potencial de um eletrodo estacionário pequeno imerso em uma solução sem agitação e na medição da corrente resultante sob condições de transferência

de massa controladas por difusão. O sinal de excitação é uma varredura linear de potencial, de forma triangular (figura 32), que varre o potencial do eletrodo de trabalho para trás e para frente entre dois valores denominados potenciais de inversão. O triângulo volta na mesma velocidade, e resulta em um voltamograma completo com formas de onda anódica (oxidação) e catódica (redução), como mostra a figura 33. Esta técnica não é indicada para uso em determinações quantitativas, e tem sido usada no estudo dos mecanismos e velocidades dos processos de oxidação-redução (1).

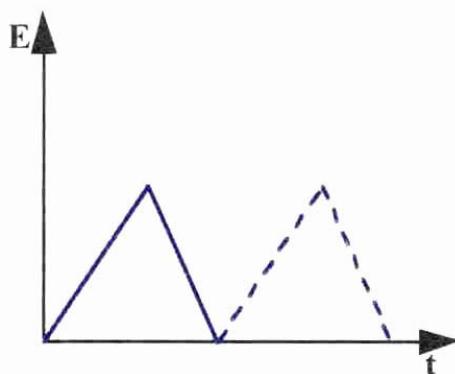


Figura 32 – Sinal de excitação da Voltametria cíclica: Onda triangular.

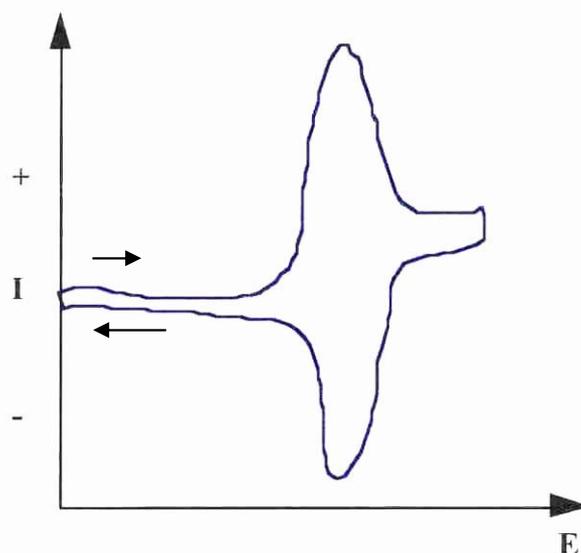


Figura 33 – Voltamograma característico da Voltametria Cíclica.

A voltametria apresenta diversas características, entre elas podemos citar:

- A corrente de difusão máxima (limite) é diretamente proporcional à concentração do analito ( $i = KC_0$ );
- As relações quantitativas entre corrente de difusão e concentração são bem conhecidas:

$$I = n F A D_0^{1/2} C_0 (n F v / \pi R T)^{1/2} \psi \quad (1)$$

$$I = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D_0^{1/2} n^{1/2} C_0 \quad (2);$$

Onde:

$n$  = número de mols de elétrons por mol de analito;

$F$  = constante de Faraday;

$A$  = superfície do eletrodo em  $\text{cm}^2$ ;

$D_0$  = coeficiente de difusão do analito, em  $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ;

$C_0$  = concentração do analito em  $\text{mol cm}^{-3}$ ;

$R$  = constante universal dos gases;

$T$  = temperatura, em Kelvin.

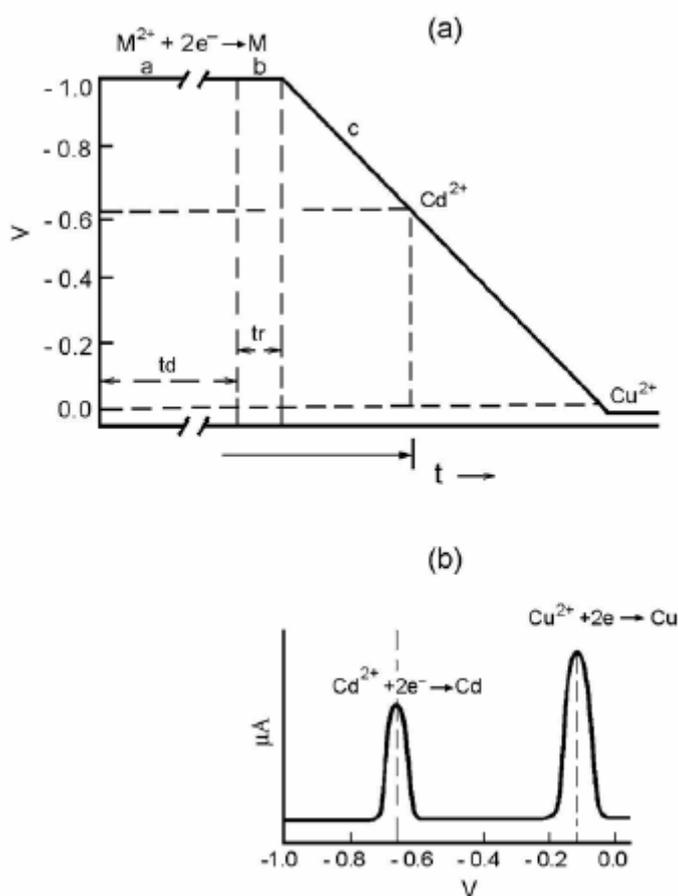
- O sinal de corrente é muito sensível ( $K$  tem um valor grande);
- A sensibilidade depende da natureza do analito (coeficiente de difusão e estequiometria de sua reação eletroquímica) e não é afetada por pequenas mudanças nas condições experimentais;
- É considerada uma técnica não-destrutiva;
- Útil para a caracterização das propriedades redox de complexos metálicos (Voltametria Cíclica).

### 3.2 Voltametria de Redissolução Anódica

Os *métodos de redissolução* compreendem uma variedade de métodos voltamétricos que têm em comum uma etapa inicial característica (etapa de deposição). Em todos esses métodos, o analito é depositado no eletrodo de trabalho, usualmente a partir de uma solução sob agitação. Depois de um determinado período, a eletrólise é interrompida, cessa-se a agitação e há um tempo de equilíbrio (etapa de equilíbrio). Em seguida, inicia-se a varredura de potencial, para determinação do analito depositado inicialmente, através de um dos procedimentos voltamétricos citados no subcapítulo anterior (etapa de redissolução). Durante esta última etapa da análise, o analito é redissolvido ou retirado do eletrodo de trabalho e vem daí o nome associado a estes métodos. A figura 34 ilustra estas etapas gerais da voltametria de redissolução anódica. Nesta técnica, ocorre uma redução da espécie química de interesse no eletrodo de trabalho durante a etapa de deposição e uma oxidação durante a etapa de redissolução, quando o analito é re-oxidado de volta à sua forma original. A etapa de deposição equivale a uma pré-concentração eletroquímica do analito, isto é, a concentração do analito na superfície do eletrodo é muito maior que no restante da solução. Devido a essa etapa da pré-concentração, os métodos de redissolução produzem limites de detecção muito mais baixos que os demais procedimentos voltamétricos. Por exemplo, a redissolução anódica com varredura de pulso pode alcançar limites de detecção da ordem de nanomolar de espécies importantes para o meio ambiente, como  $Pb^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Tl^+$  (33-35).

Os eletrodos utilizados nos métodos de redissolução têm sido produzidos a partir de vários materiais que incluem mercúrio, ouro, prata, platina e carbono em várias formas. O eletrodo mais popular é o eletrodo de mercúrio gota pendente (HMDE), que consiste de uma única gota de mercúrio em contato com um fio de platina. A gota é então formada na ponta de um capilar, por deslocamento do mercúrio, em uma seringa, que dispõe de um controle de saída. Para realizar a determinação de um íon metálico por redissolução anódica, uma nova gota é formada, começa a agitação e é

aplicado um potencial uns poucos décimos de volt mais negativo do que o potencial de meia-onda do íon em questão. Permite-se que a deposição ocorra por um tempo cuidadosamente medido e que pode variar de um minuto ou menos para soluções  $10^{-7}$  mol L $^{-1}$  até 30 minutos ou mais para soluções  $10^{-9}$  mol L $^{-1}$ . Deve-se enfatizar que esses tempos raramente levam à remoção completa dos íons. O período de eletrólise é determinado pela sensibilidade do método empregado na varredura, para completar a análise (33).



**Figura 34 – Etapas em Voltametria de Redissolução Anódica.** (a) Programação  $E$  vs  $t$  mostrando os tempos de deposição ( $t_d$ ), potenciais de deposição (no caso,  $-1,0$  V), para o  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , tempo de repouso ( $t_r$ ) e etapa de redissolução. (b) Voltamogramas hipotéticos para  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ .

### 3.3 O uso da Voltametria para o estudo qualitativo e quantitativo das proteínas

Os métodos voltamétricos têm sido utilizados para estudar o comportamento eletroquímico de proteínas desde 1970. No entanto, somente após o advento dos eletrodos de superfície modificada, a voltametria tornou-se uma ferramenta analítica importante para estudar, manipular e explorar o centro metálico de proteínas. A caracterização da transferência de elétrons entre eletrodos e o sítio ativo de metaloproteínas, tais como proteínas *haem*, proteínas “azuis” de cobre, proteínas Fe-S e enzimas, tem sido o principal objetivo desses estudos. A quantificação de proteínas e estudos de interação desses polipeptídeos com íons metálicos, ânions e drogas através da voltametria começou praticamente no início dos anos 90. Em alguns desses estudos, a voltametria de pulso diferencial foi utilizada para determinar baixas concentrações de albuminas,  $\gamma$ -tioninas e metalotioneínas e para estudar a interação do  $\text{Ca}^{2+}$  com a  $\gamma$ -tionina Sl $\alpha$ 1, de metais pesados e ânions com o citocromo c e da cisplatina com a *HSA* (1, 36-39, 84). A tabela 5 mostra um resumo dos principais estudos realizados com diferentes proteínas até então, utilizando técnicas voltamétricas.

**TABELA 5 – PROTEÍNAS ESTUDADAS POR TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS**

Proteína	Estudo	Época
Citocromo $c_3$ (proveniente de bactéria redutora de sulfato)	Investigação da capacidade da proteína em transportar elétrons em baixo potencial através do sistema $\text{Fe}^{3+} + e^- \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+}$ (40-42)	Início da década de 70
Citocromo c (proveniente de mitocôndria de cavalo)	Uso do 4,4-bipiridil como modificador de superfície de eletrodo de ouro – transferência de elétrons entre a proteína e o eletrodo (43,44)	Final da década de 70

**TABELA 5 – PROTEÍNAS ESTUDADAS POR TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS  
(continuação).**

<b>Proteína</b>	<b>Estudo</b>	<b>Época</b>
Plastocianina (proveniente da membrana tilacóide, do cloroplasto de plantas)	Estudo da capacidade da proteína em transportar elétrons através do sistema $\text{Cu}^{2+} + e^- \rightleftharpoons \text{Cu}^+$ (45)	Metade da década de 80
Azurina (proveniente do cloroplasto de plantas)	Estudo da capacidade da proteína em transportar elétrons através do sistema $\text{Cu}^{2+} + e^- \rightleftharpoons \text{Cu}^+$ (46,47)	Metade da década de 80
Ferridoxina I (proveniente de <i>Azotobacter chroococcum</i> )	Estudo do mecanismo de transporte de elétrons através do sistema $\text{Fe}^{3+} + e^- \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+}$ , para verificação da atividade da enzima (48)	Final da década de 80
Citocromo c peroxidase (catalisa a redução de $\text{H}_2\text{O}_2$ )	Investigação da redução de aminoglicosídeos via eletroquímica direta da enzima, para testes de interferências (49)	Final da década de 80
Albuminas (provenientes do leite, plantas, clara do ovo ou sangue)	Determinações quantitativas de albuminas por meio de suas interações com $\text{Hg}^{2+}$ e estudo da afinidade com $\text{Ca}^{2+}$ (50-51)	Década de 90
$\gamma$ -tioninas (extraídas de <i>Sorghum bicolor</i> )	Determinações quantitativas de $\gamma$ -tionina $\text{Sl}\alpha 3$ por meio do sistema $\gamma$ -tionina $\text{Sl}\alpha 3/\text{Ca}^{2+}$ (52)	Década de 90
Plastocianina (extraída de espinafre)	Estudos com eletrodos de superfície modificada com lipídios de dupla camada para testes de interações em membranas (53)	Década de 90
$\beta$ -lactoglobulina	Estudo da influência da mudança de temperatura na adsorção da proteína em eletrodo de grafite, para monitoramento da desnaturação (54)	Década de 90

**TABELA 5 – PROTEÍNAS ESTUDADAS POR TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS  
(continuação).**

<b>Proteína</b>	<b>Estudo</b>	<b>Época</b>
Amicianina (extraída de <i>Thiobacillus versutus</i> )	Estudo da reatividade do centro de cobre tipo 1 com outras proteínas (55)	Década de 90
Imunoglobulinas	Comparação de comportamento voltamétrico em eletrodo de mercúrio para verificação de atividade eletroquímica (56)	Década de 90
Mioglobinas	Estudos de propriedades de transferência de elétrons através da determinação quantitativa de sítios de ligação com metais (57)	Década de 90
Metalotioneínas, (extraídas de <i>Mytilus galloprovincialis</i> )	Estudos de interação com $Cd^{2+}$ , obtenção de parâmetros quantitativos e montagem de modelo molecular (58)	Década de 90
Álcool-desidrogenase	Estudos de adsorção da proteína em eletrodo de platina por voltametria cíclica (59)	Início da década atual
Ribonucleotídeo-reductase (extraída de <i>Escherichia coli</i> )	Estudos objetivando a redução da proteína com derivados solúveis de ferroceno (60)	Início da década atual
Hemoglobina	Estudo do efeito do ATP na proteína, que pode estabilizar o estado reduzido do ferro (61)	Início da década atual

Além das proteínas citadas na tabela 5, também foram estudadas por técnicas voltamétricas a *Rusticinina* (62), a *Laccase* (63,64), a *D-gluconato desidrogenase* (65), a *p-cresol metilhidroxilase* (66), e a *Fumarato reductase* (67,68).

## IV. EXPERIMENTAL

A parte experimental do trabalho foi subdividida em cinco etapas:

**1ª. etapa- Experimentos de síntese, clivagem e desproteção dos peptídeos do prion:** síntese de fase sólida dos peptídeos do prion (Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>; Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub>; Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub>) utilizando metodologia de acoplamento/desproteção Fmoc; clivagem dos peptídeos do suporte polimérico e remoção de seus grupos protetores através de ácido trifluoroacético e reagentes orgânicos seqüestradores de carbocátions.

**2ª. etapa- Experimentos de purificação dos peptídeos do prion:** purificação dos peptídeos do prion utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC).

**3ª. etapa- Experimentos de caracterização e verificação da pureza dos peptídeos do prion:** determinação da massa molecular e da seqüência dos peptídeos do prion utilizando a espectrometria de massa.

**4ª. etapa- Experimentos de padronização dos peptídeos do prion:** determinação da concentração das soluções dos peptídeos do prion utilizando a espectroscopia UV-Vis.

**5ª. etapa- Experimentos de investigação dos sistemas peptídeos do prion – Cu<sup>2+</sup>:** estudo da interação do íon Cu<sup>2+</sup> com os peptídeos do prion utilizando a voltametria de redissolução anódica.

### 1. Material

#### 1.1 Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados em todos os experimentos realizados são mostrados na tabela 6.

**TABELA 6 – REAGENTES E SOLVENTES**

<b>Reagentes</b>	<b>Fonte</b>
Acetonitrila (HPLC)	J.T.Baker
Ácido Nítrico P.A.	Quimex
Ácido Trifluoroacético (TFA)	Sigma
Anidrido acético	Merck
Solução padrão de cobre de 1000 ppm	Sigma
Diclorometano	Carlo Erba
Diisopropilcarbodiimida (DIC)	Sigma
N,N-diisopropiletilamina (DIPEA)	Sigma
Dimetilformamida (DMF)	Carlo Erba
Etanoditiol (EDT)	Sigma
Éter diisopropílico P.A.	Vetec
Fenol	Sigma
Fmoc-Asparagina-OH (N)	Nova Biochem
Fmoc-Glicina-OH (G)	Nova Biochem
Fmoc-Glutamina-OH (Q)	Nova Biochem
Fmoc-Histidina(Boc)-OH (H)	Nova Biochem
Fmoc-Isoleucina-OH (I)	Nova Biochem
Fmoc-Lisina(Boc)-OH (K)	Nova Biochem
Fmoc-Prolina-OH (P)	Nova Biochem
Fmoc-Treonina(tBu)-OH (T)	Nova Biochem
Fmoc-Triptofano-OH (W)	Nova Biochem
Fmoc-Valina-OH (V)	Nova Biochem
1-Hidroxibenzotriazol (HOBT)	Nova Biochem
Hidróxido de sódio P.A.	Quimex
Metanol	Carlo Erba
Nitrato de potássio P.A.	Merck
<i>o</i> -(Benzotriazol-1-il)-N,N,N,N-tetrametilurônio tetrafluoroborato (TBTU)	Merck
Piperidina	Merck

**TABELA 6 – REAGENTES E SOLVENTES (continuação)**

<b>Reagentes</b>	<b>Fonte</b>
Rink Amide Resin	Nova Biochem
Tioanisol	Aldrich
Triisopropilsilano (TIS)	Sigma
Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico ( $\alpha$ -ciano)	Bruker
Ninhidrina	Merck
Etanol	Carlo Erba
Piridina	Merck
Cianeto de Potássio	Merck

## **1.2 Soluções**

### **1.2.1 Solução utilizada na síntese dos peptídeos do prion**

1. Solução de Piperidina 20 % (v/v) em DMF

### **1.2.2 Soluções utilizadas no teste de verificação de acoplamento/desproteção durante a síntese**

1. Solução de Ninhidrina 5 % (p/v) em Etanol
2. Solução de Fenol 80 % (p/v) em Etanol
3. Solução de KCN 0,02 mmol L<sup>-1</sup> em Piridina

### **1.2.3 Soluções utilizadas na clivagem e desproteção dos peptídeos do prion**

1. Solução composta por: TFA 81,5 % (v/v) + Tioanisol 5,0 % (v/v) + EDT 2,5 % (v/v) + Fenol 5,0 % (v/v) + TIS 1,0 % (v/v) + Água 5,0 % (v/v), com volume total de 10,0 mL (Solução A)

2. Solução composta por: TFA 95,0 % (v/v) + TIS 2,5 % (v/v) + Água 2,5 % (v/v), com volume total de 10,0 mL (Solução B)

#### **1.2.4 Soluções utilizadas na purificação dos peptídeos do prion**

1. Solução de TFA 0,1 % (v/v)
2. Solução de TFA 0,1 % (v/v) em Acetonitrila

#### **1.2.5 Soluções utilizadas na caracterização e verificação da pureza dos peptídeos do prion**

1. Solução composta por: ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico 0,01 % (p/v) (Solução C), como solvente 500  $\mu$ L de solução D.
2. Solução composta por: 50,0 % TFA 0,1 % (v/v) + 40,0 % Acetonitrila + 10,0 % TFA 3,0 % (v/v), com volume total de 500  $\mu$ L (Solução D).

#### **1.2.6 Soluções utilizadas nas análises voltamétricas qualitativas e quantitativas dos sistemas peptídeos do prion – Cu<sup>2+</sup>**

1. Solução padrão de cobre  $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$
2. Solução de HNO<sub>3</sub> 20 % (v/v)
3. Solução de nitrato de potássio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$
4. Solução de hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$

Para a preparação das soluções, utilizou-se água “quartex” (tridestilada), água submetida a um processo de destilação “sub-boling”.

### **1.3 Vidraria**

#### **Lavagem:**

O procedimento adotado na lavagem de toda a vidraria utilizada nos experimentos é descrito abaixo:

- Lavagem com água de torneira;
- Lavagem com solução de HNO<sub>3</sub> 20 % (imersão em banho por 1 hora);
- Lavagem com água quartex (imersão em banho por 1 hora);
- Secagem à temperatura ambiente.

## **1.4 Eletrodo**

### **Lavagem:**

O procedimento adotado na lavagem dos eletrodos após cada análise voltamétrica é descrito abaixo:

- Lavagem com água quartex;
- Lavagem com solução de HNO<sub>3</sub> 20 %;
- Lavagem com água quartex, borbulhando-se N<sub>2</sub> por alguns minutos, já anteriormente às análises voltamétricas.

## **1.5 Instrumentação**

### **1.5.2 Aparelhagem utilizada nos experimentos de clivagem e desproteção dos peptídeos do prion**

O Liofilizador Labconco C-5 foi utilizado para a realização das secagens dos peptídeos, após o término dos experimentos de clivagem e desproteção. Este liofilizador trabalha em pressões da ordem de 10<sup>-6</sup> a 10<sup>-5</sup> atm.

### **1.5.3 Aparelhagem utilizada nos experimentos de purificação dos peptídeos do prion**

O cromatógrafo Shimadzu LC-10A foi utilizado nos experimentos de purificação dos peptídeos por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC). Este cromatógrafo é um instrumento que pode ser controlado por microcomputador, e funciona composto por: uma bomba LC-

10AT, com gradiente de baixa pressão, um misturador de solventes, um controlador SPL 10A (que controla um gradiente de eluição e o próprio sistema de HPLC) e um detector UV-Vis SPD-10A. A amostra é injetada e arrastada pelo solvente até a coluna de cromatografia, onde em seguida os componentes da amostra são registrados pelo detector.

As colunas e pré-coluna cromatográficas de fase reversa (onde a fase estacionária é fortemente apolar) utilizadas foram: coluna preparativa Vydac C<sub>18</sub> (10µm, 2,2 x 25 cm), coluna analítica Vydac Dionex C<sub>18</sub> (5 µm, 1,6 x 25 cm) com pré-coluna Vydac C<sub>18</sub> (5 µm, 1,6 x 6 cm).

#### **1.5.4 Aparelhagem utilizada nos experimentos de caracterização e verificação da pureza dos peptídeos do prion**

A aparelhagem utilizada nos experimentos de caracterização e verificação da pureza dos peptídeos compreendeu os espectrômetros Q-TOF ultima (Micromass) e Ultraflex II TOF/TOF (Bruker).

O equipamento Q-TOF ultima é um espectrômetro de massa que utiliza ionização electrospray (ESI). Como analisadores, o espectrômetro possui um híbrido tempo de voo (TOF) e um quadrupolo, com capacidade MS/MS (espectrometrias de massa em seqüência, com fragmentação). O quadrupolo é operado como um guia de íons no modo MS e como um dispositivo de seleção no modo MS/MS. O analisador TOF (com refletor) é localizado de forma ortogonal ao quadrupolo, e serve como um dispositivo de resolução de massas em ambos os modos, MS e MS/MS. Uma célula de colisão é localizada entre os analisadores, para induzir fragmentações nos experimentos no modo MS/MS. O detector final é um microcanal com alta sensibilidade. O instrumento é controlado por microcomputador e utiliza o software *Masslynx*. A amostra é introduzida (líquida) por uma bomba infusora, um *loop* injetor ou uma coluna de HPLC. Uma interface electrospray (nanoflow) é disponível para análises com pequena quantidade de amostra. A alta precisão do equipamento permite medidas exatas de massa de pequenas moléculas e seqüenciamento de peptídeos por meio dos espectros MS/MS.

O equipamento Ultraflex II TOF/TOF é um espectrômetro de massa com ionização MALDI, e dois analisadores do tipo TOF. Assim como o equipamento

Q-TOF ultima, opera no modo MS e MS/MS (fragmentação). Trabalha nos modos linear e refletor, sendo que no primeiro os analisadores se posicionam em seqüência, enquanto que no refletor, há um ângulo de posicionamento entre os analisadores. Utiliza alto vácuo, tanto na fonte de íons quanto no detector. A amostra é cristalizada sobre uma placa metálica com uma matriz e sofre a dessorção/ionização por meio de impacto de um laser de N<sub>2</sub> de 334 nm.

#### **1.5.5 Aparelhagem utilizada nos experimentos de padronização dos peptídeos do prion**

A aparelhagem utilizada nos experimentos de padronização dos peptídeos compreendeu o espectrômetro UV-Vis 911-A (GBC). O equipamento trabalha com um feixe duplo, onde um atravessa a amostra e o outro é o de referência. Utilizou-se uma lâmpada de Deutério, no modo pontual, para leituras em um único comprimento de onda. A cubeta utilizada foi a de quartzo, com duas faces polidas, com uma espessura (caminho óptico) de 1 cm.

#### **1.5.6 Aparelhagem utilizada nos experimentos de voltametria de redissolução anódica**

A aparelhagem utilizada nos experimentos de voltametria de redissolução anódica compreendeu o processador de Análise Voltamétrica Metrohm 646. Este é um instrumento de medida controlado por microprocessador para uso em análises voltamétricas e polarográficas, que funciona como uma unidade de controle da célula eletroquímica Metrohm 647. Ele opera de acordo com o princípio dos três eletrodos potenciostáticos, ou seja, o eletrodo de trabalho é controlado por um eletrodo de referência descarregado e a corrente flui através de um contra eletrodo.

A célula eletroquímica (Metrohm 647) é composta por um sistema de três eletrodos: eletrodo multi-modos (eletrodo de trabalho), que combina o eletrodo gotejante de mercúrio (DME/SMDE) e o eletrodo de mercúrio gota pendente (HMDE) em uma única unidade; sistema Ag/AgCl (KCl 3 mol L<sup>-1</sup>)

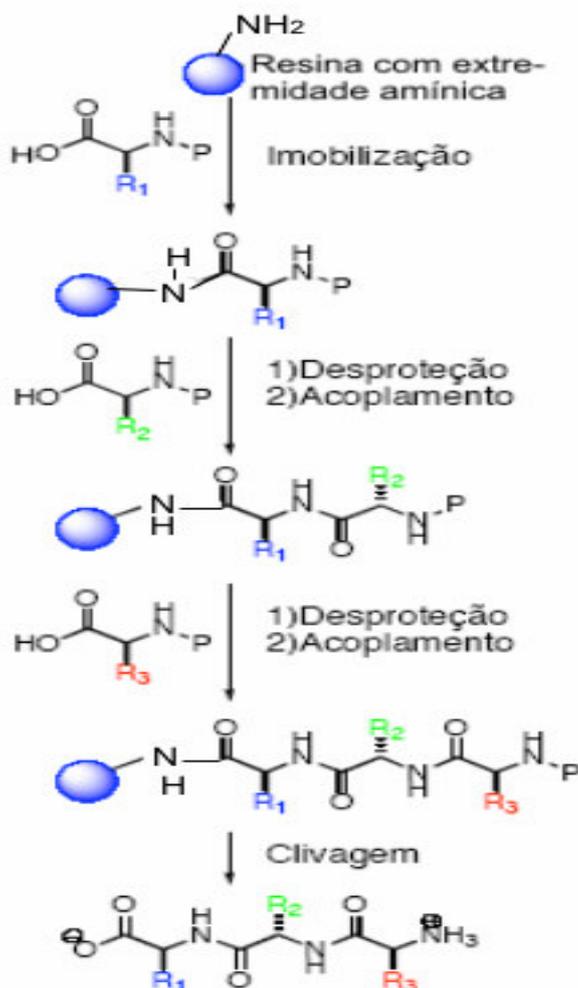
como eletrodo de referência e um eletrodo de Pt funcionando como eletrodo auxiliar.

Os métodos realizados pelo Processador de Análise Voltamétrica Metrohm 646 incluem: Polarografia de Pulso Diferencial: DPN (Pulso Normal Diferencial), DPI (Pulso irreversível Diferencial), DPR (Pulso reversível Diferencial); Polarografia DC: DCT (polarografia Test) e Polarografia de Onda Quadrada (SQW).

## 2. Metodologia

### 2.1 Síntese dos peptídeos Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>, Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> e Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub>

A estratégia geral utilizada na síntese de fase sólida 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc) dos peptídeos (69,70) é descrita na Figura 35. A estratégia consiste inicialmente na desproteção de uma extremidade amínica do suporte polimérico (utilizando como reagente a piperidina), e posterior acoplamento de um Fmoc-aminoácido na extremidade amínica desprotegida (utilizando como reagentes TBTU, HOBT, DIC e DIPEA). Em seguida, ocorre nova desproteção (retirada do grupo Fmoc), e acoplamento do próximo Fmoc-aminoácido. Ao término da síntese, o peptídeo é submetido à etapa de clivagem e desproteção. Todos os reagentes e solventes desta etapa foram obtidos comercialmente.



**Figura 35 – Estratégia geral de síntese de peptídeos em fase sólida.** No procedimento utilizado, P = grupo protetor Fmoc [Retirado de MERRIFIELD, R.B. (1963) *Journal of American Chemical Society*, 85, 2149].

O procedimento utilizado na síntese dos peptídeos está descrito abaixo:

- 1 – Pesar 0,2 mmol da resina Rink Amide.
- 2 – Adicionar 5 mL de solução de Piperidina 20 % em DMF (3 lavagens de 3 minutos cada, seguidas de secagem a vácuo).
- 3 – Retirar pequena quantidade do material e realizar o teste da ninhidrina (Passo 4).
- 4 – Teste da ninhidrina: adicionar à quantidade retirada do material (passo 3), na proporção de 1 gota: 2 gotas: 1 gota as seguintes soluções: solução de Ninhidrina 5% em etanol, solução de fenol 80% em etanol e solução de KCN 0,02 mmol L<sup>-1</sup> em Piridina. Caso a cor resultante seja azul, há indicação de desproteção, então pode-se avançar para que a reação de acoplamento seja

iniciada (seguir para passo 5). Caso a cor resultante seja amarela, há indicação de que o material está “protegido”, ou seja, a extremidade amínica não está disponível para a reação (retornar para o passo 2).

5 – Adicionar 0,9 mmol do Fmoc-aminoácido.

6 – Adicionar os reagentes de acoplamento: 92 mg de TBTU, 180 mg de HOBT e dissolver a mistura em DMF.

7 – Levar a mistura a um agitador e deixar a reação ocorrer por uma hora à temperatura ambiente.

8 – Retirar a mistura do agitador, e fazer três lavagens com metanol e três lavagens com DMF, intercaladas.

9 – Secar a mistura à vácuo.

10 – Retornar aos passos 3 e 4. Agora, ao chegar ao passo 4, a cor amarela indicará o sucesso da reação, pois se a extremidade estiver “protegida”, há a indicação que o Fmoc-aminoácido foi acoplado.

11 – Retornar ao passo 2 e reiniciar o processo, desta vez para acoplamento do próximo Fmoc-aminoácido.

12 - Ao término da seqüência desejada, deve-se realizar o procedimento novamente só que desta vez ao invés de Fmoc-aminoácido deve-se adicionar 0,9 mmol de anidrido acético (passo 5) para que ocorra a acetilação da extremidade N-terminal do peptídeo.

### **Observações:**

- Os passos 2 a 4 correspondem a etapa de desproteção, onde uma extremidade química  $-NH_2$  da resina é preparada para a posterior reação de acoplamento do Fmoc-aminoácido. A síntese se processa no sentido da direita para a esquerda em uma seqüência peptídica. Por exemplo, na síntese do Prp[92-96] (Ac-GGGTH- $NH_2$ ), o grupo amino da extremidade vem da resina, e os acoplamentos se iniciam pela Treonina (T).

- Os passos 5 a 8 correspondem à reação de acoplamento propriamente dita. No passo 6, quando da adição do sexto Fmoc-aminoácido em diante, usa-se ao invés de TBTU, 150  $\mu$ L de DIC e 200  $\mu$ L de DIPEA, e no passo 7, a reação é processada em duas horas.

## **2.2 Clivagem da resina e remoção dos grupos protetores dos peptídeos do prion**

O procedimento adotado para a clivagem e remoção dos grupos protetores dos peptídeos é descrito abaixo:

- 1 – Adicionar, ao produto da síntese, 10 mL de solução B, no caso de ausência de Triptofano (W) na seqüência peptídica. No caso da presença de Triptofano, adicionar 10 mL de solução A.
- 2 – Sob agitação, deixar a reação ocorrer por aproximadamente duas horas.
- 3 – Borbulhar N<sub>2</sub> após a reação, para a evaporação do TFA, até que o volume seja reduzido pela metade.
- 4 – Realizar seis lavagens com éter diisopropílico gelado e retirar a fase orgânica.
- 5 – Tomar a fase aquosa, adicionar cerca de 50 mL de solução 1:1 acetonitrila : água e extrair com filtração a vácuo.
- 6 – Realizar mais duas lavagens do material com a solução 1:1 acetonitrila: água.
- 7 – Retirar o filtrado e liofilizar (obtenção da amostra 1).

## **2.3 Purificação dos peptídeos do prion**

A estratégia geral adotada para a purificação dos peptídeos está descrita abaixo:

- 1 – Tomar aproximadamente 1 mg da amostra 1 e realizar uma corrida cromatográfica utilizando coluna analítica para a verificação do perfil.
- 2 – Tomar, aproximadamente 5 mg da amostra 1 e realizar uma corrida cromatográfica utilizando coluna preparativa para a purificação do peptídeo.
- 3 – Repetir o passo 2 até o término do material.
- 4 – Liofilizar as frações cromatográficas obtidas no passo 2.

- 5 – Analisar as frações cromatográficas obtidas no passo 2, utilizando a espectrometria de massa, para identificar, caracterizar e verificar o grau de pureza do peptídeo de interesse (VIDE item 2.4)
- 6 – Caso o peptídeo de interesse ainda esteja impuro, tomar a fração cromatográfica correspondente e repetir a corrida cromatográfica, desta vez utilizando coluna analítica (recromatografia).
- 7 – Repetir o passo 6 até o término do material.
- 8 – Liofilizar as frações cromatográficas obtidas na recromatografia (passo 6).
- 9 – Analisar as frações cromatográficas obtidas no passo 6, utilizando a espectrometria de massa, para identificar, caracterizar e verificar a pureza do peptídeo de interesse (VIDE item 2.4).

O procedimento adotado na purificação dos peptídeos está detalhado a seguir:

- 1 – Pesar 5 mg da amostra 1 e dissolvê-la em 250  $\mu$ L de TFA 0,1%.
- 2 – Filtrar a amostra com filtro MILIPORE e centrifugar.
- 3 – Lavar a coluna com solução TFA 0,1% em acetonitrila (solvente B), durante 10 minutos.
- 4 – Equilibrar a coluna com TFA 0,1% (solvente A), durante 10 minutos.
- 5 – Injetar o sobrenadante resultante da centrifugação (passo 2) na coluna cromatográfica.
- 6 – Acionar programa, o qual consiste de 5 minutos de equilíbrio de coluna, 70 minutos de corrida com gradiente linear do solvente B, e 15 minutos finais de lavagem da coluna (tabela 7).
- 7 – Registrar cromatograma e coletar pico de interesse.
- 8 – Liofilizar as frações cromatográficas.

#### **Condições experimentais do HPLC:**

- **Comprimento de onda:** 216 nm (região da ligação peptídica) e 280 nm (região de anel aromático).
- **Fase estacionária:** coluna Vydac C<sub>18</sub> preparativa (10 $\mu$ , 2,2 x 25 cm) e coluna Vydac Dionex C<sub>18</sub> analítica (5 $\mu$ , 1,6 x 25 cm) com pré-coluna Vydac C<sub>18</sub> (5  $\mu$ , 1,6 x 6 cm).

- **Fase móvel:** solvente A (TFA 0,1%) e solvente B (TFA 0,1% em acetonitrila).
- **Temperatura:** 22<sup>o</sup>.C.

**Observações:**

O programa adotado nas corridas cromatográficas utilizando tanto a coluna analítica quanto a coluna preparativa foi o mesmo, alterando somente o fluxo de solvente, que na coluna analítica foi de 1,0 mL minuto<sup>-1</sup>, e na coluna preparativa foi de 5,0 mL minuto<sup>-1</sup>.

**TABELA 7 – PROGRAMA DE ELUIÇÃO/ RP-HPLC**

<b>Tempo / min</b>	<b>Fluxo / mL min<sup>-1</sup></b>	<b>% solvente B</b>	<b>% solvente A</b>
0,0	1,0 (a)	0	100
	5,0 (p)		
5,0	1,0 (a)	0	100
	5,0 (p)		
75,00	1,0 (a)	100	0
	5,0 (p)		
90,00	1,0 (a)	100	0
	5,0 (p)		

**(a) = coluna analítica**

**(p) = coluna preparativa**

## **2.4 Caracterização e verificação da pureza dos peptídeos do prion**

O procedimento adotado para a caracterização e verificação da pureza dos peptídeos está descrito abaixo:

1 – Tomar as frações cromatográficas obtidas no passo 8 da estratégia geral do item 2.3 e resuspender em 60 µL de TFA 0,1%.

2 – No caso de análise no espectrômetro Q-TOF ultima, diluir 10 µL das frações cromatográficas com 5 mL de metanol 50%.

2a – Injetar a solução resultante no equipamento e registrar espectro MS, para identificação dos componentes da fração pela massa molecular.

2b – Ao identificar o pico referente ao peptídeo de interesse, registrar espectro MS/MS para determinação da seqüência.

3 – No caso de análise no espectrômetro Ultraflex II TOF/TOF, adicionar 3 µL da fração cromatográfica a 9 µL da solução C (matriz).

3a – Aplicar, em cada poço da placa metálica para leitura no espectrômetro, 0,5 µL da solução resultante do passo 3 (três poços para cada solução resultante).

3b – Aguardar a secagem do material sobre a placa (aproximadamente 10 minutos).

3c – Inserir a placa no espectrômetro e registrar espectros MS (identificação) e MS/MS (seqüenciamento) do peptídeo de interesse.

### **Condições experimentais dos experimentos de caracterização e verificação da pureza dos peptídeos:**

a) Q-TOF ultima

- **Fluxo:** 1 µL min<sup>-1</sup>.
- **Voltagem do capilar:** 2,8 kV.
- **Energia de colisão:** 30 eV.
- **Temperatura de desolvatação:** 25° C (ambiente).
- **Voltagem do cone:** 40 V.

b) Ultraflex II TOF/TOF

- **Modo:** Refletor
- **Tipo de laser:** Nitrogênio, comprimento de onda de 334 nm.
- **Pressão do detector:** 5,0 x 10<sup>-7</sup> mbar
- **Pressão da fonte:** 1,2 x 10<sup>-7</sup> mbar
- **Voltagem de aceleração:** 13,8 kV.
- **Energia de colisão:** cerca de 60% da energia máxima do equipamento.
- **Matriz:** α-ciano.

## 2.5 Padronização dos peptídeos do prion

O procedimento adotado para a padronização dos peptídeos está descrito abaixo:

- 1 – Preparar uma solução com aproximadamente 0,5 mg do peptídeo.
- 2 – Medir a absorvância da água pura em 205, 215, 225 e 280 nm (branco).
- 3 – No caso de peptídeo contendo Triptofano (W), medir a absorvância da solução em 280 nm em triplicata.
- 4 – No caso de peptídeo que não possui Triptofano (W), medir as absorvâncias da solução em 205, 215 e 225 nm, em triplicata.
- 5 – Calcular a concentração da solução, no caso de peptídeo contendo Triptofano (W), utilizando a Lei de Beer, e usando o método de Edelhoch (71) para cálculo da absorvidade molar.
- 6 – Calcular a concentração da solução, no caso de peptídeo que não possui Triptofano (W), utilizando o método de Murphy e Kies (72).

### **Método de Edelhoch para cálculo da absorvidade molar (em 280 nm) de peptídeos ou proteínas:**

$$\epsilon (280 \text{ nm}) (\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}) = (\text{número de triptofanos})(5500) + (\text{número de tirosinas})(1490) + (\text{número de cistinas})(125) \quad (3)$$

### **Lei de Beer, para cálculo da concentração da solução de peptídeo que possui triptofano na seqüência:**

$$C = A_{280} / (\epsilon_{280} \cdot b) \quad (4)$$

Onde:

C = concentração do peptídeo

A = absorvância da solução de peptídeo medida à 280 nm.

$\epsilon$  = absorptividade molar calculada para o peptídeo por meio do método de Edelhoch

b = caminho óptico.

**Método de Murphy e Kies para cálculo da concentração da solução de peptídeo que não possui triptofano na seqüência:**

$$(A_{215} - A_{225})144 = K \quad (5)$$

$$A_{205} \cdot 31 = T \quad (6)$$

$$(K + T)/2 = C \text{ (mg/L)} \quad (7)$$

Onde:

A = absorvância da solução do peptídeo medida à 205, 215 e 225 nm.

C = concentração da solução do peptídeo em mg/L.

## **2.6 Estudo da interação dos peptídeos do prion com os íons $\text{Cu}^{2+}$**

A estratégia adotada para o estudo da interação dos peptídeos com o íon  $\text{Cu}^{2+}$  está descrito abaixo:

- 1 – Preparar a célula eletroquímica, adicionando 20 mL de eletrólito suporte (solução de nitrato de potássio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ).
- 2 – Ajustar o pH para 7,4, com hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .
- 3 – Borbulhar  $\text{N}_2$  por 10 minutos.
- 4 – Iniciar as varreduras de potencial, começando somente com o eletrólito suporte.
- 5 – Borbulhar  $\text{N}_2$  por 100 segundos.
- 6 - Adicionar um volume conhecido da solução padrão de  $\text{Cu}^{2+}$  (Tabela 8).
- 7 – Traçar voltamograma.
- 8 – Borbulhar  $\text{N}_2$  por 100 segundos.

9 – Adicionar um volume conhecido da solução de peptídeo padronizada anteriormente, com o objetivo de titular o  $\text{Cu}^{2+}$  adicionado (Tabela 8).

10 – Traçar voltamograma.

11 - Continuar as adições de solução de peptídeo, traçando voltamogramas para cada adição até a complexação de todo o cobre (II).

12 – Repetir os passos de 1 a 11 por mais duas vezes..

13 – Com base nos voltamogramas, calcular o ponto de equivalência, a estequiometria do sistema e o  $K_d$  do complexo.

**TABELA 8 – CONCENTRAÇÕES E VOLUMES UTILIZADOS DE SOLUÇÃO PADRÃO DE COBRE E DE PEPTÍDEO NOS EXPERIMENTOS DE VOLTAMETRIA DE REDISSOLUÇÃO ANÓDICA**

Peptídeo	Concentração da solução padrão de cobre (II) / $\text{mol L}^{-1}$	Concentração da solução do peptídeo / $\text{mol L}^{-1}$	Volume adicionado de solução padrão de cobre (II) / $\mu\text{L}$	Volume adicionado de solução do peptídeo / $\mu\text{L}$
Ac-VNITKQHTVTTTT-NH <sub>2</sub>	$4,00 \times 10^{-3}$	$8,53 \times 10^{-4}$	10,0	120
Ac-GGGTH-NH <sub>2</sub>	$4,00 \times 10^{-3}$	$8,83 \times 10^{-5}$	5,00	450
Ac-PHGGGWGQ-NH <sub>2</sub>	$8,00 \times 10^{-4}$	$9,56 \times 10^{-6}$	5,00	990

### Condições experimentais do Processador de Análise Voltamétrica

#### Metrohm 646:

- **Técnica:** Voltametria de Redissolução Anódica.
- **Amplitude do Pulso:** 50 mV.
- **Velocidade de varredura:**  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .
- **Tempo de deposição:** 90 s.
- **Tempo de equilíbrio:** 20 s.
- **Temperatura:**  $23^\circ \text{C}$ .
- **Potencial inicial e de deposição:** -300 mV.
- **Potencial final:** 200 mV.

- **Área da gota:** 0,4 mm<sup>2</sup>
- **Tempo de vida da gota:** 600 ms.

**Programa:** O programa utilizado nas análises voltamétricas, elaborado segundo o Manual de Instruções do Processador de Análise Voltamétrica Metrohm 646 é mostrado abaixo:

### **Operações/parâmetros**

1	STIR; PURGE;	5 S
2	[ADDL; 0PURGE;	
3	HMDE;	
4	MEAS;	90 S
4a	M.MODE DPN	50 mV
4b	T.STEP	600 mS
4c	U.SET	-300 mV
5	0STIR	20 S
6	SWP0	
6a	U.END	200 mV
6b	U.STEP	6 mV
6c	SW.RATE	10.0 mV/S
7	0MEAS; PURGE;STIR	
8	BEEP; ADD1]7;	100 S
9	0PURGE;	
10	END;	

## V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Síntese dos peptídeos do prion Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>, Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> e Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub>

A estratégia utilizada nos experimentos de síntese dos peptídeos do prion, apresentada no item 2.1 da metodologia foi a mesma descrita por Fields e Noble (70). Partindo-se de 0,2 mmol de resina Rink Amide, para cada peptídeo sintetizado, foram obtidas as seguintes massas e rendimentos (Tabela 9):

**TABELA 9 – RESULTADOS OBTIDOS NA SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS DO PRION**

Peptídeo	Massa obtida / mg	Rendimento / %
Ac-VNITKQHTVTTTT-NH <sub>2</sub>	1004	75,2
Ac-PHGGGWGQ-NH <sub>2</sub>	501	66,6
Ac-GGGTH-NH <sub>2</sub>	115	27,2

### 2. Clivagem da resina e remoção dos grupos protetores dos peptídeos do prion

A estratégia utilizada nos experimentos de clivagem dos peptídeos da resina e remoção de seus grupos protetores, apresentada no item 2.2 da metodologia, foi a mesma sugerida por Fields e Noble (70). Partindo-se de quantidades definidas dos peptídeos brutos, foram obtidas as seguintes massas e rendimentos para as etapas de clivagem e desproteção (tabela 10):

**TABELA 10 – RESULTADOS OBTIDOS APÓS A CLIVAGEM E DESPROTEÇÃO DOS PEPTÍDEOS**

<b>Peptídeo</b>	<b>Massa utilizada / mg</b>	<b>Massa obtida / mg</b>	<b>Rendimento / %</b>
Ac-VNITKQHTVTTTT-NH <sub>2</sub>	932	135	19,31
Ac-PHGGGWGQ-NH <sub>2</sub>	234	36	25,71
Ac-GGGTH-NH <sub>2</sub>	102	24	42,86

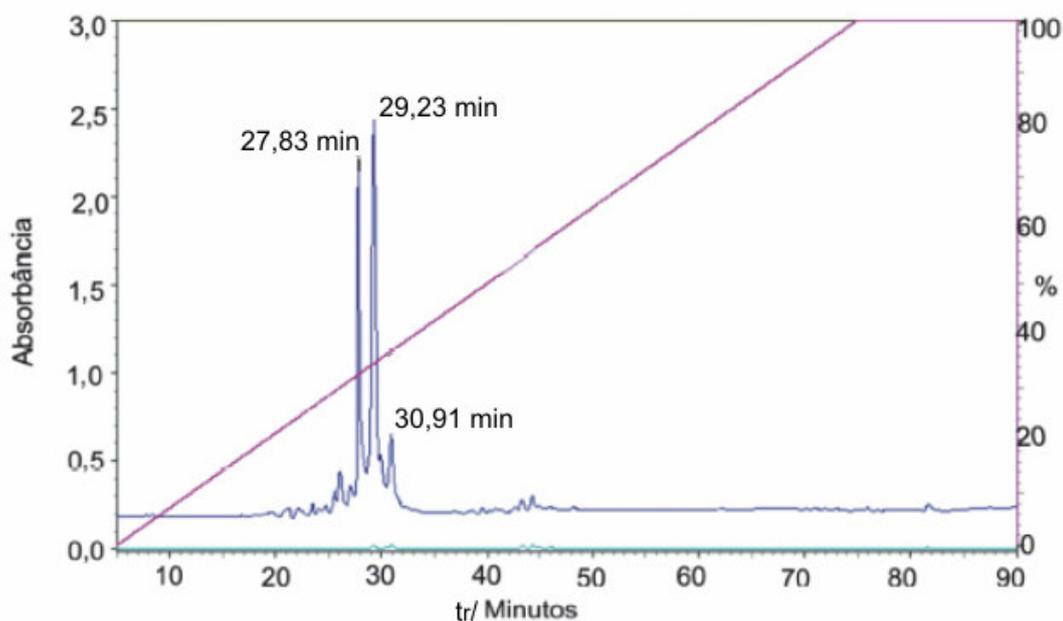
Obs: Os rendimentos já consideram o decréscimo de massa devido à remoção de grupos protetores.

### **3. Purificação, caracterização e verificação da pureza dos peptídeos do prion**

#### **3.1 Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>**

O peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>, o qual possui uma massa molecular de 1485 Da, foi purificado por RP-HPLC para eliminação de impurezas provenientes das etapas de síntese, clivagem e desproteção.

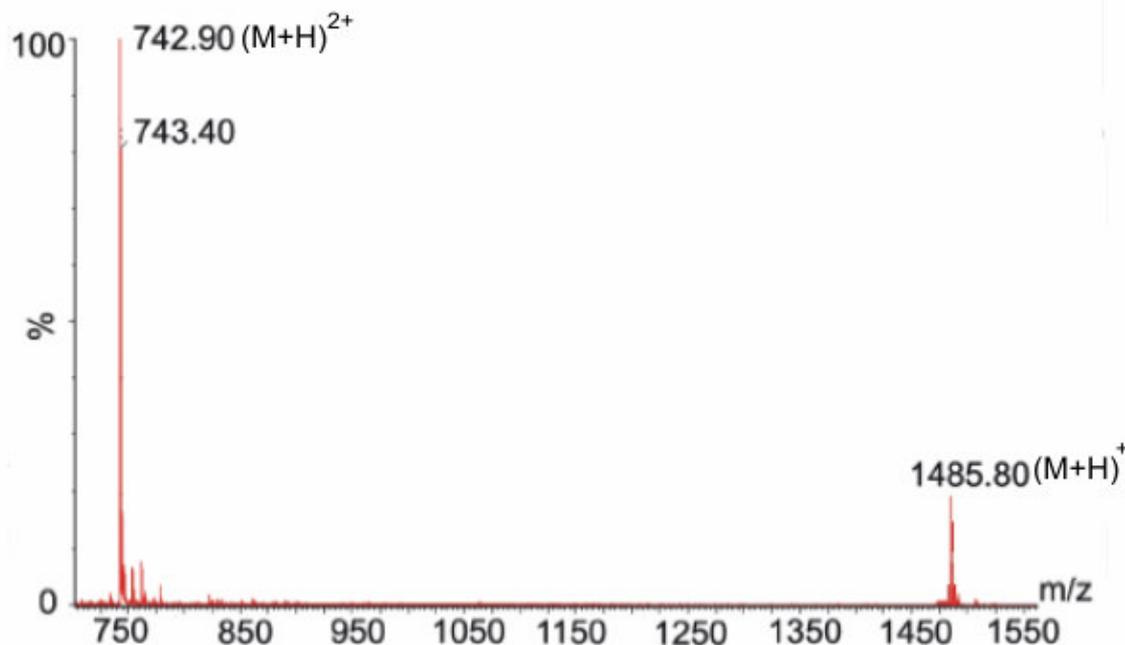
Inicialmente, realizou-se 26 corridas cromatográficas em coluna preparativa, utilizando os parâmetros experimentais definidos no capítulo anterior, para a purificação do Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>. A Figura 36 mostra um dos cromatogramas obtidos para o Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>, utilizando coluna preparativa, após as etapas de clivagem e desproteção. Três picos principais foram observados no cromatograma, todos apresentando grande absorção em 216 nm, e pouca ou nenhuma absorção em 280 nm, o que era esperado, pois o Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub> não contém Triptofano (W) nem Tirosina (Y), aminoácidos que possuem grupos aromáticos em suas cadeias laterais.



**Figura 36 – Cromatograma obtido para o peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>.** Em azul, absorção em 216 nm; em verde, absorção em 280 nm; em rosa, gradiente de concentração do solvente B. Coluna: preparativa Vydac C<sub>18</sub> (10 $\mu$ , 2,2 x 25 cm); fluxo: 5,0 ml min<sup>-1</sup>; Temperatura: 22<sup>o</sup> C; Fase móvel: solvente A (TFA 0,1% em água), solvente B (TFA 0,1% em acetonitrila).

As frações cromatográficas obtidas utilizando coluna preparativa (Figura 36) foram analisadas por espectrometria de massa ESI (Q-TOF). Nestes experimentos, verificou-se que a fração registrada em 29,23 minutos correspondia ao Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>. A Figura 37 mostra o espectro de massa ESI (Q-TOF) obtido para a fração correspondente ao Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>. Dois picos principais são observados no espectro de massa, sendo um correspondente à carga +1 do Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>, cuja m/z 1485,80 Da, foi coincidente com a massa molecular teórica (1485,91 Da). O segundo pico do espectro corresponde à dupla carga do Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub> (m/z 742,90 Da).

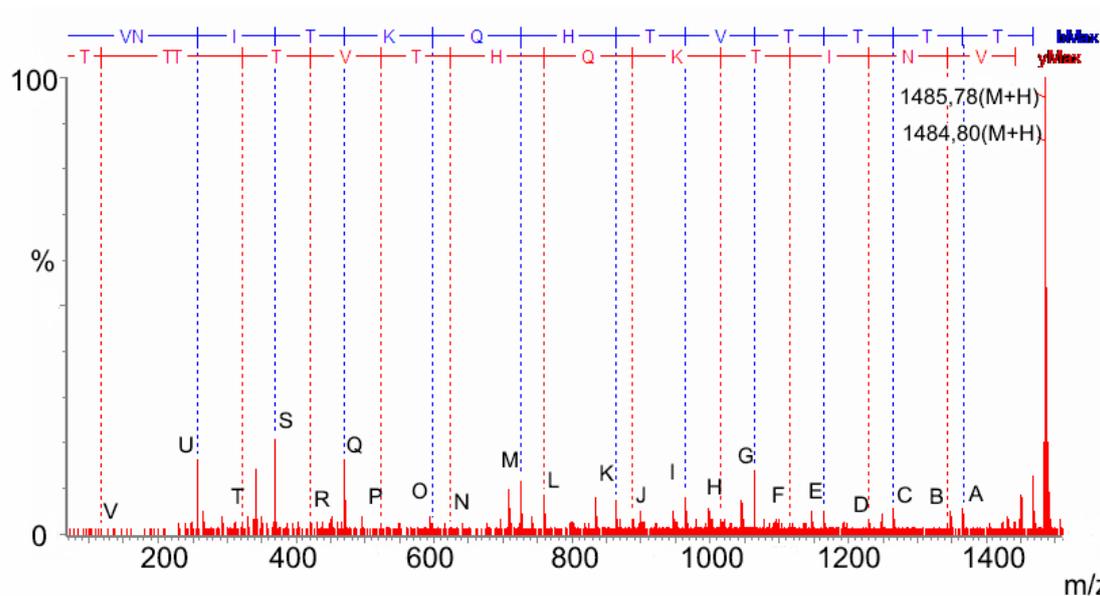
O espectro de massa obtido (Figura 37) indicou um bom grau de pureza do peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>, não sendo, portanto, necessária outra etapa de purificação (recromatografia em coluna analítica).



**Figura 37 – Espectro de massa ESI-MS (Q-TOF) para a fração cromatográfica correspondente ao peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>.** Fluxo: 1  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; Voltagem do capilar: 2,8 kV; Temperatura de dessolvatação: 25<sup>o</sup> C; Voltagem do cone: 40V.

Após caracterização pela massa molecular e verificação da pureza do peptídeo, foi registrado o espectro ESI-MS/MS (fragmentação) da fração cromatográfica correspondente ao Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>, para confirmação da sua seqüência (Figura 38). O método de fragmentação baseia-se basicamente em duas séries: a **série B** e a **série Y**, que são fragmentações em sentidos opostos. Na série B, a fragmentação ocorre no sentido C-terminal para o N-terminal (direita para esquerda), enquanto que na série Y, ocorre no sentido N-terminal para o C-terminal (esquerda para direita). A Tabela 11 relaciona os picos observados no espectro da Figura 38 com suas respectivas massas, seus fragmentos correspondentes e suas respectivas séries.

Observando o espectro MS/MS (figura 38), verificou-se que a seqüência obtida experimentalmente era coincidente com a seqüência delineada.



**Figura 38 – Espectro ESI-MS/MS para a fração cromatográfica correspondente ao peptídeo Ac-VNITHQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>.** Indicados em pontilhado azul, os fragmentos correspondentes à série b; Indicados em pontilhado vermelho, os fragmentos correspondentes à série y. Os fragmentos, representados por letras, estão caracterizados na tabela 11. Fluxo: 1  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; Voltagem do capilar: 2,8 kV; Voltagem do cone: 40 V; Energia de colisão: 30 eV; Temperatura de dessolvatação: 25<sup>o</sup> C.

**TABELA 11 – PICOS OBSERVADOS NO ESPECTRO MS/MS DO PEPTÍDEO Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>**

Pico	M/Z	Fragmento	Série
A	1365,80	Ac-VNITKQHTVTTT	B
B	1343,79	NITKQHTVTTTT-NH <sub>2</sub>	Y
C	1264,74	Ac-VNITKQHTVTT	B
D	1229,79	ITKQHTVTTTT-NH <sub>2</sub>	Y
E	1163,74	Ac-VNITKQHTVT	B
F	1116,39	TKQHTVTTTT-NH <sub>2</sub>	Y
G	1062,74	Ac-VNITKQHTV	B
H	1015,39	KQHTVTTTT-NH <sub>2</sub>	Y

**TABELA 11 – PICOS OBSERVADOS NO ESPECTRO MS/MS DO PEPTÍDEO  
Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub> (continuação)**

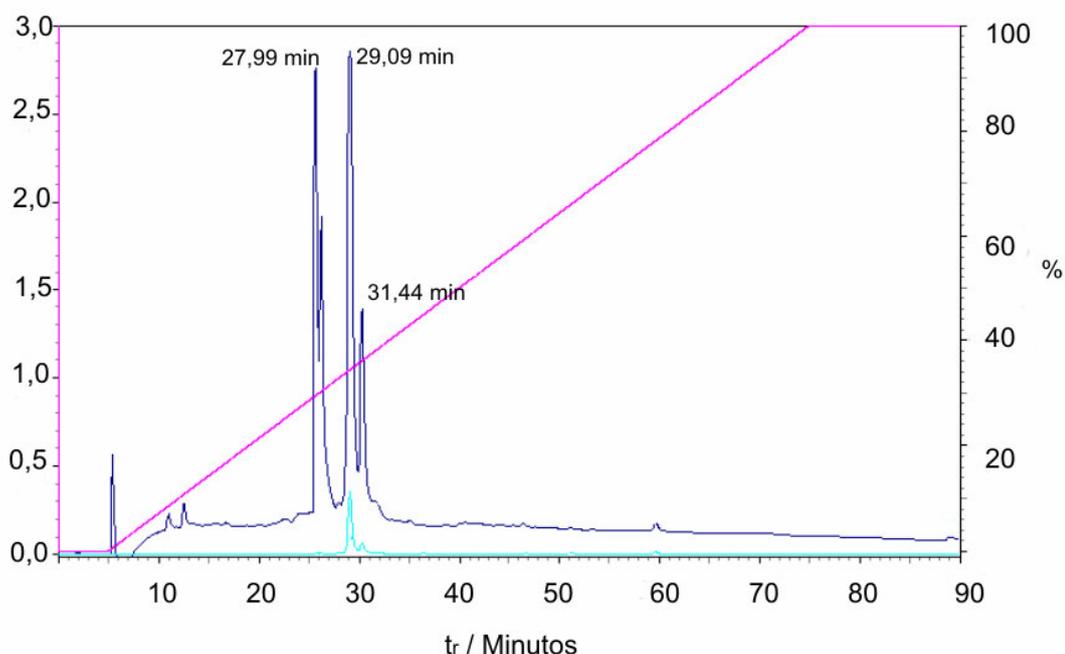
Pico	M/Z	Fragmento	Série
I	963,74	Ac-VNITKQHT	B
J	887,39	QHTVTTTT-NH <sub>2</sub>	Y
K	862,74	Ac-VNITKQH	B
L	759,39	HTVTTTT-NH <sub>2</sub>	Y
M	725,54	Ac-VNITKQ	B
N	622,19	TVTTTT-NH <sub>2</sub>	Y
O	597,54	Ac-VNITK	B
P	521,19	VTTTT-NH <sub>2</sub>	Y
Q	469,54	Ac-VNIT	B
R	422,19	TTTT-NH <sub>2</sub>	Y
S	368,54	Ac-VNI	B
T	321,19	TTT-NH <sub>2</sub>	Y
U	255,14	Ac-VN	B
V	119,19	T-NH <sub>2</sub>	Y

A partir dos resultados apresentados, podemos concluir que a síntese do peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub> foi eficiente (seqüência e massa molecular coincidentes) e que o mesmo encontra-se puro e adequado para os testes de interação com o Cu<sup>2+</sup>.

### 3.2 Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub>

O peptídeo Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub>, o qual possui uma massa molecular de 469 Da, foi purificado por RP-HPLC para eliminação de impurezas provenientes das etapas de síntese, clivagem e desproteção.

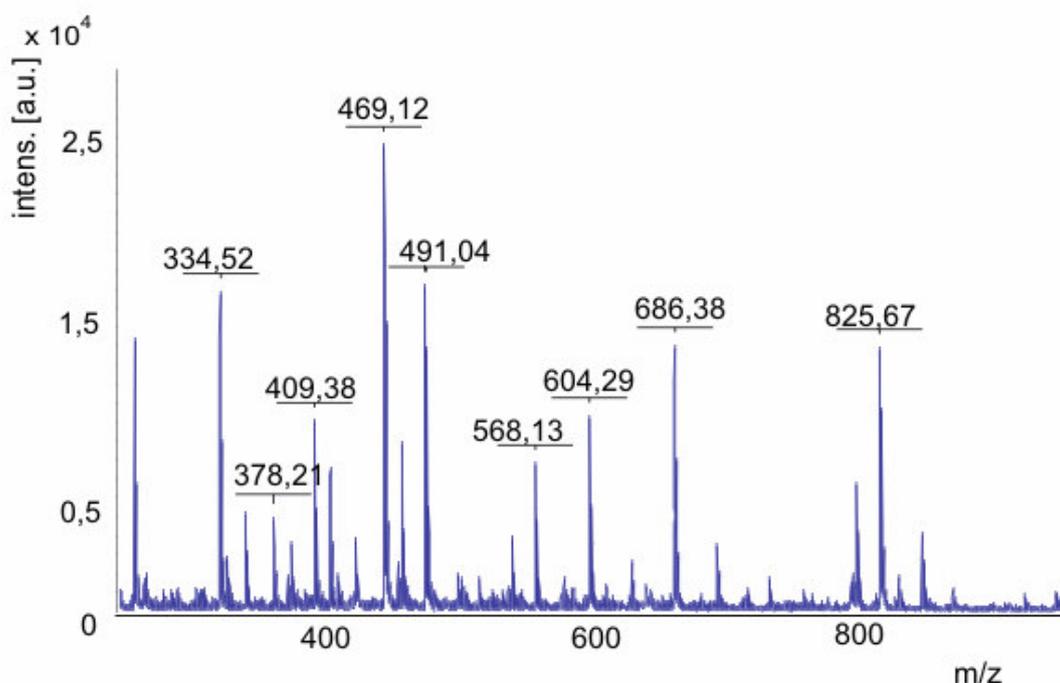
Inicialmente, realizou-se 4 corridas cromatográficas em coluna preparativa, utilizando os parâmetros experimentais definidos no capítulo anterior, para a purificação do Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub>. A Figura 39 mostra um dos cromatogramas obtidos para o Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub>, utilizando coluna preparativa, após as etapas de clivagem e desproteção. Três picos principais são observados no cromatograma, todos apresentando grande absorção em 216 nm, e um deles (com tempo de retenção em 29,09 minutos), apresentando ainda ligeira absorção em 280 nm, o que poderia indicar que este pico não seria o Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub>, pois este peptídeo não contém Triptofano (W) nem Tirosina (Y), aminoácidos que possuem grupos aromáticos em suas cadeias laterais.



**Figura 39 - Cromatograma obtido para o peptídeo Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub>.** Em azul, absorção em 216 nm; em verde, absorção em 280 nm; em rosa, gradiente de concentração do solvente B. Coluna: preparativa Vydac C<sub>18</sub> (10 $\mu$ , 2,2 x 25 cm); fluxo: 5,0 ml min<sup>-1</sup>; Temperatura: 22<sup>o</sup> C; Fase móvel: solvente A (TFA 0,1% em água), solvente B (TFA 0,1% em acetonitrila).

As frações cromatográficas, obtidas utilizando coluna preparativa (Figura 39), foram analisadas por espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF. Nestes experimentos, verificou-se que a fração registrada no cromatograma em 27,99

minutos, correspondia ao Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> (fração A). No entanto, essa fração ainda apresentava certo grau de impureza, conforme pode ser observado no espectro de massa ilustrado na Figura 40. Este resultado levou à realização de mais uma etapa de purificação, uma recromatografia em coluna analítica.

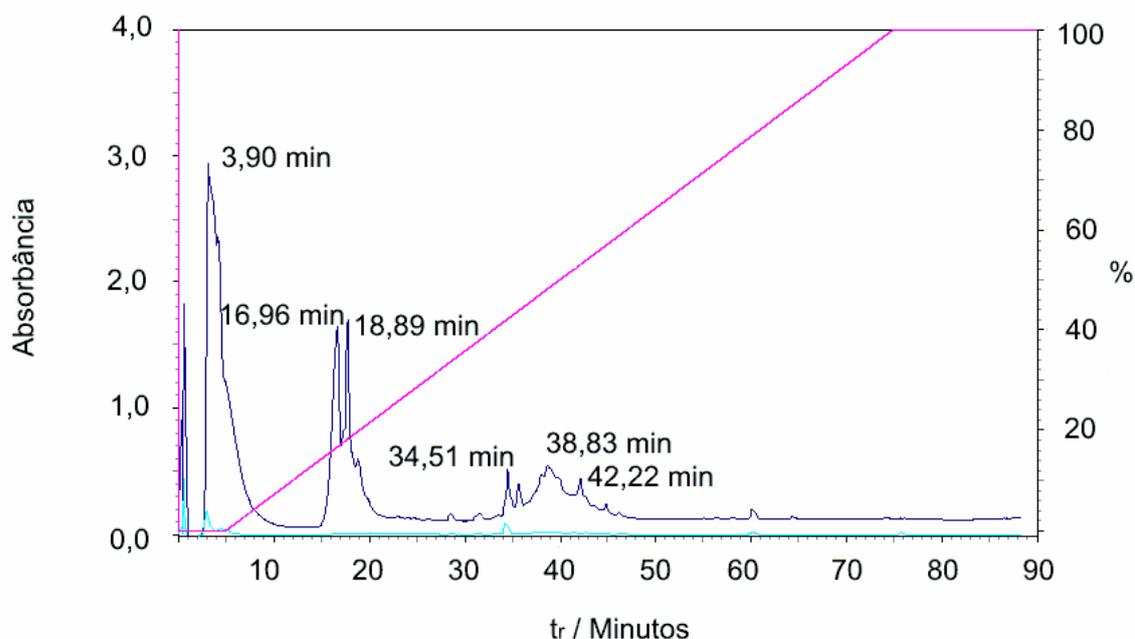


**Figura 40 – Espectro de massa MALDI-TOF para fração A - que continha o peptídeo Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> (469,12 Da).** Modo: refletor; Tipo de laser: N<sub>2</sub>, comprimento de onda 334 nm; Pressão no detector: 5,0 x 10<sup>-7</sup> mbar; Pressão na fonte de íons: 1,2 x 10<sup>-7</sup> mbar; Voltagem de aceleração: 13,8 kV; Matriz: α-ciano.

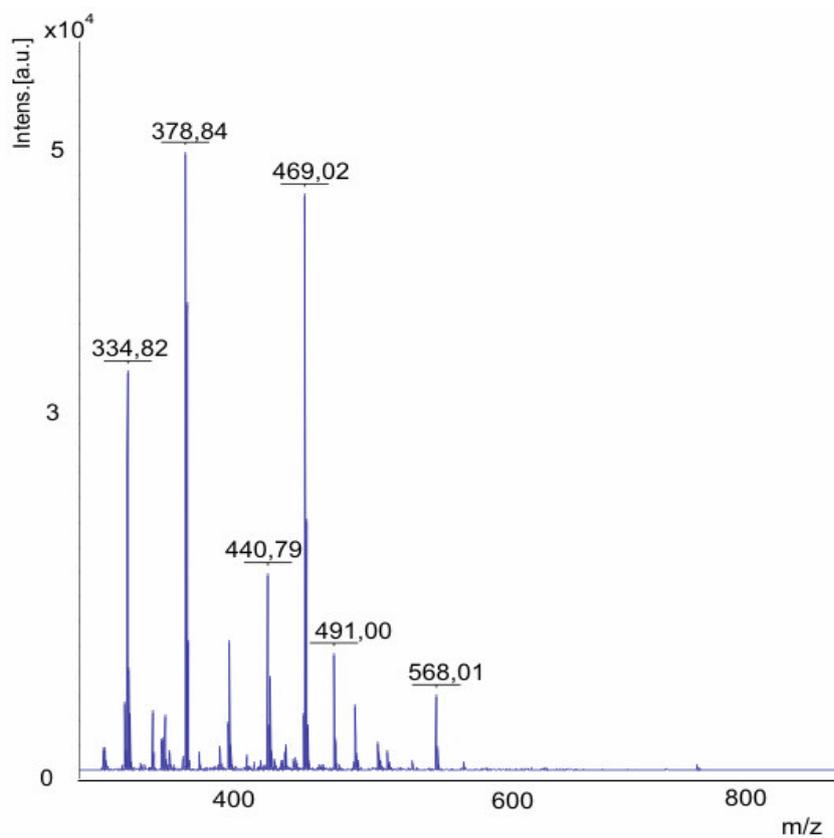
A Figura 41 mostra o cromatograma obtido na recromatografia da fração A. Quatro picos principais foram identificados no cromatograma, todos com considerável absorção em 216 nm, e praticamente nenhuma absorção em 280 nm, o que era esperado, pois o Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> não contém Triptofano (W) nem Tirosina (Y), aminoácidos que possuem grupos aromáticos em suas cadeias laterais. Em seguida, registrou-se o espectro de massa MALDI-TOF para cada fração cromatográfica obtida na recromatografia, e observou-se que o peptídeo Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> puro correspondia à fração registrada no cromatograma em 18,89 minutos (fração B). A Figura 42 mostra o espectro MALDI-TOF MS obtido para a fração B. Além do pico correspondente ao peptídeo Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> (469,02 Da), observou-se no espectro de massa os picos de massas 378,84; 440,79; 334,81; 568,00 Da, os quais correspondem à

matriz utilizada ( $\alpha$ -ciano). Identificou-se ainda no espectro de massa o pico de massa 491,00 Da, o qual pode ser atribuído à formação de um aduto de sódio com o Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub>, provavelmente devido à presença de íons Na<sup>+</sup> na água utilizada como solvente nos experimentos cromatográficos. Em seguida, o espectro de massa MALDI-TOF/TOF (fragmentação) para a fração B foi registrado, para verificação da seqüência do peptídeo Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> (Figura 43). A Tabela 12 relaciona os picos observados no espectro da Figura 43 com suas respectivas massas, seus fragmentos correspondentes e suas respectivas séries.

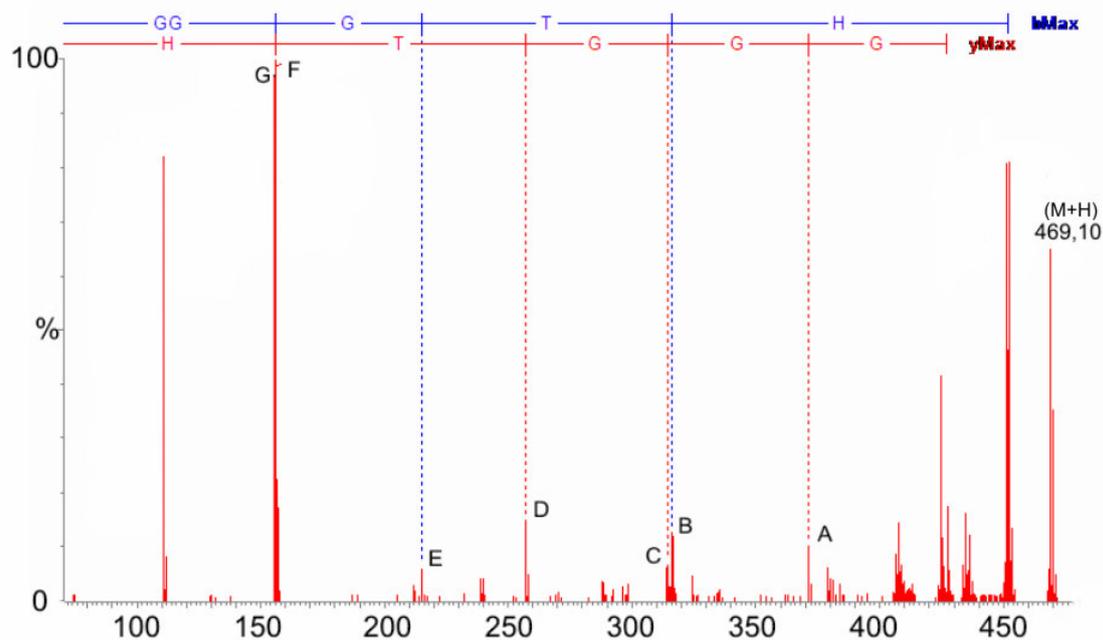
Analisando o espectro MS/MS, verificou-se que a seqüência obtida experimentalmente era coincidente com a seqüência delineada.



**Figura 41 - Cromatograma de recromatografia em coluna analítica para a fração A - que continha o peptídeo Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub>.** Em azul, absorção em 216 nm; em verde, absorção em 280 nm; em rosa, gradiente de concentração do solvente B. Coluna: analítica Vydac Dionex C<sub>18</sub> (5 $\mu$ , 1,6 x 25 cm) com pré-coluna Vydac C<sub>18</sub> (5 $\mu$ , 1,6 x 6 cm); fluxo: 1,0 ml min<sup>-1</sup>; Temperatura: 22<sup>o</sup> C; Fase móvel: solvente A (TFA 0,1% em água), solvente B (TFA 0,1% em acetonitrila).



**Figura 42 – Espectro de massa MALDI-TOF para a fração B – que continha o peptídeo Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> (469. 02 Da).** Modo: refletor; Tipo de laser: N<sub>2</sub>, comprimento de onda 334 nm; Pressão no detector: 5,0 x 10<sup>-7</sup> mbar; Pressão na fonte de íons: 1,2 x 10<sup>-7</sup> mbar; Voltagem de aceleração: 13,8 kV; Matriz:  $\alpha$ -ciano.



**Figura 43 – Espectro MALDI-TOF/TOF MS/MS para a fração B – que continha o peptídeo Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub>.** Indicados em pontilhado azul, os fragmentos correspondentes à série B; Indicados em pontilhado vermelho, os fragmentos correspondentes à série Y. Os fragmentos, representados por letras, estão caracterizados na tabela 12. Modo: refletor; Tipo de laser: N<sub>2</sub>, comprimento de onda 334 nm; Pressão no detector: 5,0 x 10<sup>-7</sup> mbar; Pressão na fonte de íons: 1,2 x 10<sup>-7</sup> mbar; Voltagem de aceleração: 13,8 kV; Energia de colisão: 60% da energia máxima do equipamento. Matriz: α-ciano.

**TABELA 12 - PICOS OBSERVADOS NO ESPECTRO MS/MS DO PEPTÍDEO Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub>**

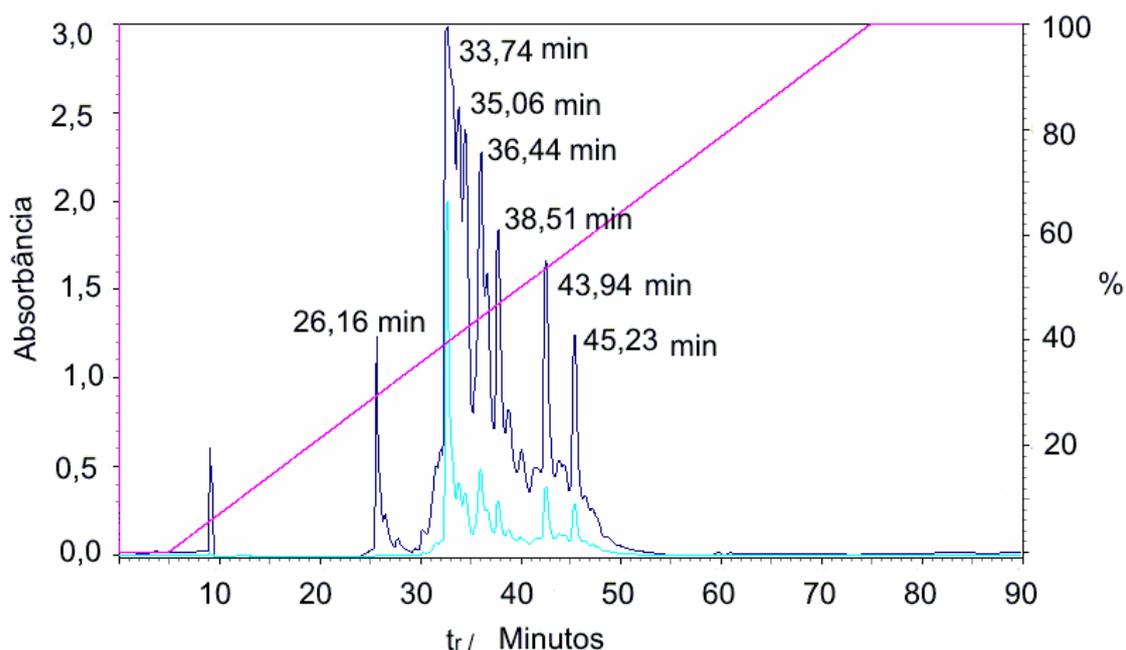
Pico	M/Z	Fragmento	Série
A	370,09	GGTH-NH <sub>2</sub>	Y
B	313,81	Ac-GGGT	B
C	313,09	GTH-NH <sub>2</sub>	Y
D	256,09	TH-NH <sub>2</sub>	Y
E	212,81	Ac-GGG	B
F	155,88	Ac-GG	B
G	155,86	H-NH <sub>2</sub>	Y

A partir dos resultados apresentados, podemos concluir que a síntese do peptídeo Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> foi eficiente (seqüência e massa molecular coincidente) e que o mesmo encontra-se puro e adequado para os testes de interação com o Cu<sup>2+</sup>.

### **3.3 Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub>**

O peptídeo Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub>, o qual possui uma massa molecular de 836 Da, foi purificado por RP-HPLC para a eliminação de impurezas provenientes das etapas de síntese, clivagem e desproteção.

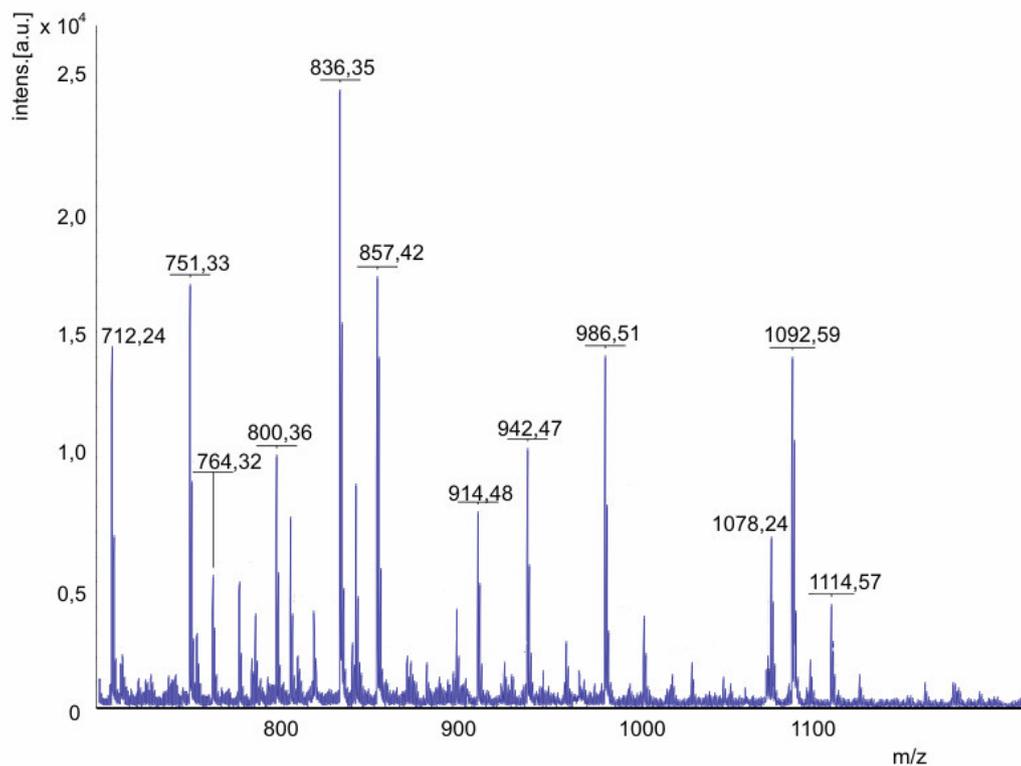
Inicialmente, realizou-se 7 corridas cromatográficas em coluna preparativa, utilizando os parâmetros experimentais definidos no capítulo anterior para a purificação do Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub>. A Figura 44 mostra um dos cromatogramas obtidos para o Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub>, utilizando coluna preparativa, após as etapas de clivagem e desproteção. Vários picos foram observados no cromatograma, todos apresentando grande absorção em 216 e 280 nm. Este resultado era o esperado, pois o Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> possui Triptofano (W) em sua seqüência, e os reagentes utilizados nas etapas de clivagem e desproteção (Fenol e Tioanisol) possuem grupos aromáticos.



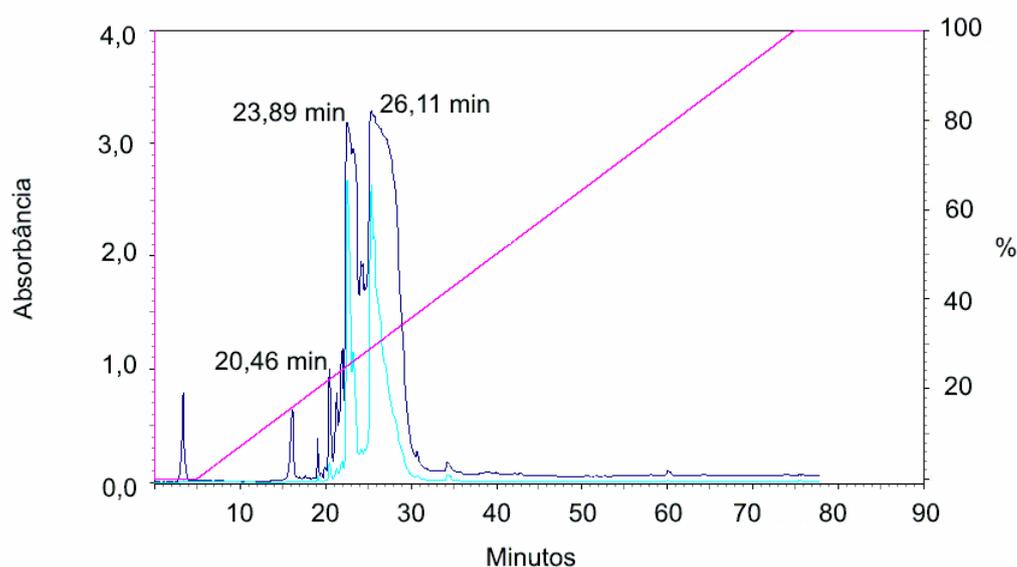
**Figura 44 – Cromatograma obtido para o peptídeo Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub>.** Em azul, absorção em 216 nm; em verde, absorção em 280 nm; em rosa, gradiente de concentração do solvente B. Coluna: preparativa Vydac C<sub>18</sub> (10 $\mu$ , 2,2 x 25 cm); fluxo: 5,0 ml min<sup>-1</sup>; Temperatura: 22<sup>o</sup> C; Fase móvel: solvente A (TFA 0,1% em água), solvente B (TFA 0,1% em acetonitrila).

As frações cromatográficas obtidas utilizando coluna preparativa foram analisadas por espectrometria de massa MALDI-TOF. Nestes experimentos, verificou-se que a fração registrada em 33,74 minutos, correspondia ao Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> (fração C). No entanto, essa fração apresentava ainda alto grau de impureza, conforme pode ser observado no espectro de massa ilustrado na Figura 45.

Este resultado levou à realização de mais uma etapa de purificação, uma recromatografia em coluna analítica. A Figura 46 mostra o cromatograma obtido na recromatografia da fração C.

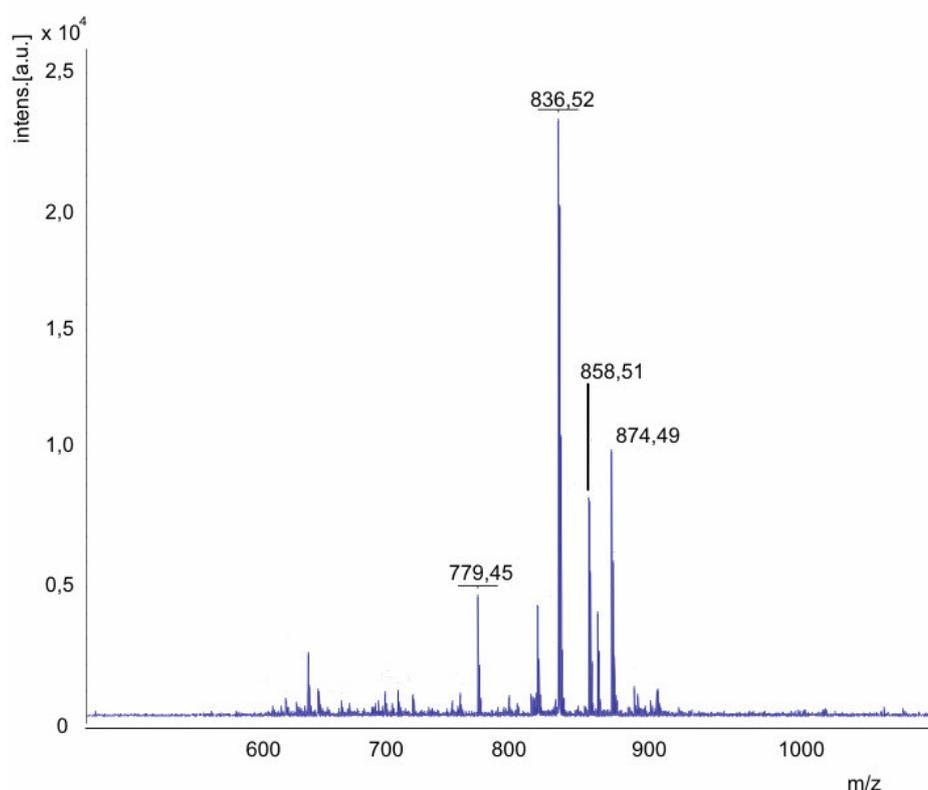


**Figura 45 – Espectro de massa MALDI-TOF/TOF para fração C - que continha o peptídeo Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> (836,35 Da).** Modo: refletor; Tipo de laser: N<sub>2</sub>, comprimento de onda 334 nm; Pressão no detector:  $5,0 \times 10^{-7}$  mbar; Pressão na fonte de íons:  $1,2 \times 10^{-7}$  mbar; Voltagem de aceleração: 13,8 kV; Matriz:  $\alpha$ -ciano.



**Figura 46 – Cromatograma de recromatografia em coluna analítica para a fração C - que continha o peptídeo Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub>.** Em azul, absorção em 216 nm; em verde, absorção em 280 nm; em rosa, gradiente de concentração do solvente B. Coluna: analítica Vydac Dionex C<sub>18</sub> (5 $\mu$ , 1,6 x 25 cm) com pré-coluna Vydac C<sub>18</sub> (5 $\mu$ , 1,6 x 6 cm); fluxo: 1,0 ml min<sup>-1</sup>; Temperatura: 22<sup>o</sup> C; Fase móvel: solvente A (TFA 0,1% em água), solvente B (TFA 0,1% em acetonitrila).

Foram observados no cromatograma três picos principais, todos com absorção considerável em 216 nm e dois deles com absorção considerável em 280 nm, o que era esperado, pois o Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> possui Triptofano (W) em sua seqüência. Em seguida, registrou-se o espectro de massa MALDI-TOF para as frações cromatográficas obtidas na recromatografia, e observou-se que o peptídeo Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> puro correspondia à fração registrada em 23,89 minutos (fração D). A Figura 47 mostra o espectro de massa MALDI-TOF obtido para a fração D.

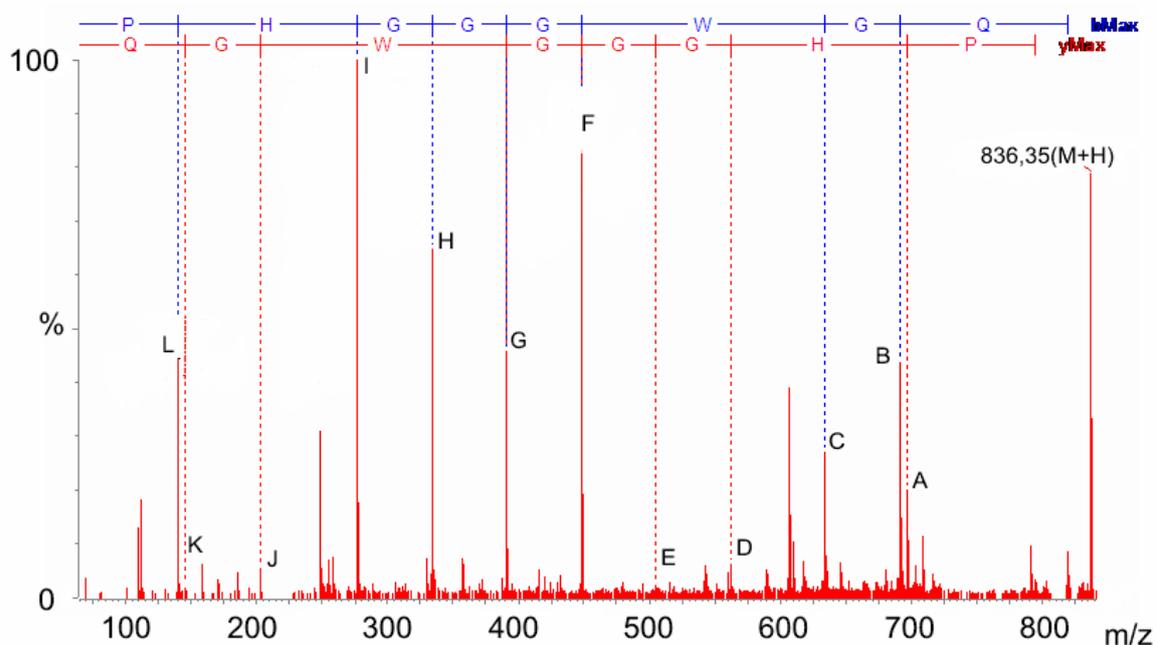


**Figura 47 - Espectro MALDI-TOF/TOF para a fração D – que continha o peptídeo Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub>.** Modo: refletor; Tipo de laser: N<sub>2</sub>, comprimento de onda 334 nm; Pressão no detector: 5,0 x 10<sup>-7</sup> mbar; Pressão na fonte de íons: 1,2 x 10<sup>-7</sup> mbar; Voltagem de aceleração: 13,8 kV; Matriz: α-ciano.

Observou-se no espectro de massa, além do pico correspondente ao Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> (836,52 Da), outros picos com menor intensidade. Os picos de massa 858,51 e 874,49 Da podem ser atribuídos a adutos de peptídeo formados com íons sódio e potássio, respectivamente, que provavelmente são provenientes da água utilizada como solvente nos experimentos

cromatográficos. O pico observado com massa 779,45 Da corresponde a um pequeno peptídeo subproduto, com um resíduo de glicina a menos. Em seguida, o espectro de massa MALDI-TOF/TOF (fragmentação) para a fração D foi registrado, para verificação da seqüência do peptídeo Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> (Figura 48). A Tabela 13 relaciona os picos observados no espectro da Figura 48 com suas respectivas massas, seus fragmentos correspondentes e suas respectivas séries.

Analisando o espectro MS/MS, verificou-se que a seqüência obtida experimentalmente era coincidente com a seqüência delineada.



**Figura 48 - Espectro MALDI-TOF/TOF MS/MS para a fração D – que continha o peptídeo Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> (836,35 Da).** Indicados em pontilhado azul, os fragmentos correspondentes à série B; Indicados em pontilhado vermelho, os fragmentos correspondentes à série Y. Os fragmentos, representados por letras, estão caracterizados na tabela 13. Modo: refletor; Tipo de laser: N<sub>2</sub>, comprimento de onda 334 nm; Pressão no detector: 5,0 x 10<sup>-7</sup> mbar; Pressão na fonte de íons: 1,2 x 10<sup>-7</sup> mbar; Voltagem de aceleração: 13,8 kV; Energia de colisão: 60% da energia máxima do equipamento. Matriz: α-ciano.

**TABELA 13 - PICOS OBSERVADOS NO ESPECTRO MS/MS DO PEPTÍDEO  
Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub>**

Pico	M/Z	Fragmento	Série
A	697,34	HGGGWGQ-NH <sub>2</sub>	Y
B	690,35	Ac-PHGGGWG	B
C	633,35	Ac-PHGGGW	B
D	560,14	GGGWGQ-NH <sub>2</sub>	Y
E	503,14	GGWGQ-NH <sub>2</sub>	Y
F	448,04	Ac-PHGGG e GWGQ-NH <sub>2</sub>	B e Y
G	390,97	Ac-PHGG e WGQ-NH <sub>2</sub>	B e Y
H	333,97	Ac-PHG	B
I	276,98	Ac-PH	B
J	204,97	GQ-NH <sub>2</sub>	Y
K	147,97	Q-NH <sub>2</sub>	Y
L	139,97	Ac-P	B

A partir dos resultados apresentados, podemos concluir que a síntese do peptídeo Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> foi eficiente (seqüência e massa molecular coincidente) e que o mesmo encontra-se puro e adequado para os testes de interação com o Cu<sup>2+</sup>.

#### **4. Padronização dos peptídeos do prion**

As soluções dos peptídeos do prion para uso nas análises voltamétricas foram previamente padronizadas através do uso da espectrofotometria UV-Vis.

Para Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub> e Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub>, partindo-se do método de Murphy e Kies (72), foi possível calcular o valor de suas concentrações nas soluções por meio das seguintes equações:

$$K = (A_{215} - A_{225}) \cdot 144 \quad (8)$$

$$T = (A_{205}) \cdot 31 \quad (9)$$

$$(K + T) / 2 = C \text{ (mg L}^{-1}\text{)} \quad (10)$$

A tabela 14 mostra os valores de absorvância obtidos para as soluções dos peptídeos Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub> e Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> nos comprimentos de onda 205, 215 e 225 nm.

**TABELA 14 – VALORES DE ABSORBÂNCIA DETERMINADOS PARA OS PEPTÍDEOS Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub> E Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub>**

Peptídeo	A <sub>205 nm</sub>	A <sub>215 nm</sub>	A <sub>225 nm</sub>
Ac-VNITKQHTVTTTT-NH <sub>2</sub>	0,658	0,302	0,004
Ac-GGGTH-NH <sub>2</sub>	0,528	0,283	0,109

Substituindo-se os valores de absorvância descritos na tabela 14, nas equações 8, 9 e 10, os valores de concentração encontrados para as soluções dos peptídeos foram:

Peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>

$$C = (K + T) / 2 = 31,655 \text{ mg L}^{-1}$$

Considerando o fator de diluição (x40), C = 1266,2 mg L<sup>-1</sup>

Fazendo a conversão para mol L<sup>-1</sup>, tem-se: C = 8,527 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>.

Peptídeo Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub>

$$C = (K + T) / 2 = 20,71 \text{ mg L}^{-1}$$

Considerando o fator de diluição (x2), C = 41,42 mg L<sup>-1</sup>

Fazendo a conversão para mol L<sup>-1</sup>, tem-se: C = 8,831 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>.

Para o peptídeo Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub>, partindo-se da Lei de Beer e determinando-se previamente o valor de sua absorvidade molar (ε) pelo método de Edelhoch, foi possível calcular o valor de sua concentração na solução por meio da seguinte equação:

$$A = \epsilon b C \quad (11)$$

$A = 0,026$  (absorbância da solução de Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> a 280 nm)

$b = 1$  cm (espessura da cubeta)

$\epsilon = \epsilon(280 \text{ nm}) (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}) = (\text{número de triptofanos} = 1)(5500) + (\text{número de tirosinas} = 0)(1490) + (\text{número de cistinas} = 0)(125) = 5500 \text{ L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$

Substituindo-se os valores de  $A$ ,  $b$  e  $\epsilon$  determinados experimentalmente, o valor de concentração encontrado para a solução do peptídeo Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> foi:

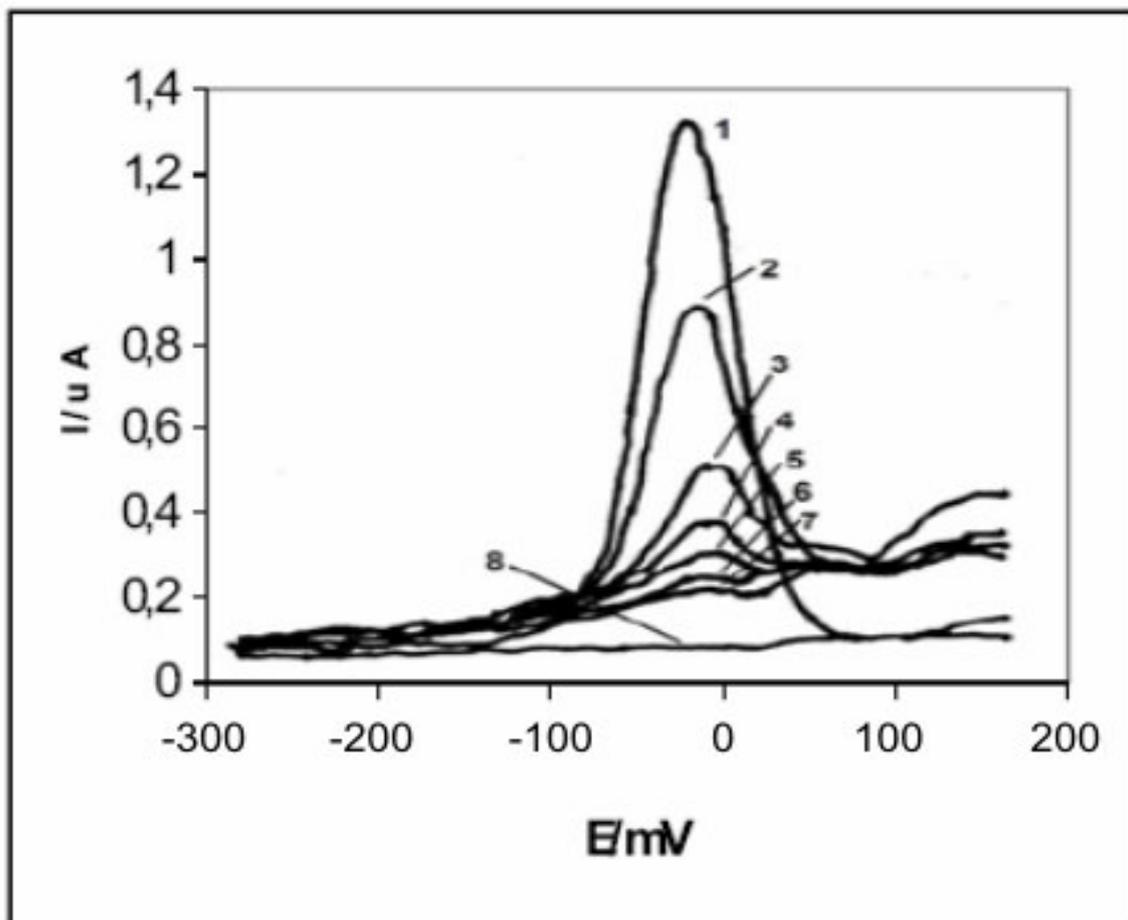
$$C = A / \epsilon b = 4,782 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$$

Considerando o fator de diluição (x2),  $C = 9,564 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .

## 5. Interação do cobre com os peptídeos do prion

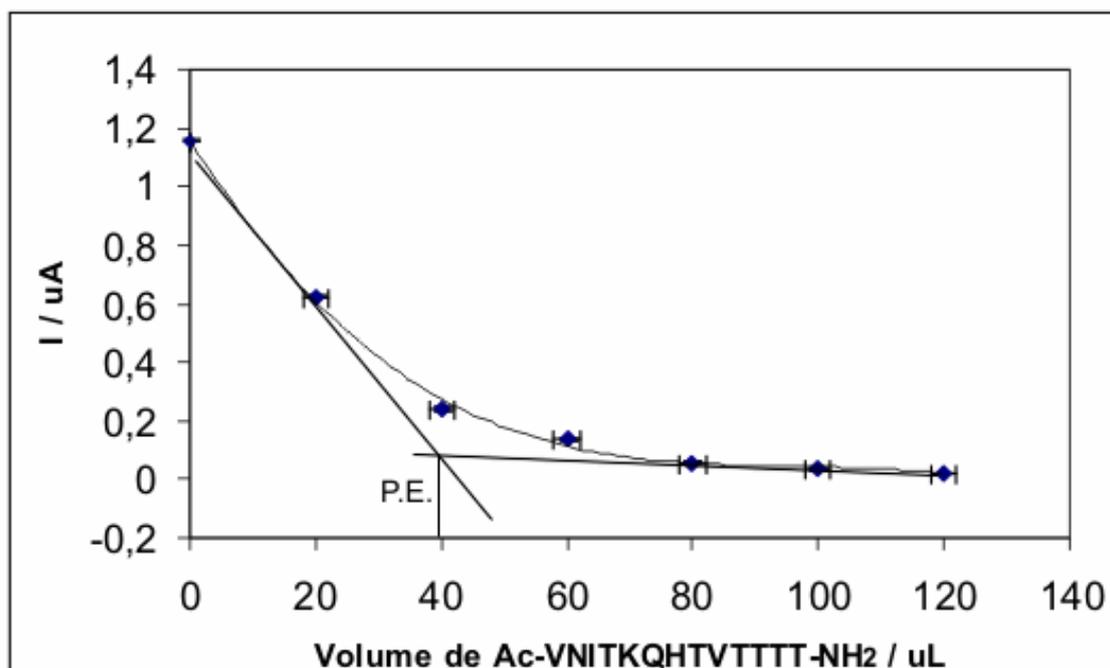
### 5.1 Sistema Cu<sup>2+</sup> - Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>

A Figura 49 mostra os voltamogramas obtidos para 10  $\mu\text{L}$  de Cu<sup>2+</sup>  $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em KNO<sub>3</sub>  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  na ausência (curva 1) e na presença (curvas 2 a 7) do peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>. Observou-se um decaimento progressivo do sinal da corrente de difusão do cobre na presença do peptídeo, indicando a existência da interação entre o Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub> e íons Cu<sup>2+</sup>.



**Figura 49 – Voltamogramas para o  $\text{Cu}^{2+}$  ( $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) na ausência (curva 1) e na presença de Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub> (curvas 2 a 7) em  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Curva 2: [peptídeo] =  $8,527 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ; curva 3: [peptídeo] =  $1,7054 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ; curva 4: [peptídeo] =  $2,5581 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ; curva 5: [peptídeo] =  $3,4108 \times 10^{-6}$ ; curva 6: [peptídeo] =  $4,2635 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ; curva 7: [peptídeo] =  $5,1162 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Curva 8:  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .  $E_i = -300 \text{ mV}$ ;  $E_f = +200 \text{ mV}$ ;  $E_d = -300 \text{ mV}$ ;  $t_d = 90 \text{ s}$ ;  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ; Eletrodo de trabalho: HMDE; Eletrodo de referência: Ag / AgCl ( $\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$ ).**

Com base nos voltamogramas obtidos para o  $\text{Cu}^{2+}$  na ausência e na presença do peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>, traçou-se a curva de titulação amperométrica, para a determinação do ponto de equivalência (Figura 50).



**Figura 50** – Curva de titulação amperométrica do  $\text{Cu}^{2+}$  com o peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-  $\text{NH}_2$ . Adições sucessivas de 20, 40, 60, 80, 100 e 120  $\mu\text{L}$  de Ac-VNITKQHTVTTTT- $\text{NH}_2$   $8,527 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .  $n_d = 3$  determinações.

Tomando como base o gráfico da titulação amperométrica, que indicou o ponto de equivalência em 39,46  $\mu\text{L}$  de Ac-VNITKQHTVTTTT- $\text{NH}_2$   $8,527 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , calculou-se a estequiometria do sistema:

(Número de mols de  $\text{Cu}^{2+}$ ) / X = (Número de mols de Ac-VNITKQHTVTTTT- $\text{NH}_2$ )

$$\frac{4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \times 10 \times 10^{-6} \text{ L}}{X} = 8,527 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \times 39,46 \times 10^{-6} \text{ L}$$

$$X = 1,189 \text{ (estequiometria).}$$

Com base neste cálculo, pôde-se dizer que a estequiometria encontrada para o sistema  $\text{Cu}^{2+}$  - Ac-VNITKQHTVTTTT- $\text{NH}_2$  foi de 1  $\text{Cu}$  : 1 Ac-VNITKQHTVTTTT- $\text{NH}_2$ . Este resultado era o esperado, pois está coincidente com a literatura, conforme propôs o trabalho de Brown e colaboradores (31).

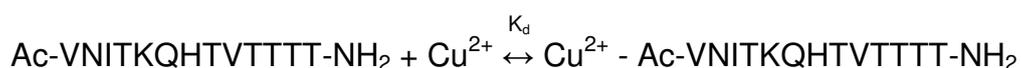
A comprovação da interação entre o íon  $\text{Cu}^{2+}$  e o Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub> sugere que ocorre a formação de um complexo entre o cobre (II) e o prion na região correspondente aos resíduos 180 a 193. Devido à afinidade entre o  $\text{Cu}^{2+}$  e o nitrogênio do anel imidazólico de histidina, provavelmente este complexo é formado na região central do peptídeo, com o  $\text{Cu}^{2+}$  se ligando ao resíduo de histidina da seqüência VNITKQHTVTTTT. Maiores detalhes em relação à esfera de coordenação desse complexo não estão disponíveis na literatura.

Como mencionado anteriormente, uma das etapas do trabalho é a obtenção de dados experimentais, que permitam o cálculo do valor da constante de dissociação dos complexos peptídeos do prion – cobre(II). A determinação deste parâmetro tem grande importância na compreensão do envolvimento dos íons cobre(II) nas alterações conformacionais que levam ao aparecimento do Prpsc.

São propostas duas metodologias para o cálculo da constante de dissociação ( $K_d$ ) do complexo  $\text{Cu}^{2+}$  - Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>: **Lei da ação das massas e Titulação Amperométrica.**

### Lei da ação das massas

A reação de complexação do Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub> com o íon cobre(II) pode ser representada por:



e, segundo a Lei da ação das massas, a constante de dissociação da reação ( $K_d$ ) pode ser calculada pela seguinte equação:

$$K_d = [\text{Ac-VNITKQHTVTTTT-NH}_2] [\text{Cu}^{2+}] / [\text{Cu}^{2+} - \text{Ac-VNITKQHTVTTTT-NH}_2] \quad (12)$$

Considerando que no ponto de equivalência  $[\text{Ac-VNITKQHTVTTTT-NH}_2] = [\text{Cu}^{2+}]$ , então

$$K_d = [\text{Cu}^{2+}]^2 / [\text{Cu}^{2+} - \text{Ac-VNITKQHTVTTTT-NH}_2] \quad (13)$$

onde

$[Cu^{2+}]$  = concentração de cobre livre no ponto de equivalência em mol L<sup>-1</sup>

$[Cu^{2+} - Ac-VNITKQHTVTTTT-NH_2]$  = concentração de peptídeo no ponto de equivalência em mol L<sup>-1</sup>.

A constante de dissociação para o complexo do Cu<sup>2+</sup> com o Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub> foi calculada a partir dos dados das titulações amperométricas e da equação (13). Os resultados obtidos são apresentados na tabela 15.

**TABELA 15 – CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO OBTIDAS ATRAVÉS DO MÉTODO LEI DA AÇÃO DAS MASSAS**

nº	$[Cu^{2+}] / mol L^{-1}$	$[Cu^{2+}-Ac-VNITKQHTVTTTT-NH_2]$	$K_d / mol L^{-1}$
1	$2,674 \times 10^{-7}$	$1,682 \times 10^{-6}$	$4,251 \times 10^{-8}$
2	$2,051 \times 10^{-7}$	$1,768 \times 10^{-6}$	$2,379 \times 10^{-8}$
3	$3,218 \times 10^{-7}$	$1,597 \times 10^{-6}$	$6,484 \times 10^{-8}$
Média	$2,648 \times 10^{-7} \pm 5,839 \times 10^{-8}$	$1,682 \times 10^{-6} \pm 8,550 \times 10^{-8}$	$4,371 \times 10^{-8} \pm 2,055 \times 10^{-8}$

### Titulação amperométrica

Saroff e Mark (73) estudaram a reação de complexação do Zn<sup>2+</sup> e do Hg<sup>2+</sup> com a albumina sérica bovina por polarografia de pulso diferencial. A metodologia baseia-se em titulações amperométricas e em experimentos de diálise. A equação utilizada para o cálculo da constante de associação (K) das reações foi a seguinte:

$$(C_0 - C) / P = (K.C.n) / (1 + K.C) \quad (14)$$

onde

C<sub>0</sub> = concentração do íon metálico total

C = concentração do metal livre

P = concentração de peptídeo total

n = número de sítios

K = constante de associação da reação (inverso de  $K_d$ )

Esta relação que descreve o método da Titulação Amperométrica foi obtida experimentalmente (73), levando em consideração o comportamento gráfico entre diferentes concentrações de íons metálicos vs. diferentes números de sítios em proteínas ligantes.

Para o cálculo da constante de dissociação da reação de complexação do  $\text{Cu}^{2+}$  com o peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub> utilizou-se a equação (14) adotando os seguintes parâmetros experimentais:

$C_0$  = concentração de cobre total

C = concentração de cobre livre no ponto de equivalência

P = concentração de Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub> no ponto de equivalência

n = 1 (um possível sítio para metais,  $\text{Cu}^{2+}$ )

Os valores de  $K_d$  obtidos para as titulações amperométricas do cobre com o peptídeo Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>, são mostrados na tabela 16.

**TABELA 16 – VALORES DE  $K_d$  OBTIDOS ATRAVÉS DO MÉTODO DE TITULAÇÃO AMPEROMÉTRICA**

nº	$[C_0] / \text{mol L}^{-1}$	$[C] / \text{mol L}^{-1}$	$[P] / \text{mol L}^{-1}$	$K_d / \text{mol L}^{-1}$
1	$2,000 \times 10^{-6}$	$2,674 \times 10^{-7}$	$1,682 \times 10^{-6}$	$2,727 \times 10^{-9}$
2	$2,000 \times 10^{-6}$	$2,051 \times 10^{-7}$	$1,768 \times 10^{-6}$	$2,072 \times 10^{-9}$
3	$2,000 \times 10^{-6}$	$3,218 \times 10^{-7}$	$1,597 \times 10^{-6}$	$3,251 \times 10^{-9}$
Média	$2,000 \times 10^{-6}$	$2,648 \times 10^{-7} \pm$ $5,839 \times 10^{-8}$	$1,682 \times 10^{-6} \pm$ $8,550 \times 10^{-8}$	$2,683 \times 10^{-9} \pm$ $5,907 \times 10^{-10}$

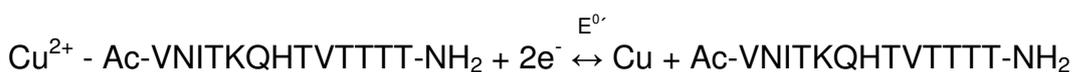
Os valores médios de  $K_d$  obtidos nos dois métodos de cálculo são mostrados na tabela 17.

**TABELA 17 – VALORES DE  $K_d$** 

<b>Método</b>	<b><math>K_d / \text{mol L}^{-1}</math></b>
Lei da ação das massas	$4,371 \times 10^{-8}$
Titulação amperométrica	$2,683 \times 10^{-9}$

Os valores de  $K_d$  obtidos utilizando a Lei da ação das massas e titulação amperométrica não podem ser considerados semelhantes. Neste caso, devemos levar em consideração os baixos valores de  $K_d$  ( $10^{-8} - 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ), onde uma diferença relativa de uma ordem de grandeza de 10 é algo significativo. Enquanto que a Lei da ação das massas leva em consideração as concentrações das espécies envolvidas, o método Titulação amperométrica, além destas variáveis, consideram parâmetros físico-químicos, tais como número de sítios de metais por molécula de peptídeo.

Com base nos valores de  $K_d$ , outro parâmetro pode ser calculado para o sistema  $\text{Cu}^{2+} - \text{Ac-VNITKQHTVTTTT-NH}_2$ , o **potencial padrão de redução** do cobre(II) na presença do peptídeo  $\text{Ac-VNITKQHTVTTTT-NH}_2$  ( $E^{0'}$ ):



A equação de Nernst para a redução do cobre (II) na presença do peptídeo é representada por:

$$E = E^{0'} + (0,059/2) \log ( [\text{Cu}^{2+} - \text{Ac-VNITKQHTVTTTT-NH}_2] / [\text{Ac-VNITKQHTVTTTT-NH}_2] ) \quad (15)$$

Considerando também a redução do cobre (II) na ausência do peptídeo:



A equação de Nernst para a redução do cobre (II) na ausência do peptídeo é representada por:

$$E = E^0 + (0,059/2) \log [\text{Cu}^{2+}] \quad (16)$$

Onde  $E^0$  representa o potencial padrão de redução do cobre (II), tabelado para 1 atm de pressão, 25° C e concentração de  $\text{Cu}^{2+}$  de 1 mol L<sup>-1</sup>, vs. eletrodo padrão de hidrogênio, com o valor de + 0,34 V.

Isolando e substituindo o termo  $[\text{Cu}^{2+}]$  da equação (16), na equação (12) que descreve a definição de  $K_d$ , e posteriormente igualando-se com a equação (15), tem-se a relação entre  $K_d$  e  $E^{0'}$ :

$$E^{0'} = E^0 + 0,0295 \log K_d \quad (17)$$

Substituindo os valores de  $K_d$  da tabela 17, o valor de  $E^0$  (0,34 V) na equação (17) e posteriormente convertendo os resultados para o eletrodo de referência utilizado (+ 0,22 V), obtêm-se os valores de  $E^{0'}$  (tabela 18):

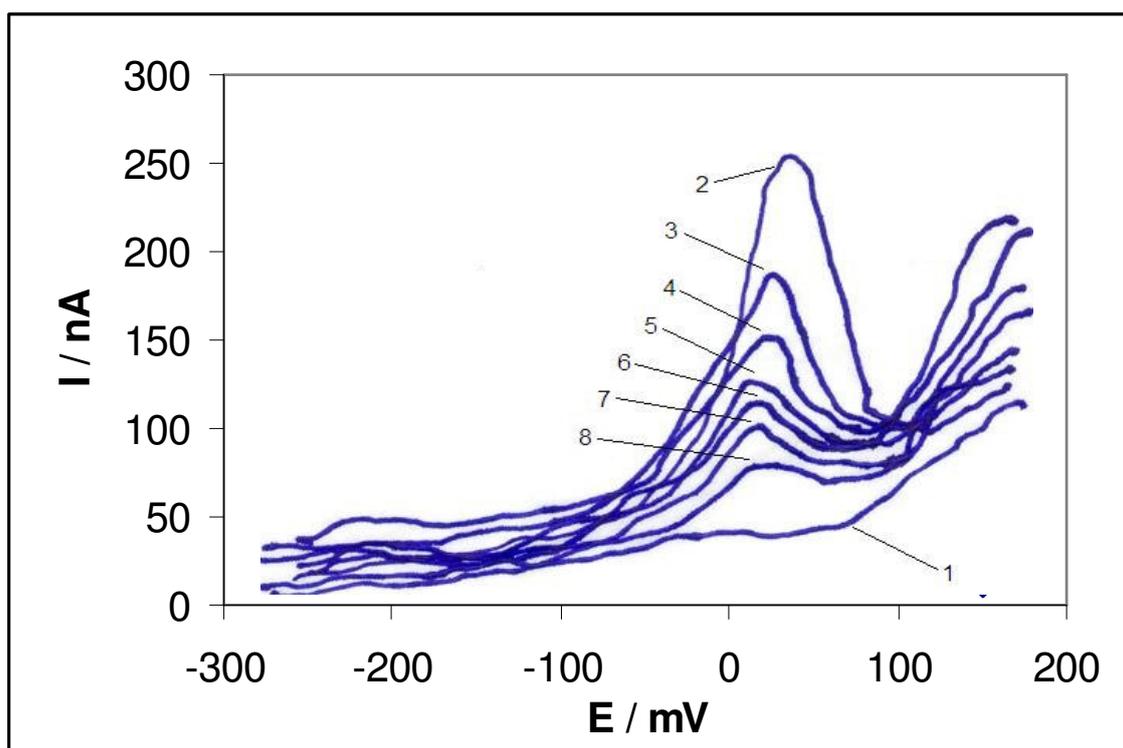
**TABELA 18 – VALORES DE POTENCIAL PADRÃO DE REDUÇÃO PARA O SISTEMA  $\text{Cu}^{2+}$  - Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>**

Método	$K_d / \text{mol L}^{-1}$	$E^{0'} / \text{V}$
Lei da ação das massas	$4,371 \times 10^{-8}$	0,343
Titulação amperométrica	$2,683 \times 10^{-9}$	0,307

Os valores de  $E^{0'}$  (Tabela 18), os quais encontram-se acima de + 300 mV, e portanto fora do domínio de eletroatividade do eletrodo de mercúrio, justificam a ausência de um sinal voltamétrico característico do complexo Cu – Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub> nos voltamogramas da Figura 49.

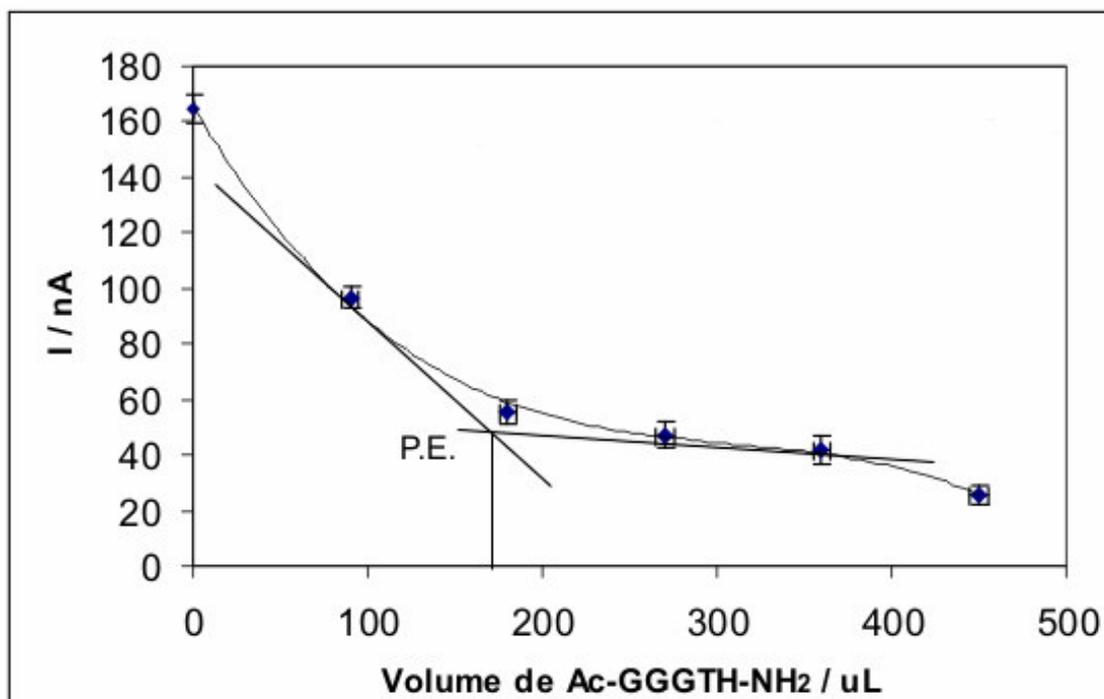
## 5.2 Sistema $\text{Cu}^{2+}$ - Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub>

A Figura 51 mostra os voltamogramas obtidos para 5,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{Cu}^{2+}$   $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  na ausência (curva 2) e na presença (curvas 3 a 8) do peptídeo Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub>. Observou-se um decaimento progressivo do sinal da corrente de difusão do cobre na ausência do peptídeo, indicando a existência da interação entre o Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> e os íons  $\text{Cu}^{2+}$ .



**Figura 51 – Voltamogramas para o  $\text{Cu}^{2+}$  ( $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) na ausência (curva 2) e na presença de Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> (curvas 3 a 8) em  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Curva 3: [peptídeo] =  $3,9740 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ; curva 4: [peptídeo] =  $7,9479 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ; curva 5: [peptídeo] =  $1,1922 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ; curva 6: [peptídeo] =  $1,5896 \times 10^{-6}$ ; curva 7: [peptídeo] =  $1,9870 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ; curva 8: [peptídeo] =  $2,3844 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Curva 1:  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .  $E_i = -300 \text{ mV}$ ;  $E_f = +200 \text{ mV}$ ;  $E_d = -300 \text{ mV}$ ;  $t_d = 90 \text{ s}$ ;  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ; Eletrodo de trabalho: HMDE; Eletrodo de referência: Ag / AgCl ( $\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$ ).**

Com base nos voltamogramas obtidos para o  $\text{Cu}^{2+}$  na ausência e na presença do peptídeo Ac-GGGTH- $\text{NH}_2$ , traçou-se a curva de titulação amperométrica, para a determinação do ponto de equivalência (Figura 52).



**Figura 52 – Curva de titulação amperométrica do  $\text{Cu}^{2+}$  com o peptídeo Ac-GGGTH-  $\text{NH}_2$ .** Adições sucessivas de 90, 180, 270, 360, 450 e 540  $\mu\text{L}$  de Ac-GGGTH- $\text{NH}_2$   $8,831 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . <sup>1</sup>.  $n_d = 3$  determinações.

Tomando como base o gráfico da titulação amperométrica, que indicou o ponto de equivalência em 172,50  $\mu\text{L}$  de Ac-GGGTH- $\text{NH}_2$   $8,831 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , calculou-se a estequiometria do sistema:

$$(\text{Número de mols de } \text{Cu}^{2+}) / X = (\text{Número de mols de Ac-GGGTH-NH}_2)$$

$$\frac{4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \times 5 \times 10^{-6} \text{ L}}{X} = 8,831 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \times 172,50 \times 10^{-6} \text{ L}$$

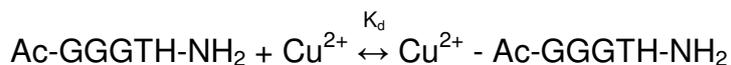
$$X = 1,31 \text{ (estequiometria).}$$

Com base neste cálculo, pôde-se dizer que a estequiometria encontrada para o sistema  $\text{Cu}^{2+}$  - Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> foi de 1 Cu : 1 Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub>. Este resultado era o esperado, pois está coincidente com a literatura, conforme propôs o trabalho de Burns e colaboradores (30).

A comprovação da interação entre o íon  $\text{Cu}^{2+}$  e o Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> sugere a formação de um complexo entre o cobre(II) e o prion na região correspondente aos resíduos 92 a 96. Segundo Burns e colaboradores, este complexo é formado a partir da ligação do  $\text{Cu}^{2+}$  a quatro átomos de nitrogênio, sendo um proveniente do anel imidazólico do resíduo de histidina, e outros três provenientes da ligação peptídica entre o segundo e terceiro resíduo de glicina; entre o terceiro resíduo de glicina e o resíduo de treonina; e entre o resíduo de treonina e de histidina. Estas ligações conferem uma geometria quadrado planar para o complexo (Figura 18), porém suspeita-se que uma molécula de água pode estar atuando como um quinto ligante, axialmente, sugerindo então uma geometria de pirâmide de base quadrada (30).

### **Cálculo da constante de dissociação ( $K_d$ ) para o sistema $\text{Cu}^{2+}$ - Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> pelo método da Lei da ação das massas**

A reação de complexação do Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> com o íon cobre(II) pode ser representada por:



e, segundo a Lei da ação das massas, a constante de dissociação da reação ( $K_d$ ) pode ser calculada pela seguinte equação:

$$K_d = [\text{Ac-GGGTH-NH}_2] [\text{Cu}^{2+}] / [\text{Cu}^{2+} - \text{Ac-GGGTH-NH}_2] \quad (17)$$

Considerando que no ponto de equivalência  $[\text{Ac-GGGTH-NH}_2] = [\text{Cu}^{2+}]$ , então

$$K_d = [\text{Cu}^{2+}]^2 / [\text{Cu}^{2+} - \text{Ac-GGGTH-NH}_2] \quad (18)$$

onde

$[Cu^{2+}]$  = concentração de cobre livre no ponto de equivalência em mol L<sup>-1</sup>

$[Cu^{2+} - Ac-GGGTH-NH_2]$  = concentração de peptídeo no ponto de equivalência em mol L<sup>-1</sup>.

A constante de dissociação para o complexo  $Cu^{2+} - Ac-GGGTH-NH_2$  foi calculada a partir dos dados das titulações amperométricas e da equação (18). Os resultados obtidos são apresentados na tabela 19.

**TABELA 19 – CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO OBTIDAS ATRAVÉS DO MÉTODO LEI DA AÇÃO DAS MASSAS**

nº	$[Cu^{2+}] / mol L^{-1}$	$[Cu^{2+}-Ac-GGGTH-NH_2]$	$K_d / mol L^{-1}$
1	$1,815 \times 10^{-7}$	$7,617 \times 10^{-7}$	$4,325 \times 10^{-8}$
2	$1,694 \times 10^{-7}$	$7,838 \times 10^{-7}$	$3,661 \times 10^{-8}$
3	$1,926 \times 10^{-7}$	$7,396 \times 10^{-7}$	$5,016 \times 10^{-8}$
Média	$1,812 \times 10^{-7} \pm 1,160 \times 10^{-8}$	$7,617 \times 10^{-7} \pm 2,210 \times 10^{-8}$	$4,334 \times 10^{-8} \pm 6,775 \times 10^{-9}$

#### **Cálculo da constante de dissociação ( $K_d$ ) para o sistema $Cu^{2+} - Ac-GGGTH-NH_2$ pelo método da Titulação amperométrica**

Para o cálculo da constante de dissociação da reação de complexação do  $Cu^{2+}$  com o peptídeo  $Ac-GGGTH-NH_2$ , utilizou-se a equação (14), proposta por Saroff e Mark (73) adotando os seguintes parâmetros experimentais:

$C_0$  = concentração de cobre total

$C$  = concentração de cobre livre no ponto de equivalência

$P$  = concentração de  $Ac-GGGTH-NH_2$  no ponto de equivalência

$n = 1$  (um possível sítio para metais,  $Cu^{2+}$ )

Os valores de  $K_d$  obtidos para as titulações amperométricas do cobre com o peptídeo Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub>, são mostrados na tabela 20.

**TABELA 20 – VALORES DE  $K_d$  OBTIDOS ATRAVÉS DO MÉTODO DE TITULAÇÃO AMPEROMÉTRICA**

nº	[C <sub>0</sub> ] / mol L <sup>-1</sup>	[C] / mol L <sup>-1</sup>	[P] / mol L <sup>-1</sup>	$K_d$ / mol L <sup>-1</sup>
1	1,000 x 10 <sup>-6</sup>	1,815 x 10 <sup>-7</sup>	7,617 x 10 <sup>-7</sup>	1,833 x 10 <sup>-9</sup>
2	1,000 x 10 <sup>-6</sup>	1,694 x 10 <sup>-7</sup>	7,838 x 10 <sup>-7</sup>	1,711 x 10 <sup>-9</sup>
3	1,000 x 10 <sup>-6</sup>	1,926 x 10 <sup>-7</sup>	7,396 x 10 <sup>-7</sup>	1,945 x 10 <sup>-9</sup>
Média	1,000 x 10 <sup>-6</sup>	1,812 x 10 <sup>-7</sup> ± 1,160 x 10 <sup>-8</sup>	7,617 x 10 <sup>-7</sup> ± 2,210 x 10 <sup>-8</sup>	1,830 x 10 <sup>-9</sup> ± 1,170 x 10 <sup>-10</sup>

Os valores médios de  $K_d$  obtidos nos dois métodos de cálculo são mostrados na tabela 21.

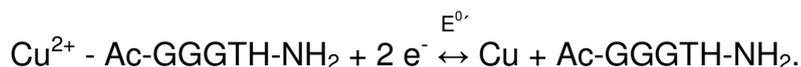
**TABELA 21 – VALORES DE  $K_d$**

Método	$K_d$ / mol L <sup>-1</sup>
Lei da ação das massas	4,334 x 10 <sup>-8</sup>
Titulação amperométrica	1,830 x 10 <sup>-9</sup>

Os valores de  $K_d$  obtidos utilizando a Lei da ação das massas e titulação amperométrica não podem ser considerados semelhantes. Neste caso, devemos levar em consideração os baixos valores de  $K_d$  (10<sup>-8</sup> – 10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup>), onde uma diferença relativa de uma ordem de grandeza de 10 é algo

significativo. Enquanto que a Lei da ação das massas leva em consideração as concentrações das espécies envolvidas, o método Titulação amperométrica, além destas variáveis, consideram parâmetros físico-químicos, tais como número de sítios de metais por molécula de peptídeo.

Com base nos valores de  $K_d$ , outro parâmetro pode ser calculado para o sistema  $\text{Cu}^{2+} - \text{Ac-GGGTH-NH}_2$ , o **potencial padrão de redução** ( $E^{0'}$ ) do cobre (II) na presença do peptídeo  $\text{Ac-GGGTH-NH}_2$ :



A equação de Nernst para a redução do cobre(II) na presença do peptídeo é representada por:

$$E = E^{0'} + (0,059/2) \log ( [\text{Cu}^{2+} - \text{Ac-GGGTH-NH}_2] / [\text{Ac-GGGTH-NH}_2] ) \quad (19)$$

Considerando também o sistema na ausência do peptídeo:



A equação de Nernst para a redução do cobre (II) na ausência do peptídeo é representada por:

$$E = E^0 + (0,059/2) \log [\text{Cu}^{2+}] \quad (20)$$

Onde  $E^0$  representa o potencial padrão de redução do cobre (II), tabelado para 1 atm de pressão, 25° C e concentração de  $\text{Cu}^{2+}$  de 1 mol L<sup>-1</sup>, vs. eletrodo padrão de hidrogênio, com o valor de + 0,34 V.

Isolando e substituindo o termo  $[\text{Cu}^{2+}]$  da equação (20), na equação (17) que descreve a definição de  $K_d$ , e posteriormente igualando-se com a equação (19), tem-se a relação entre  $K_d$  e  $E^{0'}$ :

$$E^{0'} = E^0 + 0,0295 \log K_d \quad (21)$$

Substituindo os valores de  $K_d$  da tabela 21, o valor de  $E^0$  (0,34 V) na equação (21) e posteriormente convertendo os resultados para o eletrodo de referência utilizado (+ 0,22 V) têm-se os valores de  $E^{0'}$  (tabela 22):

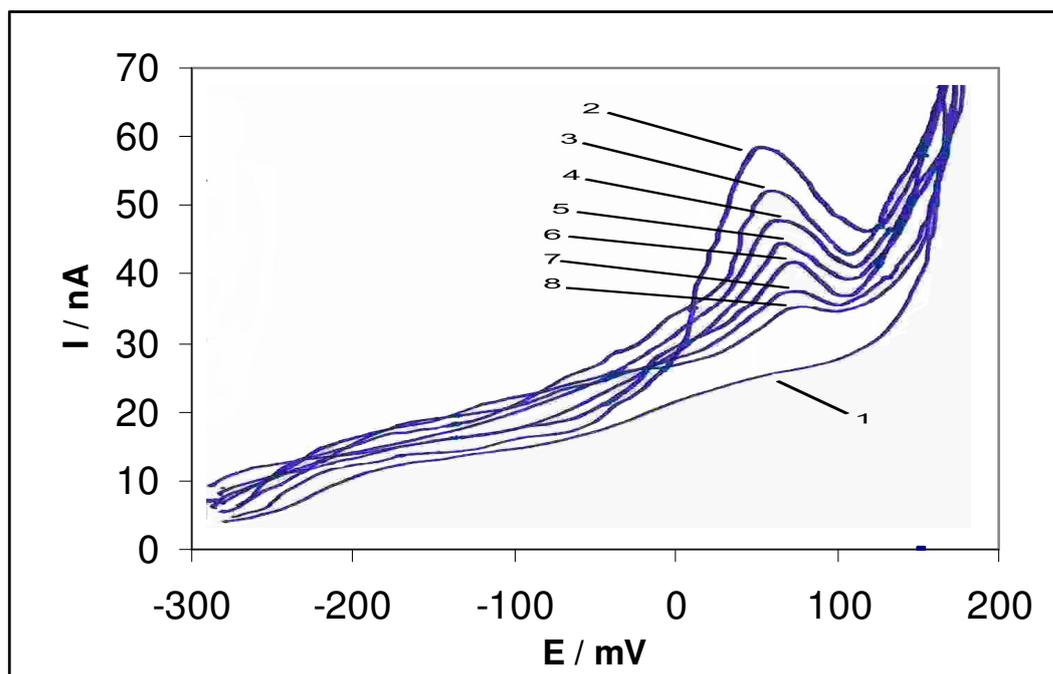
**TABELA 22 – VALORES DE POTENCIAL PADRÃO DE REDUÇÃO PARA O SISTEMA  $\text{Cu}^{2+}$  - Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub>**

<b>Método</b>	<b><math>K_d</math> / mol L<sup>-1</sup></b>	<b><math>E^{0'}</math> / V</b>
Lei da ação das massas	$4,334 \times 10^{-8}$	0,343
Titulação amperométrica	$1,830 \times 10^{-9}$	0,302

Os valores de  $E^{0'}$  (Tabela 22), os quais encontram-se acima de + 300 mV, e portanto fora do domínio de eletroatividade do eletrodo de mercúrio, justificam a ausência de um sinal voltamétrico característico do complexo Cu – Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> nos voltamogramas da Figura 51.

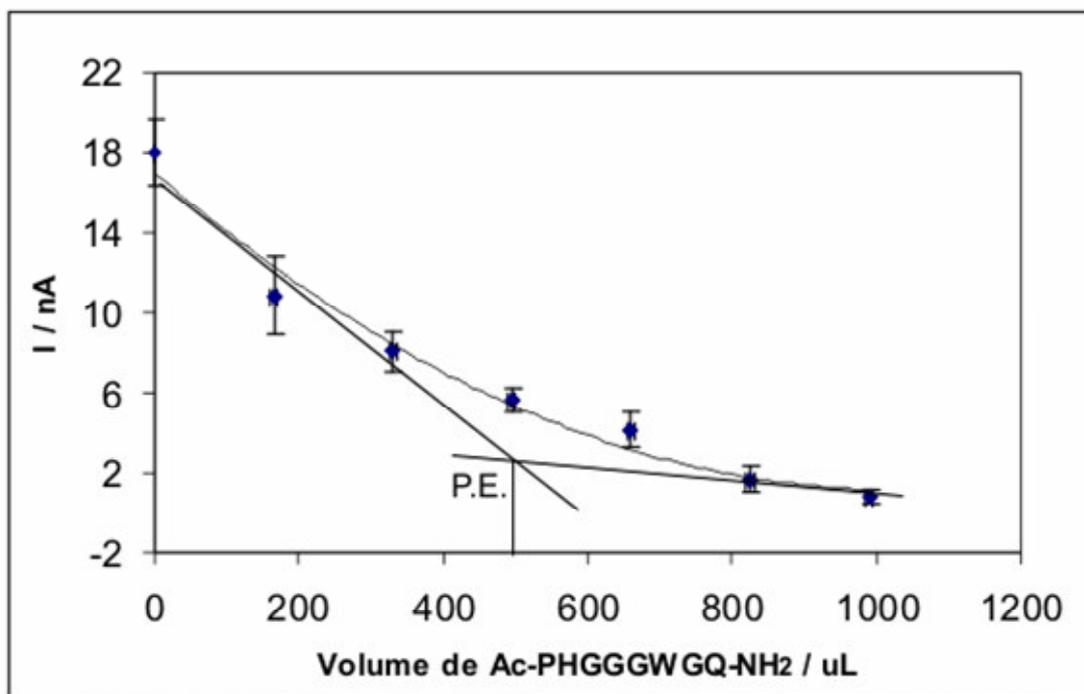
### 5.3 Sistema $\text{Cu}^{2+}$ - Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub>

A figura 53 mostra os voltamogramas obtidos para 5,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{Cu}^{2+}$   $8 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> em  $\text{KNO}_3$  0,1 mol L<sup>-1</sup> na ausência (curva 2) e na presença (curvas 3 a 8) do peptídeo Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub>. Observou-se um decaimento progressivo do sinal da corrente de difusão do cobre na presença do peptídeo, indicando a existência da interação entre o Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> e os íons  $\text{Cu}^{2+}$ .



**Figura 53 - Voltamogramas para o  $\text{Cu}^{2+}$  ( $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) na ausência (curva 2) e na presença de Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> (curvas 3 a 8) em  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Curva 3: [peptídeo] =  $3,9740 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ; curva 4: [peptídeo] =  $7,9479 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ; curva 5: [peptídeo] =  $1,1922 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ; curva 6: [peptídeo] =  $1,5896 \times 10^{-6}$ ; curva 7: [peptídeo] =  $1,9870 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ; curva 8: [peptídeo] =  $2,3844 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Curva 1:  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .  $E_i = -300 \text{ mV}$ ;  $E_f = +200 \text{ mV}$ ;  $E_d = -300 \text{ mV}$ ;  $t_d = 90 \text{ s}$ ;  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ; Eletrodo de trabalho: HMDE; Eletrodo de referência: Ag / AgCl ( $\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$ ).**

Com base nos voltamogramas obtidos para o  $\text{Cu}^{2+}$  na ausência e na presença do peptídeo Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub>, traçou-se a curva de titulação amperométrica, para a determinação do ponto de equivalência (Figura 54).



**Figura 54 – Curva de titulação amperométrica para o  $\text{Cu}^{2+}$  por Ac-PHGGGWGQ-  $\text{NH}_2$ .** Adições sucessivas de 165, 330, 495, 660, 825 e 990  $\mu\text{L}$  de Ac-PHGGGWGQ- $\text{NH}_2$   $9,564 \times 10^{-6}$   $\text{mol L}^{-1}$ .  $n_d = 3$  determinações.

Tomando como base o gráfico da titulação amperométrica, que indicou o ponto de equivalência em 481,18  $\mu\text{L}$  de Ac-PHGGGWGQ- $\text{NH}_2$   $9,564 \times 10^{-6}$   $\text{mol L}^{-1}$ , calculou-se a estequiometria do sistema:

$$(\text{Número de mols de } \text{Cu}^{2+}) / X = (\text{Número de mols de Ac-PHGGGWGQ-NH}_2)$$

$$\frac{4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \times 1 \times 10^{-6} \text{ L}}{X} = 9,564 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \times 481,18 \times 10^{-6} \text{ L}$$

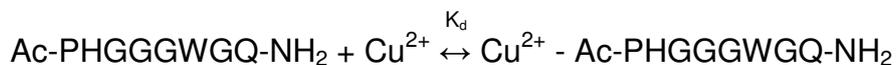
$$X = 0,869 \text{ (estequiometria).}$$

Com base neste cálculo, pôde-se dizer que a estequiometria encontrada para o sistema  $\text{Cu}^{2+}$  - Ac-PHGGGWGQ- $\text{NH}_2$  foi de 1 Cu : 1 Ac-PHGGGWGQ- $\text{NH}_2$ . Este resultado era o esperado, pois está coincidente com a literatura (22-29).

A comprovação da interação entre o íon  $\text{Cu}^{2+}$  e o Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> sugere a formação de um complexo entre o cobre(II) e o prion na região correspondente aos resíduos 59 a 66. Segundo Burns e colaboradores, este complexo é formado a partir da ligação do  $\text{Cu}^{2+}$  a três átomos de nitrogênio, sendo um proveniente do anel imidazólico do resíduo de histidina, e outros dois provenientes da ligação peptídica entre o resíduo de histidina e o primeiro resíduo de glicina; e entre o primeiro e segundo resíduos de glicina. O  $\text{Cu}^{2+}$  também liga-se a um átomo de oxigênio, do grupo carbonila do segundo resíduo de glicina. Há também uma interação com uma molécula de água, sendo esta um quinto ligante. Estas ligações sugerem uma geometria de pirâmide de base quadrada para o complexo (Figura 12) (23).

#### **Cálculo da constante de dissociação ( $K_d$ ) para o sistema $\text{Cu}^{2+}$ - Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> pelo método da Lei da ação das massas**

A reação de complexação do Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> com o íon cobre(II) pode ser representada por:



e, segundo a Lei da ação das massas, a constante de dissociação da reação ( $K_d$ ) pode ser calculada pela seguinte equação:

$$K_d = [\text{Ac-PHGGGWGQ-NH}_2] [\text{Cu}^{2+}] / [\text{Cu}^{2+} - \text{PHGGGWGQ-NH}_2] \quad (22)$$

Considerando que no ponto de equivalência  $[\text{Ac-PHGGGWGQ-NH}_2] = [\text{Cu}^{2+}]$ , então

$$K_d = [\text{Cu}^{2+}]^2 / [\text{Cu}^{2+} - \text{Ac-PHGGGWGQ-NH}_2] \quad (23)$$

onde

$[\text{Cu}^{2+}]$  = concentração de cobre livre no ponto de equivalência em mol L<sup>-1</sup>

$[\text{Cu}^{2+} - \text{Ac-PHGGGWGQ-NH}_2]$  = concentração de peptídeo no ponto de equivalência em mol L<sup>-1</sup>.

A constante de dissociação para o complexo  $\text{Cu}^{2+}$  - Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> foi calculada a partir dos dados das titulações amperométricas e da equação (23). Os resultados obtidos são apresentados na tabela 23.

**TABELA 23 – CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO OBTIDAS ATRAVÉS DO MÉTODO LEI DA AÇÃO DAS MASSAS**

n°	$[\text{Cu}^{2+}] / \text{mol L}^{-1}$	$[\text{Cu}^{2+}\text{-Ac-PHGGGWGQ-NH}_2]$	$K_d / \text{mol L}^{-1}$
1	$3,463 \times 10^{-8}$	$2,301 \times 10^{-7}$	$5,212 \times 10^{-9}$
2	$3,778 \times 10^{-8}$	$2,325 \times 10^{-7}$	$6,139 \times 10^{-9}$
3	$3,154 \times 10^{-8}$	$2,277 \times 10^{-7}$	$4,369 \times 10^{-9}$
Média	$3,465 \times 10^{-8} \pm$ $3,120 \times 10^{-9}$	$2,301 \times 10^{-7} \pm 2,400 \times 10^{-9}$	$5,240 \times 10^{-9} \pm$ $8,853 \times 10^{-10}$

#### **Cálculo da constante de dissociação ( $K_d$ ) para o sistema $\text{Cu}^{2+}$ - Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> pelo método da Titulação amperométrica**

Para o cálculo da constante de dissociação da reação de complexação do  $\text{Cu}^{2+}$  com o peptídeo Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> utilizou-se a equação (14) adotando os seguintes parâmetros experimentais:

$C_0$  = concentração de cobre total

$C$  = concentração de cobre livre no ponto de equivalência

$P$  = concentração de Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> no ponto de equivalência

$n = 1$  (um possível sítio para metais)

Os valores de  $K_d$  obtidos para as titulações amperométricas do cobre com o peptídeo Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> realizadas, são mostrados na tabela 24.

**TABELA 24 – VALORES DE  $K_d$  OBTIDOS ATRAVÉS DO MÉTODO DE TITULAÇÃO AMPEROMÉTRICA**

n°	$[C_0] / \text{mol L}^{-1}$	$[C] / \text{mol L}^{-1}$	$[P] / \text{mol L}^{-1}$	$K_d / \text{mol L}^{-1}$
1	$2,000 \times 10^{-7}$	$3,463 \times 10^{-8}$	$2,301 \times 10^{-7}$	$3,498 \times 10^{-10}$
2	$2,000 \times 10^{-7}$	$3,778 \times 10^{-8}$	$2,325 \times 10^{-7}$	$3,816 \times 10^{-10}$
3	$2,000 \times 10^{-7}$	$3,154 \times 10^{-8}$	$2,277 \times 10^{-7}$	$3,186 \times 10^{-10}$
Média	$2,000 \times 10^{-7}$	$3,465 \times 10^{-8} \pm 3,120 \times 10^{-9}$	$2,301 \times 10^{-7} \pm 2,400 \times 10^{-9}$	$3,500 \times 10^{-10} \pm 3,150 \times 10^{-11}$

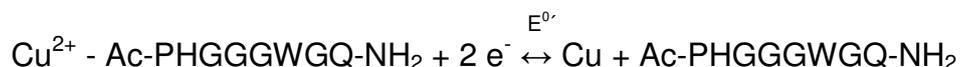
Os valores médios de  $K_d$  obtidos nos dois métodos de cálculo são mostrados na tabela 25.

**TABELA 25 – VALORES DE  $K_d$**

Método	$K_d / \text{mol L}^{-1}$
Lei da ação das massas	$5,240 \times 10^{-9}$
Titulação amperométrica	$3,500 \times 10^{-10}$

Os valores de  $K_d$  obtidos utilizando a Lei da ação das massas e titulação amperométrica não podem ser considerados semelhantes. Neste caso, devemos levar em consideração os baixos valores de  $K_d$  ( $10^{-9} - 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ ), onde uma diferença relativa de uma ordem de grandeza de 10 é algo significativo. Enquanto que a Lei da ação das massas leva em consideração as concentrações das espécies envolvidas, o método Titulação amperométrica, além destas variáveis, consideram parâmetros físico-químicos, tais como número de sítios de metais por molécula de peptídeo.

Com base nos valores de  $K_d$ , outro parâmetro pode ser calculado para o sistema  $\text{Cu}^{2+}$  - Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub>, o **potencial padrão de redução** do cobre (II) na presença do peptídeo Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> ( $E^{0'}$ ):



A equação de Nernst para a redução do cobre (II) na presença do peptídeo é representada por:

$$E = E^{0'} + (0,059/2) \log ([\text{Cu}^{2+} - \text{Ac-PHGGGWGQ-NH}_2] / [\text{Ac-PHGGGWGQ-NH}_2]) \quad (24)$$

Considerando também a redução do cobre (II) na ausência do peptídeo:



A equação de Nernst para a redução do cobre (II) na ausência do peptídeo é representada por:

$$E = E^0 + (0,059/2) \log [\text{Cu}^{2+}] \quad (25)$$

Onde  $E^0$  representa o potencial padrão de redução do cobre (II), tabelado para 1 atm de pressão, 25° C e concentração de  $\text{Cu}^{2+}$  de 1 mol L<sup>-1</sup>, vs. eletrodo padrão de hidrogênio, com o valor de + 0,34 V.

Isolando e substituindo o termo  $[\text{Cu}^{2+}]$  da equação (25), na equação (22) que descreve a definição de  $K_d$ , e posteriormente igualando-se com a equação (24), tem-se a relação entre  $K_d$  e  $E^{0'}$ :

$$E^{0'} = E^0 + 0,0295 \log K_d \quad (26)$$

Substituindo os valores de  $K_d$  da Tabela 25, o valor de  $E^0$  (0,34 V) na equação (26) e posteriormente convertendo os resultados para o eletrodo de referência utilizado (+ 0,22 V) têm-se os valores de  $E^{0'}$  (tabela 26):

**TABELA 26 – VALORES DE POTENCIAL PADRÃO DE REDUÇÃO PARA O SISTEMA  $\text{Cu}^{2+}$  - Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub>**

Método	$K_d / \text{mol L}^{-1}$	$E^{0'}$ / V
Lei da ação das massas	$5,240 \times 10^{-9}$	0,316
Titulação amperométrica	$3,500 \times 10^{-10}$	0,281

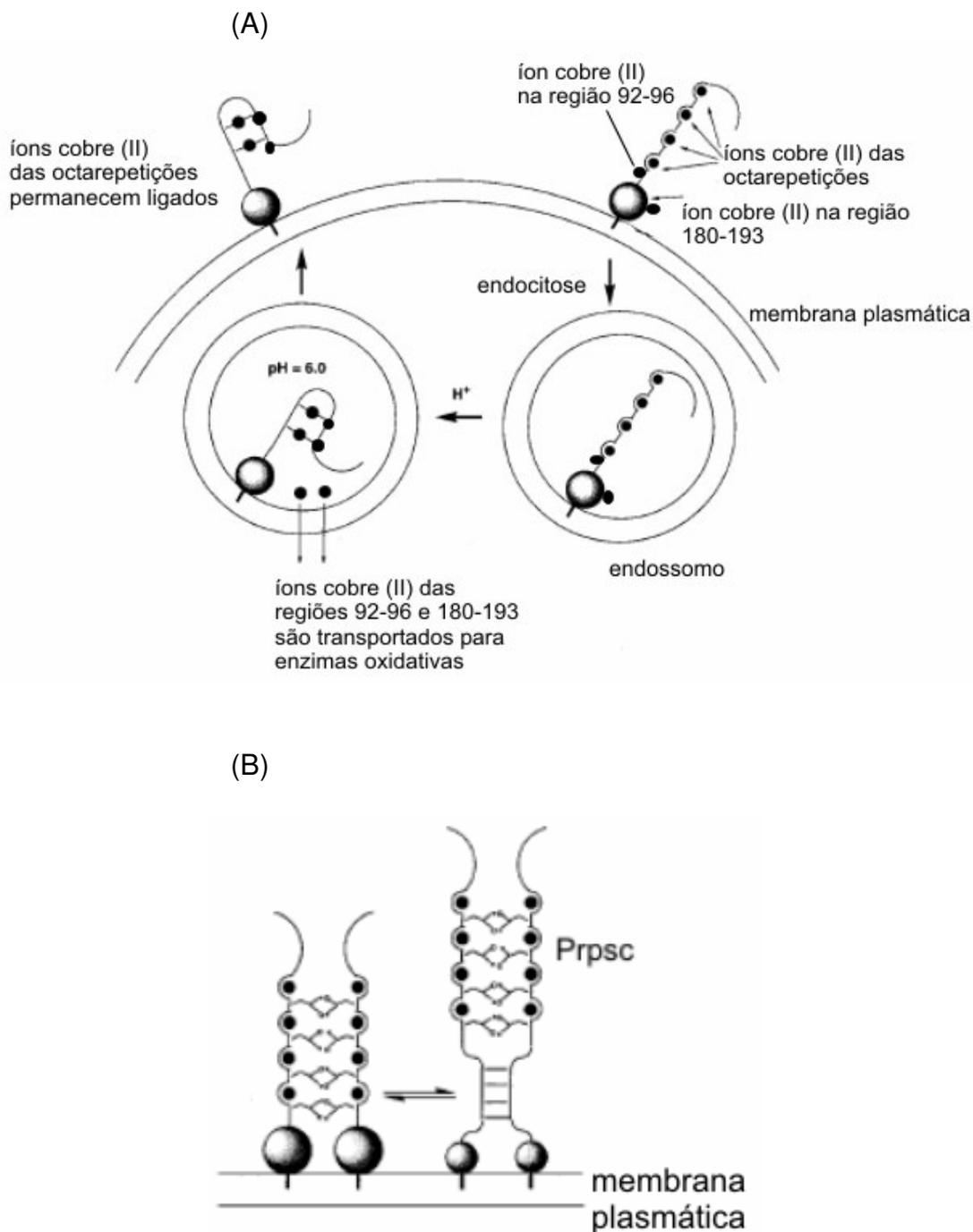
Os valores de  $E^{0'}$  (Tabela 26), os quais encontram-se acima de + 270 mV, e portanto fora do domínio de eletroatividade do eletrodo de mercúrio, justificam a ausência de um sinal voltamétrico característico do complexo Cu – Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> nos voltamogramas da Figura 53.

#### **5.4 Proposta do papel dos íons $\text{Cu}^{2+}$ no mecanismo das doenças do prion**

Uma informação relevante que os valores de  $K_d$  obtidos neste trabalho revelam é a estabilidade dos complexos formados entre os peptídeos do prion e os íons  $\text{Cu}^{2+}$ . Os resultados apresentados nos itens 5.1 a 5.3 sugerem que os complexos de cobre(II) formados em regiões do prion fora das octarepetições (Cu – Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> e Cu – Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>) são mais instáveis ( $K_d = 1,830 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  e  $2,683 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente). Este resultado nos leva a acreditar que os íons  $\text{Cu}^{2+}$  que permanecem ligados ao prion são realmente os que se encontram ligados às octarepetições (Cu – Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub>,  $K_d = 3,500 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ ), e conseqüentemente, estes íons cobre(II) é que estariam envolvidos diretamente no evento de mudança conformacional. Baseado nessas informações, na hipótese de Burns e colaboradores e considerando que a estequiometria do complexo  $\text{Cu}^{2+}$  - prion é de 6 mols de cobre para um mol de proteína, pode-se propor então, um possível mapeamento dos íons cobre(II) envolvidos no evento de mudança

conformacional responsável pelas patologias do prion. A Figura 55 ilustra este possível mecanismo, onde o evento de mudança conformacional envolveria uma molécula de prion mais flexível ao sair da célula, por estar carregada com menor número de íons cobre(II).

O Prion, contendo seis íons cobre(II) ligados em sua estrutura (quatro íons na região do resíduo 60 a 91; um íon na região do resíduo 92 a 96; um íon na região do resíduo 180 a 193), entra no interior do neurônio e é capturado pelo endossomo. Dois íons cobre(II), um proveniente da região 92 a 96 e outro da região 180 a 193, são transportados para enzimas oxidativas e os outros quatro permanecem ligados à região das octarepetições (Figura 55A). Ao sair do endossomo e retornar para a superfície da membrana plasmática, o prion, agora mais flexível, permanece em um estado que favorece a interação entre algumas de suas cadeias laterais (de duas moléculas de proteína vizinhas) provenientes de resíduos de glutamina e íons cobre(II) remanescentes. Desse modo, haveria uma reorganização estrutural, que acompanhada de eventos raros (não muito claros ainda), poderia favorecer a formação do Pr<sup>psc</sup> (o responsável pelas doenças do prion) (Figura 55B). Porém, ainda não se sabe como de fato ocorreria esta interação e posterior conversão para a forma Pr<sup>psc</sup>.



**Figura 55 – Possível mecanismo de envolvimento dos íons cobre(II) com o evento de mudança conformacional do prion.** (A) Após entrar no endossomo, dois íons  $\text{Cu}^{2+}$  (bolas pretas) seriam transportados para enzimas antioxidativas, e os demais permaneceriam ligados ao prion, mesmo após a saída da célula. (B) Ocorreria uma interação, na superfície da membrana plasmática, entre alguns resíduos de glutamina de moléculas de prion vizinhas, e os íons cobre(II) remanescentes, resultando no evento de mudança conformacional e origem do Prpsc.

## VI. CONCLUSÃO

Para uma melhor compreensão sobre o papel do cobre na função biológica do prion, e na manifestação das TSE's, várias técnicas analíticas têm sido utilizadas para determinar os parâmetros qualitativos e quantitativos relacionados à interação prion –  $\text{Cu}^{2+}$  (19-32). Apesar dos vários estudos realizados, existem discordâncias com relação a alguns destes parâmetros, como a estequiometria da reação (2 a seis íons de  $\text{Cu}^{2+}$  por molécula de prion) e os sítios de ligação do cobre fora da região das octarepetições (região do resíduo 92 a 96 e região do resíduo 180 a 193). Além disso, há uma enorme carência de informações sobre os parâmetros quantitativos ( $K_d$ , estequiometria) para os possíveis sítios de ligação do  $\text{Cu}^{2+}$  no prion.

Mesmo diante dessas discordâncias e lacunas, alguns resultados não foram mais contestados e nem investigados. A esfera de coordenação para a interação prion –  $\text{Cu}^{2+}$  na região das octarepetições é uma delas, assim como a possível participação do cobre(II) no evento de mudança conformacional da proteína, responsável pelas patologias (74-83).

As técnicas voltamétricas apresentam propriedades favoráveis para o estudo do sistema prion -  $\text{Cu}^{2+}$ , tais como: a corrente de difusão é diretamente proporcional à concentração do analito; o sinal de corrente é bastante sensível (o que permite o trabalho em pequenas quantidades, algo desejável para o trabalho com peptídeos ou proteínas); permite a simulação de condições fisiológicas; são consideradas técnicas não-destrutivas.

Estas propriedades credenciaram a voltametria como técnica de análise para o estudo de interação prion –  $\text{Cu}^{2+}$ . Pode-se dizer que este estudo possibilitou o desenvolvimento de um método para a determinação de parâmetros quantitativos ( $K_d$ , estequiometria) para o sistema prion –  $\text{Cu}^{2+}$ , utilizando peptídeos de diferentes regiões do prion (prováveis sítios de ligação).

A partir da metodologia desenvolvida e proposta, chegou-se às seguintes conclusões:

1. A metodologia de síntese de peptídeos Fmoc de fase sólida é adequada para a obtenção dos peptídeos do prion;
2. Os peptídeos Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub> (região do prion entre o resíduo 180 e 193), Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> (região do prion entre o resíduo 92 e 96), e Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> (região de uma octarepetição, entre os resíduos 60 e 91), formam complexos com o íon Cu<sup>2+</sup>, os quais foram evidenciados pelo decaimento da corrente de oxidação do cobre quando das adições de peptídeos;
3. A estequiometria da reação entre o Cu<sup>2+</sup> e o Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub> é de um mol de peptídeo para um mol de cobre, estando plenamente de acordo com o trabalho de Brown e colaboradores (31). O íon Cu<sup>2+</sup> provavelmente liga-se ao átomo de nitrogênio imidazólico do resíduo de histidina, no centro do peptídeo, segundo o mesmo estudo;
4. A estequiometria da reação entre o Cu<sup>2+</sup> e o Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> é de um mol de peptídeo para um mol de cobre, estando plenamente de acordo com o trabalho de Burns e colaboradores (30), no qual o íon Cu<sup>2+</sup> liga-se aos átomos de nitrogênio da cadeia principal dos três últimos resíduos do peptídeo, além do nitrogênio imidazólico do resíduo de histidina, segundo o mesmo estudo;
5. A estequiometria da reação entre o Cu<sup>2+</sup> e o Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> é de um mol de peptídeo para um mol de cobre, estando plenamente de acordo com vários trabalhos (22-29). O íon Cu<sup>2+</sup> liga-se a dois átomos de nitrogênio da cadeia principal do peptídeo, nos dois primeiros resíduos de glicina, além de ligar-se ao átomo de oxigênio do grupo carbonila do segundo resíduo de glicina, e ao átomo de nitrogênio imidazólico do resíduo de histidina, segundo Burns e colaboradores (23);
6. Os valores determinados para os K<sub>d</sub> mostram a estabilidade dos três complexos estudados, em condições fisiológicas;
7. A comparação entre os valores de K<sub>d</sub> sugere que o complexo Cu<sup>2+</sup> - Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> (K<sub>d</sub> = 3,500 x 10<sup>-10</sup> mol L<sup>-1</sup>) é mais estável que os complexos Cu<sup>2+</sup> - Ac-GGGTH-NH<sub>2</sub> (K<sub>d</sub> = 1,830 x 10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup>) e Cu<sup>2+</sup> - Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub> (K<sub>d</sub> = 2,683 x 10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup>);
8. A estequiometria do sistema Cu<sup>2+</sup> - prion pode ser considerada como sendo seis mols de Cu<sup>2+</sup> para um mol de proteína, visto que no prion

existem seis sítios de cobre: quatro peptídeos PHGGGWGQ (resíduos 60 a 91), o peptídeo GGGTH (resíduo 92 a 96) e o peptídeo VNITKQHTVTTTT (resíduo 180 a 193), o que está plenamente de acordo com o trabalho de Burns e colaboradores (30).

9. Baseado nos valores obtidos de  $K_d$  e na proposta do mecanismo de Burns e colaboradores (23), os íons cobre(II) envolvidos no evento de conversão conformacional são os que se ligam à região das octarepetições no prion.

O desenvolvimento de um método para obtenção dos parâmetros quantitativos do sistema  $\text{Cu}^{2+}$  - prion utilizando fragmentos peptídicos sintéticos (sítios de ligação de  $\text{Cu}^{2+}$ ) abre novas possibilidades para explicar o papel dos íons cobre(II) na fisiologia das doenças do prion. Pela primeira vez, num mesmo trabalho, investigou-se todos os prováveis sítios de ligação do cobre no prion e determinou-se os parâmetros quantitativos desses sistemas, em meio semelhante ao fisiológico. Além disso, os resultados obtidos podem ser utilizados, na proposição de uma esfera de coordenação para os complexos  $\text{Cu}^{2+}$  - prion em regiões fora das octarepetições (ainda não se tem um modelo tridimensional proposto para estes complexos na literatura).

Os resultados apresentados mostram a viabilidade, a praticidade operacional e a precisão da voltametria para o uso em estudos de funções exercidas pelas proteínas nos sistemas biológicos através de suas complexações com metais.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - CASTRO, C.S.P. (1997) "Utilização da Polarografia de pulso diferencial para o estudo da interação gama-tionina Slalfa1-Ca(II)". Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- 2 - SANTOS, M.L.P., BAGATIN, I.A., FERREIRA, A.M.C. (2000) ([www.sbgq.org.br/ranteriores/23/resumos/0032-1/](http://www.sbgq.org.br/ranteriores/23/resumos/0032-1/))
- 3 - MIURA, HORI-I A., TAKEUCHI, H. (1996) *FEBS Letters* **396**, 248.
- 4 - PRINCE, R.C., GUNSON, D.E. (1998) *Trends in Biochemical Science* **23**, 197.
- 5 - SHRIVER, D.F., ATKINS, P.W., "Inorganic Chemistry", 3rd ed., Oxford, Grã-Bretanha, 1999.
- 6 - KAIM, W. SCHWEDERSKI, B., "Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life", 1st ed. John Wiley & Sons, USA, 1994.
- 7 - OCHIAI, E. (1986) *Journal of Chemical Education* **63**, 942.
- 8 - WILLIAMS, R.J.P., "The copper and zinc triads in biology", Cambridge, USA, 1993.
- 9 - DAVIES, K. (1993) *Nature* **361**, 98.
- 10 - BUELER, H., FISCHER, M., LANG, Y., BLUETHMANN, H., LIPP, H., DEARMOND, S.J., PRUSINER, S.B., AGUET, M., WEISSMANN, C. (1992) *Nature* **356**, 577.
- 11 - SAKAGUCHI, S. KATAMINE, S., NISHIDA, N., MORIUCHI, R., SHIGEMATSU, K., SUGIMOTO, T., NAKATANI, A., KATAOKA, Y., HOUTANI, T., SHIRABE, S., OKADA, H., HASEGAWA, S., MIYAMOTO, T., NODA, T. (1996) *Nature* **380**, 528.
- 12 - TOBLER, I., GAUS, S.E., DEBOER, T., ACHERMANN, P., FISCHER, M., RULICKE, T., MOSER, M., OBSCH, B., MCBRIDE, P.A., MANSON, J.C. (1996) *Nature* **380**, 639.
- 13 - LEHMANN, S. (2002) *Current Opinion in Chemical Biology* **6**, 187.
- 14 - HETZ, C., MAUNDRELL, K., SOTO, C. (2003) *Trends in Molecular Medicine* **9**, 237.
- 15 - COLLINGE, J. (2001) *Annual Review of Neuroscience* **24**, 519.
- 16 - HIJAZI, N., SHAKED, Y., ROSENMAN, H., TAMIR, B., GABIZON, R. (2003) *Brain Research* **993**, 192.

- 17 - LATOUCHE, K., RAINELLI, P., VERMERSCH, D. (1999) *Food Policy* **23**, 347.
- 18 - BENCSIK, A.A., COLEMAN A.W., DEBBER, S.O., PERRON, H., MOUSSA, A. (2006) *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* (disponible online).
- 19 - HORNSHAW, M.P., MCDERMOTT, J.R., CANDY, J.M. (1995) *Biochemical and Biophysical Research Communications* **207**, 621.
- 20 - STOCKEL, J., SAFAR, J. WALLACE, A.C., COHEN, F.E., PRUSINER, S.B. (1998) *Biochemistry* **37**, 7185.
- 21 - VILES, J.H., COHEN, F.E., PRUSINER, S.B., GOODIN, D.B., WRIGHT, P.E., DYSON, H.J. (1999) *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 2042.
- 22 - WHITTAL, R.M., BALL, H.L., COHEN, F.E., BURLINGAME, A.E., PRUSINER, S.B., BALDWIN, M.A. (2000) *Protein Science* **9**, 332.
- 23 - BURNS, C.S., SPENCER, A.E., DUNHAM, C.M., LARIO, P., AVDIEVICH, N.I., ANTHOLINE, W.E., OLMSTEAD, M.M., VRIELINK, A., GERFEN, G.J., PEISACH, J., SCOTT, W.G., MILLHAUSER, G.L. (2002) *Biochemistry* **41**, 3991.
- 24 - VILES, J.H., GARNETT, A.P. (2003) *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 6795.
- 25 - ZAHN, R. (2003) *Journal of Molecular Biology* **334**, 477.
- 26 - PAPPALARDO, G., IMPELLIZZERI, G., CAMPAGNA, T. (2004) *Inorganica Chimica Acta* **357**, 185.
- 27 - KRAMER, M.L., KRATZIN, H.D., SCHMIDT, B., ROMER, A., WINDL, O., LIEMANN, S., HORNEMANN, S., KRETZSCHMAR, H. (2001) *The Journal Of Biological Chemistry* **276**, 16711.
- 28 - QIN, K., YANG, Y., MASTRANGELO, P., WESTAWAY, D. (2002) *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 1981.
- 29 - QIN, K., COOMARASWAMY, J., MASTRANGELO, P., YANG, Y., LUGOWSKY, S., PETROMILLI, C., PRUSINER, S.B., FRASER, P.E., GOLDBERG, J.M., CHAKRABARTTY, A., WESTAWAY, D. (2003) *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 8888.
- 30 - BURNS, C.S., SPENCER, E.A., LEGNAME, G., PRUSINER, S.B., ANTHOLINE, W.E., GERFEN, G.J., PEISACH, J., MILLHAUSER, G.L. (2003) *Biochemistry* **42**, 6794.

- 31 - BROWN, D.R., GUANTIERI, V., GRASSO, G., IMPELLIZZERI, G., PAPPALARDO, G., RIZZARELLI, E. (2004) *Journal of Inorganic Biochemistry* **98**, 133.
- 32 - JONES, C.E., KLEWPATINOND, M., ABDELRAHEIN, S.R., BROWN, D.R., VILES, J.H. (2005) *Journal of Molecular Biology* **346**, 1393.
- 33 - SKOOG, D.A., HOLLER, F.J., NIEMAN, T.A. "Princípios de Análise Instrumental", 5A. ed., Bookman, Porto Alegre, 2002.
- 34 - BARD, A.J., FAULKNER, L.R. "Electrochemical Methods - Fundamentals and Applications", 2A. ed., John Wiley and Sons, USA, 2001.
- 35 - GURD, F.R.N., WILCOX, P.E., (1956) *Advances in Protein Chemistry* **11**, 312.
- 36 - SHEARAN, P., ALVAREZ, J.M.F., SMYTH, M.R. (1990) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **8**, 555.
- 37 - GONÇALVES, M.L.S., CONCEIÇÃO, A.C.L. (1991) *Science of Total Environment* **103**, 185.
- 38 - OLAFSON, R.W., SIM, R.G., (1979) *Analytical Biochemistry* **100**, 343.
- 39 - YANG, J., CAO, Y., YANG, M.S. (1998) *Chemico- Biological Interactions* **115**, 109.
- 40 - NIKI, K., YAGI, T., INOKUCHI, H., KIMURA, K. (1979) *Journal of American Chemical Society* **101**, 335.
- 41 - NIKI, K., YAGI, T., INOKUCHI, H. (1982) *ACS Advances in Chemistry Series* **201**, 199.
- 42 - NIKI, K., KAWASAKI, Y., KIMURA, Y., HIGUCHIY, Y., YASUOKA, N. (1987) *Langmuir* **3**, 982.
- 43 - EDDWONES, M.J., HILL, H.A.O. (1977) *Journal of Chemical Society Communications* **64**, 771
- 44 - EDDWONES, M.J., HILL, H.A.O. (1979) *Journal of American Chemical Society* **101**, 4461.
- 45 - ARMSTRONG, F.A., HILL, H.A.O., OLIVER, B.N., WHITFORD, D. (1985) *Journal of American Chemical Society* **107**, 1473.
- 46 - ARMSTRONG, F.A., BROWN, K.J. (1987) *Journal of Electroanalysis Interfacial Electrochemistry* **219**, 319.
- 47 - DHESI, R., COTTON, T.M., TIMKOVICH, R. (1983) *J.Electroanalysis. Interfacial Electrochemistry* **154**, 129.

- 48 - ARMSTRONG, F.A., GEORGE, S.J., THOMSON, A.J., YATES, M.G. (1988) *FEBS Letters* **234**, 107.
- 49 - ARMSTRONG, F.A., LANON, A.M. (1989) *Journal of American Chemical Society* **109**, 7211.
- 50 - CASTRO, C.S.P., SOUZA, J.R., BLOCH Jr., C. (2003) *Protein and Peptide Letters* **2**, 155.
- 51 - CASTRO, C.S.P., SOUZA, J.R., BLOCH Jr., C. "Comportamento polarográfico da ovoalbumina e da BSA em presença de cálcio (II)", Anais do I congresso de Ciência e Cultura da UnB, p.243, UnB, Brasília-DF.
- 52 - CASTRO, C.S.P., SOUZA, J.R., BLOCH Jr., C. (2002) *Protein and Peptide Letters* **9**, 45.
- 53 - SALAMON, z., TOLLIN, G. (1992) *Archives of Biochemistry and Biophysics* **294**, 382
- 54 - ROSCOE, S.G., FULLER, K.L., ROBITAILLE, G. (1993) *Journal of Colloid and Interface Science* **160**, 243.
- 55 - KYRITSIS, P., KHOZHUMA, T., SYKES, A.G. (1996) *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1295**, 245.
- 56 - SÁNCHEZ-SUAREZ, M.D., COSTA-GARCIA, A. (1997) *Talanta* **44**, 909.
- 57 - COHEN, D.J., KING, B.C., HAWKRIDGE, F.M. (1998) *Journal of Electroanalytical Chemistry* **447**, 53.
- 58 - ERK, M., RASPOR, B. (1999) *Journal of Electroanalytical Chemistry* **466**, 75.
- 59 - PHILLIPS, R.K.R., OMANOVIC, S., ROSCOE, S.G. (2000) *Electrochemistry Communications* **2**, 805.
- 60 - LIU, A., LEESE, D.N., SWARTS, J.C., SYKES, A.G. (2002) *Inorganica Chimica Acta* **337**, 83.
- 61 - PENG, W., LIU, X., ZHANG, W., LI, G. (2003) *Biophysical Chemistry* **106**, 267.
- 62 - LAPPIN, A.G., LEWIS, C.A., INGLEDEW, W.J. (1985) *Inorganic Chemistry* **24**, 1446.
- 63 - TARASEVICH, M.R., YAROLOV, A.I., BOGDANOVSKAYA, V.A., VARFOLOMEV, S.D. (1979) *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **6**, 393.
- 64 - LEE, C-W., GRAY, H.B., ANSON, F.C., MALMSTROM, B.G. (1984) *Journal of Electroanalysis Interfacial Electrochemistry* **172**, 289.

- 65 - IKEDA, T., FUSHIMI, F., MIKI, K., SENDA, M. (1988) *Agriculture and Biological Chemistry* **52**, 2655.
- 66 - GUO, L.H., HILL, H.A.O., HOPPER, D.J., LAWRENCE, G.A., SANGHERA, G.S. (1989) *Journal of Electroanalysis Interfacial Electrochemistry* **266**, 379.
- 67 - DICKIE, P., WEINER, J.H. (1979) *Canadian Journal of Biochemistry* **57**, 813.
- 68 - OHNISHI, T., KING, T.S., SALERNO, J.C., BLUM, H., BOWYER, J.R., MAIDA, T. (1981) *Journal of Biological Chemistry* **256**, 5577.
- 69 - MERRIFIELD, R.B. (1963) *Journal of American Chemical Society* **85**, 2149.
- 70 - FIELDS, G.B., NOBLE, R.L. (1989) *Journal of Peptide Protein Research* **35**, 161-214.
- 71 - PACE, C.N., VADJOS, F., FEE, L., GRIMSLEY, G., GRAY, T. (1995) *Protein Science* **4**, 2411.
- 72 - MURPHY, J.B., KIES, M.W. (1960) *Biochemical and Biophysical Acta* **45**, 382.
- 73 - SAROFF, H.A., MARK, H.J. (1953) *Journal of American Chemical Society* **75**, 1240.
- 74 - SUMUDHU, W., PERERA, S., HOOPER, N.M. (2001) *Current Biology* **11**, 519.
- 75 - HIJAZII, N., SHAKED, Y., ROSENMAN, H., BEN-HUR, T., GABIZON, R. (2003) *Brain Research* **993**, 192.
- 76 - BROWN, D.R., CLIVE, C., HASWELL, S.J. (2001) *Journal of Neurochemistry* **76**, 69.
- 77 - QUAGLIO, E., CHIESA, R., HARRIS, A.D. (2001) *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 11432.
- 78 - WONG, B.S., CLIVE, C., HASWELL, S.J., JONES, I.M., BROWN, D.R. (2000) *Biochemical and Biophysical Research Communications* **269**, 726.
- 79 - HETZ, C., MAUNDRELL, K., SOTO, C. (2003) *Trends in Molecular Medicine* **9**, 237.
- 80 - THACKRAY, A.M., KNIGHT, R., HASWELL, S.J., BUJDOSO, R., BROWN, D.R. (2002) *Biochemical Journal* **362**, 253.
- 81 - LEHMANN, S. (2002) *Current Opinion in Chemical Biology* **6**, 187.

82 - CEREGETTI, C.M., SCHWEIGER, A., GLOCKSHUBER, R., DOORSLAER, S.V. (2003) *Biophysical Journal* **84**, 1985.

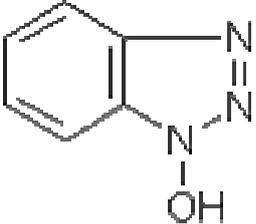
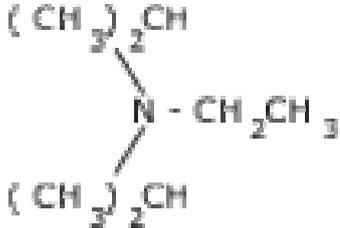
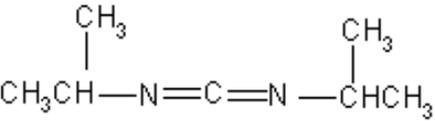
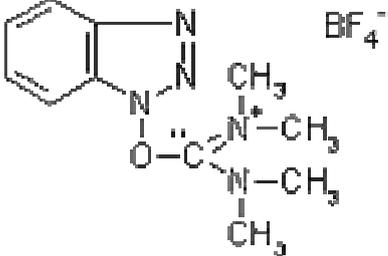
83 - BROWN, D.R. (2004) *Neurobiology of Disease* **15**, 534.

84 – CASTRO, C.S.P., SOUZA, J.R., BLOCH Jr., C. (2001) *Ciência e Cultura* **53**, 88.

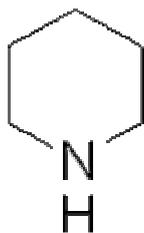
## ANEXO 1 – REAGENTES USADOS NA SÍNTESE DE PEPTÍDEOS

A tabela 27 mostra as estruturas dos reagentes utilizados na síntese de peptídeos, durante a etapa de acoplamento.

**TABELA 27 – ESTRUTURAS DOS REAGENTES DE ACOPLAMENTO**

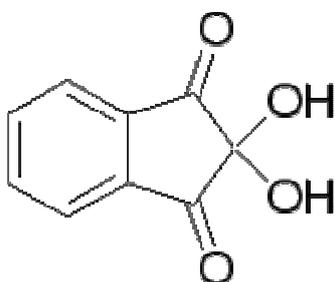
 <p>1-Hidroxibenzotriazol (HOBt)</p>	 <p>N,N-diisopropiletilamina (DIPEA)</p>
 <p>Diisopropilcarbodiimida (DIC)</p>	 <p><i>o</i>-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N,N-tetrametilurônio tetrafluoroborato (TBTU)</p>

A figura 56 mostra a estrutura da piperidina, reagente de desproteção usado na síntese de peptídeos.



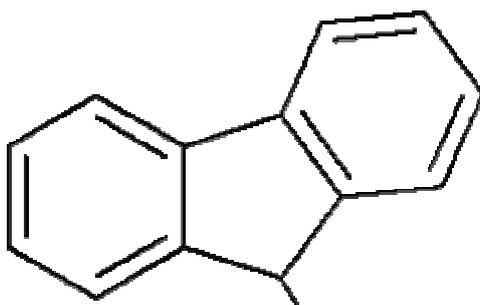
**Figura 56 – Estrutura da piperidina.**

A figura 57 mostra a estrutura da ninhidrina, reagente usado para realização do teste que evidencia a desproteção do material, durante os acoplamentos seguidos na síntese.



**Figura 57 – Estrutura da ninhidrina.**

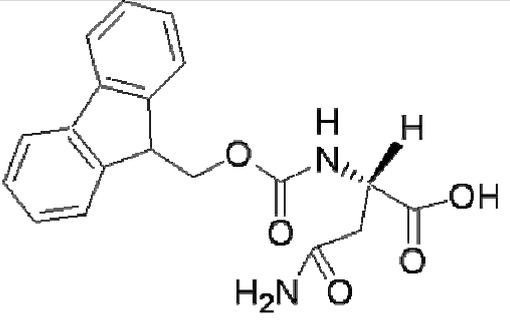
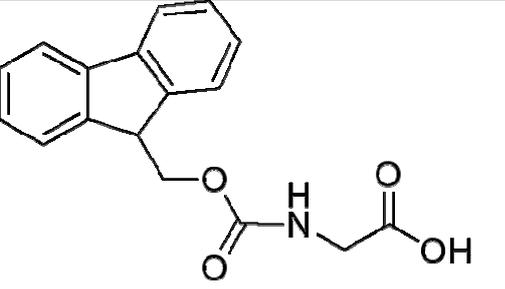
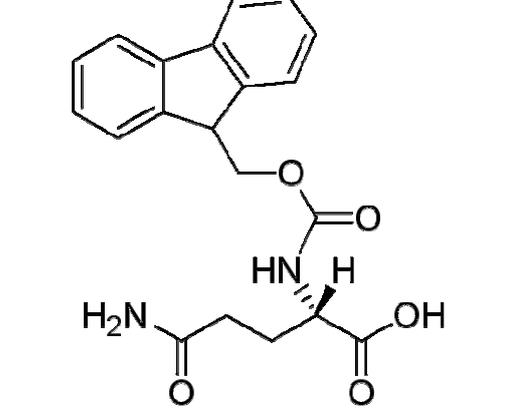
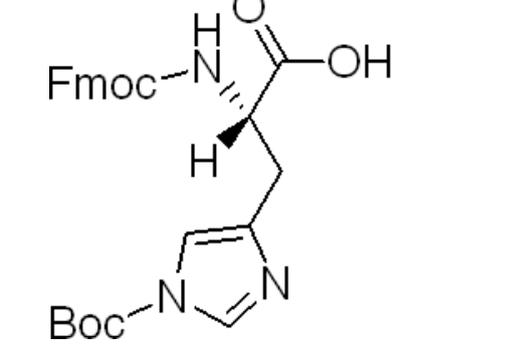
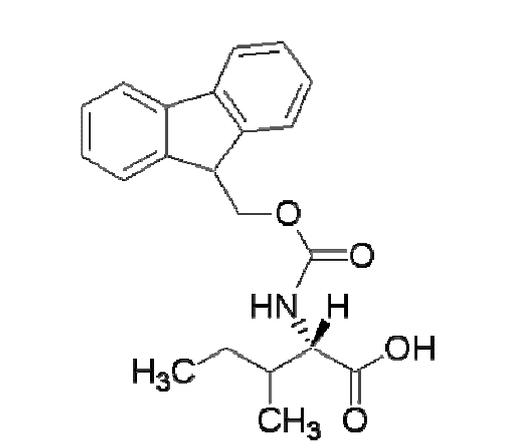
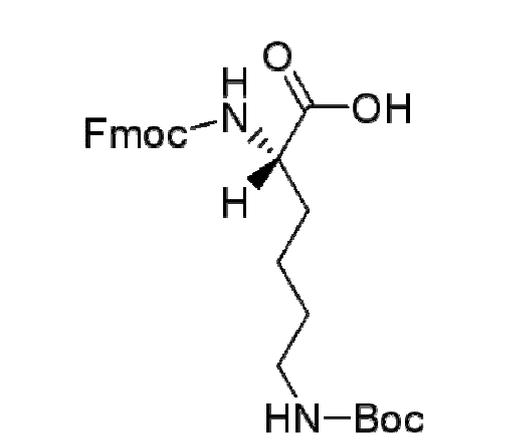
A figura 58 mostra a estrutura do grupo Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonil), o grupo protetor utilizado nos aminoácidos de síntese.

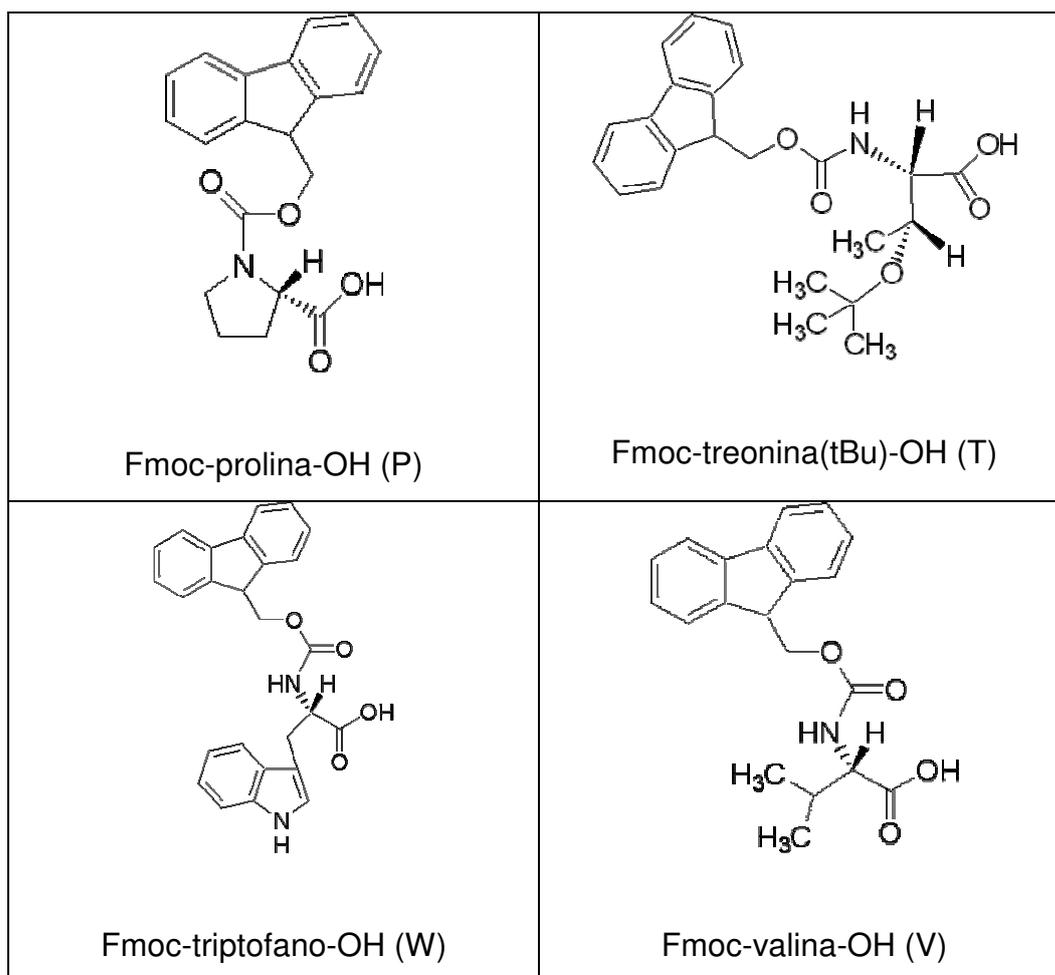


**Figura 58 – Estrutura do grupo Fmoc**

A tabela 28 mostra as estruturas dos Fmoc-aminoácidos utilizados na síntese de peptídeos.

TABELA 28 – ESTRUTURAS DOS FMOC-AMINOÁCIDOS

 <p>Fmoc-asparagina-OH (N)</p>	 <p>Fmoc-glicina-OH (G)</p>
 <p>Fmoc-glutamina-OH (Q)</p>	 <p>Fmoc-histidina(Boc)-OH (H)</p>
 <p>Fmoc-isoleucina-OH (I)</p>	 <p>Fmoc-lisina(Boc)-OH (K)</p>



tBu = grupo t-butil

Boc = grupo t-butiloxicarbonil

## ANEXO 2 – TRABALHOS PUBLICADOS

**2.1 – OLIVEIRA FILHO, W.P., CASTRO, C.S.P., SOUZA, J.R. ,** “Estudo da interação entre o PRP[180-193] e íons cobre (II) por voltametria de redissolução anódica”, Anais do 13<sup>o</sup>. Encontro Nacional de Química Analítica, p.37, UFF – Niterói-RJ (2005).

### **ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE O PRP[180-193] E ÍONS COBRE (II) POR VOLTAMETRIA DE REDISSOLUÇÃO ANÓDICA**

Waldemar Pacheco de Oliveira Filho (PG)<sup>1</sup>, Jurandir Rodrigues de Souza (PQ)<sup>1</sup> e Clarissa Silva Pires de Castro (PQ)<sup>2</sup>. pacheco@unb.br

<sup>1</sup>Laboratório de Química Analítica e Ambiental, Instituto de Química, Universidade de Brasília, CEP 70910-900, Brasília – DF. <sup>2</sup>Laboratório de Espectrometria de Massa, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia CP 2372, CEP 70770-900, Brasília-DF

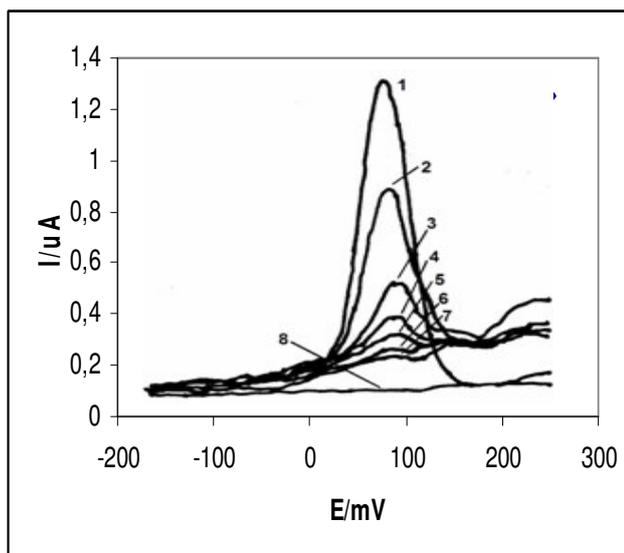
O prion é uma proteína presente no tecido nervoso, que apresenta 237 resíduos de aminoácidos em sua estrutura e possui uma massa molecular de aproximadamente 24.000 Da. Esta proteína é a responsável por patologias do grupo das encefalopatias espongiformes, que deterioram as células nervosas, deixando um aspecto de “esponja” no cérebro. O prion apresenta alguns sítios de ligação para íons metálicos, sendo o cobre(II) o principal metal envolvido. Dentre os sítios de ligação, incluem-se 4 octarepetições<sup>(1)</sup> que se localizam entre os resíduos 57 a 91. Outros possíveis sítios estão localizados entre os resíduos 92 e 96 e 180 a 193<sup>(2)</sup>. Este trabalho tem como objetivo obter parâmetros quantitativos ( $K_d$ , estequiometria) do sistema Cu(II)-Prp[180-193], por meio da voltametria de redissolução anódica, que a ajudem a compreender como ocorre esta interação e qual é a função do cobre. O Prp[180-193] é um fragmento peptídico do prion, cuja sequência (Ac-VNITKQHTVTTTT-NH<sub>2</sub>) corresponde aos resíduos 180 a 193. A síntese do Prp[180-193] foi realizada pelo método F-moc fase sólida, a partir da resina Rink Amide, da qual o peptídeo foi posteriormente clivado e desprotegido utilizando éter diisopropílico. O Prp[180-193] foi purificado por RP-HPLC utilizando uma coluna preparativa Vydac C<sub>18</sub> (10 $\mu$ , 2,2 x 25 cm) e uma fase móvel de composição ACN/TFA. A identificação do peptídeo (massa molecular e sequência) foi realizada por espectrometria de massa tandem com ionização electrospray. A concentração de Prp[180-193] foi determinada por espectroscopia Uv-Vis pelo método de Murphy e Kies<sup>(3)</sup>. As análises voltamétricas foram realizadas utilizando o conjunto voltamétrico Metrohm 646/7 no modo pulso diferencial. A célula eletroquímica foi composta pelos eletrodos: HMDE (trabalho), eletrodo Ag/AgCl (KCl 3 mol L<sup>-1</sup>) (referência) e eletrodo de Platina (auxiliar). Uma solução de KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> foi utilizada como eletrólito suporte. Nos espectros de massa obtidos para o Prp[180-193] (MS e MS/MS), a massa molecular experimental (MM = 1485,80 Da) foi coincidente com a massa molecular teórica (MM = 1485,91 Da) e a sua fragmentação proporcionou a confirmação de sua sequência, o que comprova a eficiência da síntese, cujo rendimento médio foi de 75%.

A figura 1 mostra os voltamogramas obtidos para o  $\text{Cu}^{2+}$  ( $4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) na ausência e na presença de Prp[180-193] ( $8,527 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ). Observou-se um decaimento progressivo na corrente de oxidação do  $\text{Cu}^{2+}$ , quando das adições de Prp[180-193]. A eliminação completa da corrente de pico do íon metálico foi observada após a adição de 120  $\mu\text{L}$  da solução de Prp[180-193]. Tal fato evidencia a interação do Prp[180-193] com o  $\text{Cu}^{2+}$  e aponta para uma estequiometria de 1 Cu: 1 Prp[180-193]. O cálculo de  $K_d$  para o complexo foi realizado utilizando-se o método da Lei de Ação das Massas ( $K_d = 6,036 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ) e o método da Titulação Amperométrica, ( $K_d = 1,059 \times 10^{-7}$

$\text{mol L}^{-1}$ ). A estequiometria obtida, 1 Cu : 1 Prp[180-193], está de acordo com a literatura<sup>(2)</sup> e sugere a ligação do cobre ao resíduo de histidina, localizado no centro da seqüência do peptídeo. Os valores determinados para o  $K_d$  do complexo Cu(II)-Prp[180-193], pelos dois métodos de cálculo, não diferem significativamente, são inéditos pois ainda não existem dados disponíveis na literatura, mostram que o complexo Cu(II)-Prp[180-193] é bastante estável e que possui um potencial padrão médio ( $E^0$ ) médio de 0,3465 V.

- (1) R.C. Prince, D.E. Gunson; *Trends in Biochemical Science*, 23 (1998) 197-198.
- (2) D.R. Brown et al.; *J. Inorg. Biochemistry*, 98 (2004) 133- 143.
- (3) J.B. Murphy, M.W. Kies; *Biochem. Biophys. Acta*, 45 (1960) 382-384.

CNPq, IQ/UnB, FAPEMIG e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.



**Figura 1.** Voltamogramas para o  $\text{Cu}^{2+}$  na ausência (curva 1) e na presença de Prp[180-193] (curvas 2 a 7). Adições sucessivas de 20, 40, 60, 80, 100 e 120  $\mu\text{L}$  de Prp[180-193]  $8,527 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

**2.2 – OLIVEIRA FILHO, W.P., CASTRO, C.S.P., SOUZA, J.R., “Estudo da interação entre a BSA e íons cobre (II) por voltametria de redissolução anódica”, Anais do 13º. Encontro Nacional de Química Analítica, p.37, UFF – Niterói-RJ (2005).**

## **ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE A BSA E ÍONS COBRE (II) POR VOLTAMETRIA DE REDISSOLUÇÃO ANÓDICA**

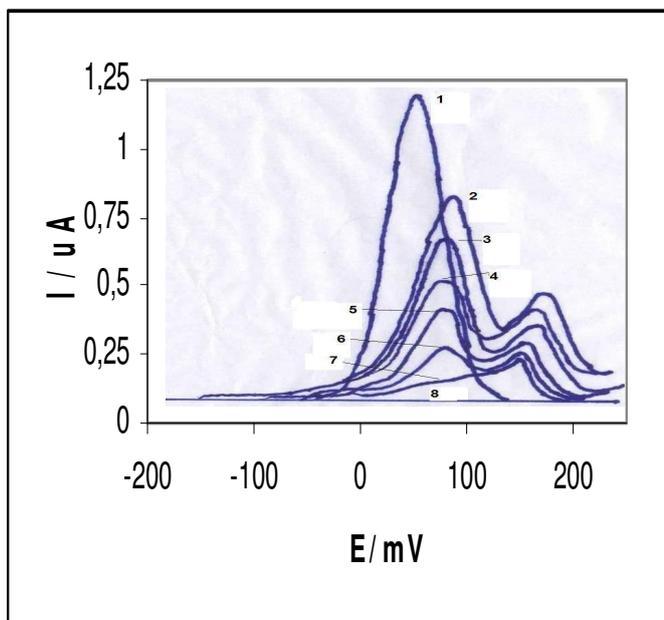
Waldemar Pacheco de Oliveira Filho (PG)<sup>1</sup>, Jurandir Rodrigues de Souza (PQ)<sup>1</sup> e Clarissa Silva Pires de Castro (PQ)<sup>2</sup>. pacheco@unb.br

<sup>1</sup>Laboratório de Química Analítica e Ambiental, Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília – DF. <sup>2</sup>Laboratório de Espectrometria de Massa, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF

A BSA (albumina sérica bovina) é uma proteína globular, solúvel em água, que apresenta 582 resíduos de aminoácidos em sua estrutura e possui uma massa molecular de aproximadamente 66.000 Da. A BSA apresenta vários sítios de ligação para íons metálicos<sup>(1)</sup>, dentre os quais se inclui o cobre (II). O cobre se liga geralmente à BSA formando uma esfera de coordenação com 2 átomos de nitrogênio (provenientes da cadeia imidazólica de histidina) e 2 átomos de oxigênio (provenientes de moléculas de água)<sup>(1)</sup>. Este trabalho tem como objetivo obter parâmetros quantitativos ( $K_d$ , estequiometria) do sistema Cu(II)-BSA que ajudem a compreender de que forma ocorre a interação entre a albumina sérica bovina e os íons cobre (II).

Neste trabalho foi estudada a interação de íons cobre (II) com a BSA por meio de voltametria de redissolução anódica. Como equipamento foi utilizado o conjunto voltamétrico Metrohm 646/7 no modo DPN (pulso diferencial). A célula eletroquímica foi composta pelos seguintes eletrodos: HMDE (trabalho), eletrodo Ag/AgCl (KCl 3 mol L<sup>-1</sup>) (referência) e eletrodo de Platina (auxiliar). Uma solução de KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> foi utilizada como eletrólito suporte. A concentração de BSA foi determinada por espectroscopia Uv-Vis a 280 nm utilizando a lei de Beer.

A figura 1 mostra os voltamogramas obtidos para o Cu<sup>2+</sup> (4 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>) na ausência e na presença da BSA (2,684 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>). Observou-se um decaimento progressivo na corrente de oxidação do Cu<sup>2+</sup>, quando das adições de BSA. A eliminação completa da corrente de pico do íon metálico foi observada após a adição de 300 uL da solução de BSA. Tal fato evidencia a interação da BSA com o Cu<sup>2+</sup>, e aponta para uma estequiometria de 1 Cu: 1 BSA. O cálculo de  $K_d$  para o complexo foi



**Figura 1.** Voltamogramas para o Cu<sup>2+</sup> na ausência (curva 1) e na presença de BSA (curvas 2 a 7). Adições sucessivas de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 uL de BSA 2.684 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>.

realizado utilizando-se dois métodos. Pela lei de ação das massas, foi obtido um valor de  $K_d$  de  $2,079 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ . Pelo método desenvolvido por Niu e Dong<sup>(2)</sup>, o qual utiliza a equação  $I_p^2 = K_d/[BSA] (I_{p0}^2 - I_p^2) + I_{p0}^2 - [BSA]$ , onde  $I_p$  e  $I_{p0}$  são as correntes de pico para o  $\text{Cu}^{2+}$  na presença e na ausência de BSA, foi obtido um valor de  $K_d$  de  $2,390 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ .

Nos voltamogramas, observou-se ainda o aparecimento de um sinal voltamétrico, na região de + 150 mV, à direita do pico característico do cobre, após adições de BSA. Este sinal está associado ao complexo Cu(II)-BSA, pois o valor obtido no cálculo do potencial padrão ( $E^0$ ) para o complexo (vs. Ag/AgCl), a partir do valor de  $K_d$ , foi da ordem de + 150 mV.

A estequiometria obtida, 1Cu:1BSA, está de acordo com a literatura<sup>(3)</sup>. Os valores determinados para o  $K_d$  do complexo Cu(II)-BSA, utilizando os dois métodos de cálculo, não diferem significativamente e são inéditos pois ainda não existem dados disponíveis na literatura. Além disso, os  $K_{ds}$  obtidos mostram que o complexo Cu(II)-BSA é bastante estável.

(1) M. Studnikova, J. Pitrinkova, J.M. Kovar; *Bioelectrochem. and Bioenergetics*, 25 (1991) 109-120.

(2) J. Niu, S. Dong; *Electrochimica Acta*, 39 (1994) 2455-2460.

(3) I.M. Koltoff, B.R. Willeford Jr; *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 5673- 5678.

Agradecimentos ao CNPq, IQ/UnB e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.