Estudos preliminares da determinação de metalotioneínas (MTs) por Adsortive Transfer Stripping

Thaís L. Braga[1](IC), Luiz Américo. A. Mota[1](IC), André B. Barreto [1](IC), Silvia Maria Sella[1](PQ), Aída Maria B. Bittencourt Filha[1](PQ)*

1) Universidade Federal Fluminense, Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Outeiro de São João Baptista, s/n, Niterói, RJ . e-mail: gqaaida@vm.uff.br

Palavras Chave: *metalotioneínas (MTs), fitoquelatinas (PCs), análise voltamétrica*

Introdução

Utilizando-se como base o método modificado de Brdicka para a determinação do conteúdo total das metalotioneínas e/ou fitoquelatinas, estudou-se o efeito da velocidade de varredura, da presença dos tampões Tris, Tris + SDS e tampão acetato no formato da onda catalítica de hidrogênio. Foram avaliadas as possíveis interferências de cisteína e dos metais Zn, Pb, Cd, Mn, Fe e Cr no formato da onda. A metodologia[1] foi adaptada para a determinação das MTs por voltametria por onda quadrada, após a etapa de pré-concentração em tampão fosfato e redissolução em tampão amoniacal em presença de cobalto.

Resultados e Discussão

Proteínas contendo o grupo tiol na sua estrutura produzem ondas polarográficas características em solução contendo cobalto devido à evolução catalítica de hidrogênio. Na ausência de MTs, observa-se somente um pico correspondente a redução do cobalto. Quando MT é adicionada, há uma redução do pico do correspondente ao cobalto e o aparecimento dois outros picos, o a potenciais mais negativos correspondendo a evolução catalítica de hidrogênio e o outro a redução do complexo RS_2Co. Devido a similaridade de comportamento, a metodologia pode ser aplicada a análise de MTs ou de PCs. O comportamento voltamétrico é altamente dependente da velocidade de varredura, figura 1.

As MT's (metalotioneína I de fígado de coelho, SIGMA) foram pré-concentradas por 60s em solução tampão fosfato 4 mM pH 7,4. O método foi interrompido, a gota lavada por imersão 3 vezes em tampão fosfato de modo a retirar as espécies pobremente adsorvidas e então realizada a análise utilizando como eletrólito suporte tampão amoniacal 0,1M contendo cobalto 1mM. Como a resposta é dependente da temperatura, todas as análises foram feitas a 24 °C por voltametria por onda quadrada, com E_i = -800 mV; E_f =-1900 mV; amplitude do degrau = 10 mV; duração do degrau 0,01 s, tempo de purga na etapa de adsorção e na de redissolução de 300 s. Não houve interferência no formato da curva das MTs quando em presença de TRIS, TRIS com SDS, e tampão acetato durante o processo de pré-concentração. Em concentrações abaixo de 500 mg/L não interferem os metais Cd, Fe, Mn, Zn, Pb e abaixo de 25 mg/L Cr. A cisteína em proporção superior a 1:10 interfere na metodologia, sendo necessário uma separação prévia antes da determinação das fitoquelatinas, por exemplo, por cromatografia utilizando coluna de exclusão por tamanho.

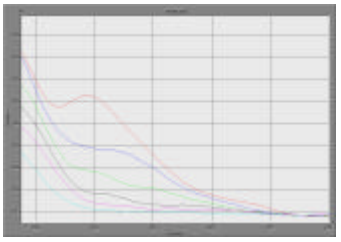

Figura 1: Variação da velocidade de varredura no formato da onda catalítica, curva inferior 10 mV/s e superior 1000 mV/s. MT a 1,0 mg/L.

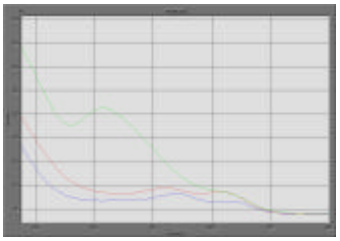

Figura 2: Voltamogramas do branco, sem e com pré-concentração em tampão fosfato (onde observa-se a redução do cobalto) e da metalotioneína pré-concentrada por 60s (curva superior).

O método é aplicável a determinação de MTs ou PCs até 1,5 mg/L, curva analítica em área de pico $y = 3{,}51.10^{-6}x - 9{,}49.10^{-7}$ com R^2 de 0,982.

Conclusões

A metodologia mostrou-se adequada para a determinação de MTs/PCs até 1,5 mg/L, sendo necessário a separação prévia de cisteína. A metodologia será aplicada na determinação de PCs em plantas bioacumuladoras de metais pesados.

Agradecimentos

PIBIC/CNPq , IQ-UFF

[1] Fojta, M; Fojtova, M. et all, *Analytica Chimica Acta* **2006**, 558, 171.