

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CAMPUS DE BOTUCATU

SELÊNIO EM TILÁPIA DO NILO UTILIZANDO ELETROFORESE EM  
GEL E ESPECTROMETRIA ATÔMICA

FÁBIO ARLINDO SILVA

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Zootecnia como  
parte dos requisitos para a obtenção  
do título de Doutor em Zootecnia.

BOTUCATU - SP

Julho – 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CAMPUS DE BOTUCATU

SELÊNIO EM TILÁPIA DO NILO UTILIZANDO ELETROFORESE EM  
GEL E ESPECTROMETRIA ATÔMICA

Fábio Arlindo Silva  
Biólogo

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha  
Co-orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Zootecnia como  
parte dos requisitos para a obtenção  
do título de Doutor em Zootecnia.

BOTUCATU - SP  
Julho - 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
*BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus*

Silva, Fábio Arlindo.

Selênio em tilápia do Nilo utilizando eletroforese em gel e espectrometria atômica / Fábio Arlindo Silva. – Botucatu [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2009.

Orientador: Pedro de Magalhães Padilha

Co-orientador: Marco Aurélio Zezzi Arruda

Assunto CAPES: 50701029

1. Tilápia 2. Selênio 3. Eletroforese - Aplicações científicas 4. Espectrometria de absorção atômica

CDD 597.5

Palavras-chave: Eletroforese em gel; Espectrometria atômica; Proteínas; Selênio; Tilápia do Nilo

## DEDICATÓRIA

*“À minha esposa, Lucía, por estar sempre do meu lado, sem o seu apoio eu jamais conseguiria realizar este trabalho. Muito obrigado. Eu te amo muito,*

*Ao meu filho Fábio André, a maior alegria da minha vida,*

*À minha mãe Quitéria, pelo apoio e incentivo nos meus estudos acadêmicos,*

*À minha sogra Egle, à tia Ná, Paula, Alex e Isabelinha,*

*Aos meus grandes amigos Alessandro, Clayton, Tuca, Paraná, Renato e Silvio*

*Aos meus grandes amigos da UNICAMP, Marcelo e Adilson*

*Ao meu orientador e amigo Pedro de Magalhães Padilha, por todo apoio a mim dispensado não só neste trabalho, mas em outros também. MUITÍSSIMO obrigado.”*

## AGRADECIMENTOS

*“Agradeço a todos que contribuíram para a realização desse trabalho, direta ou indiretamente,*

*À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão de bolsa (Processo: 06/55039-5),*

*Ao LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron), em especial ao Dr. Carlos A. Pérez, pelo suporte dado nos experimentos na linha de fluorescência de raios-X,*

*Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda, pela co-orientação e abertura do seu laboratório para a realização desse trabalho.*

*Ao Prof. e amigo Dr. Gustavo Rocha de Castro pela abertura do seu laboratório para a realização desse trabalho,*

*Aos amigos da UNICAMP, em especial ao Marcelo e Adilson, pelo apoio no desenvolvimento do trabalho,*

*Aos Professores e amigos do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da UNESP/Botucatu, Luiz Edivaldo Pezzato e Margarida Maria Barros, pelo fornecimento de amostras para realização deste estudo*

*Aos amigos do Departamento de Química e Bioquímica da UNESP/Botucatu, Maria, Vânia, Fabinho, Lurdinha, Elaine, Prof<sup>a</sup> Sônia, Prof. Zé Pedro, Prof. Júlio,*

*Aos companheiros de Pós-graduação do Departamento de Química, Jomílson, Sidney, Rafinha, Murilo, Renato, Felipe, Paula e Mayra,*

*E a Deus, pois ele está acima de tudo.”*

## **SUMÁRIO**

<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>1</b>
1. Introdução.....	2
1.1. Considerações iniciais e justificativas.....	2
1.1.1. As Proteínas.....	3
1.1.2. Metaloproteínas e proteínas ligadas a metais.....	4
1.1.3. Proteínas que apresentam selênio.....	6
1.1.4. Utilização do selênio na nutrição de peixes.....	7
1.1.5. Fracionamento de proteínas por eletroforese.....	8
1.1.5.1. Fatores que afetam a eletroforese.....	8
1.1.5.2. Tipos de eletroforese.....	9
1.1.5.2.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	9
I. Eletroforese em gel de poliacrilamida em uma dimensão (1D-PAGE).	10
II. Eletroforese em gel de poliacrilamida em duas dimensões (2D-PAGE).....	10
1.1.6. Espectrometria Atômica.....	11
1.1.6.1. Aspectos Históricos.....	11
1.1.6.2. Aspectos Teóricos.....	12
1.1.6.3. Absorção Atômica.....	14
1.1.6.3.1. Espectrometria de Absorção Atômica por chama – FAAS.....	15
1.1.6.3.2. Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite – GFAAS.....	16
1.1.6.3.3. Análises Quantitativas em Absorção Atômica.....	19
1.1.6.3.4. Determinação de nutrientes metálicos por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.....	21
1.1.6.3.5. Outras aplicações da técnica de espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.....	22
1.1.6.4. Fluorescência de raios-X com radiação síncrotron (SR-XRF).....	24
2. Referências.....	26
Anexo I: Lista de Abreviaturas .....	34

<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>35</b>
Avaliação de Selênio em spots protéicos de plasma e tecidos muscular e hepático de tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) por SR-XRF após separação por 2D-PAGE.....	36
Resumo.....	36
Abstract.....	37
1. Introdução.....	38
2. Experimental.....	39
2.1. Equipamentos.....	39
2.2. Reagentes e Soluções.....	39
2.3. Coleta e preparo das amostras.....	40
2.4. Preparação das amostras para eletroforese.....	40
2.4.1. Extração das proteínas das amostras.....	40
2.4.2. Precipitação e Ressolubilização das proteínas.....	41
2.4.3. Determinação da concentração das proteínas totais.....	41
2.5. Separações eletroforéticas.....	42
2.6. Determinação qualitativa do selênio por SR-XRF nos spots de proteínas das amostras.....	44
3. Resultados e discussão.....	45
3.1. Determinação da concentração de proteínas totais nas amostras.....	45
3.2. Otimização das separações eletroforéticas.....	45
3.3. Avaliação qualitativa de selênio por SR-XRF nos spots protéicos das amostras de plasma, músculo e fígado de tilápia do Nilo.....	47
4. Conclusão.....	51
Referências.....	51
Anexo II: Lista de Abreviaturas.....	53
 <b>CAPÍTULO III.....</b>	 <b>54</b>
Determinação de selênio em amostras de tecido muscular e hepático de tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) por GFAAS utilizando extração por ultra-som.....	55
Resumo.....	55
Abstract.....	56
1. Introdução.....	57
2. Experimental.....	58

2.1.	Reagentes e Soluções.....	56
2.2.	Coleta e preparo das amostras.....	58
2.3.	Extração do selênio.....	59
2.4.	Equipamentos.....	59
2.5.	Preparo do tubo de grafite recoberto internamente com carbeto de tungstênio.....	60
2.6.	Preparo da curva analítica.....	60
2.7.	Preparo dos extratos ácidos para injeção no tubo de grafite.....	61
2.8.	Procedimentos analíticos.....	61
3.	Resultados e Discussão.....	62
3.1.	Otimização do tempo de sonificação no processo de extração do selênio.....	62
3.2.	Otimização da potência do ultra-som no processo de extração do selênio.....	63
3.3.	Otimização das condições experimentais para determinação de selênio por GFAAS nos extratos ácidos obtidos no processo de extração.....	65
3.4.	Obtenção da curva analítica.....	66
3.5.	Figuras de mérito do método de extração por ultra-som.....	67
4.	Conclusões.....	68
	Referências.....	68
	Anexo III: Lista de Abreviaturas .....	71
	<b>CAPÍTULO IV</b> .....	<b>72</b>
	Implicações.....	73

# *CAPÍTULO I*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Considerações iniciais e justificativas

A produção mundial de pescado procedente da aquicultura é estimada em 47 milhões de toneladas, das quais 28 milhões são decorrentes do cultivo em águas continentais, principalmente em países tropicais, como o Brasil. Das espécies ícticas criadas em ambientes tropicais de água doce destacam-se as tilápias com uma produção mundial que supera dois milhões de toneladas. Nos últimos anos no Brasil ocorreu um considerável aumento na produção de tilápias, o que tem levado pesquisadores que trabalham com aquicultura a desenvolverem trabalhos relacionados ao comportamento, fisiologia, genética e nutrição dessa espécie.<sup>1,2</sup> É consenso entre esses pesquisadores a fundamental importância dos íons metálicos, pois eles são essenciais como componentes estruturais e em muitos processos vitais, podendo funcionar como agentes sinalizadores, como catalisadores, ou ainda alterar a expressão gênica.<sup>3-5</sup>

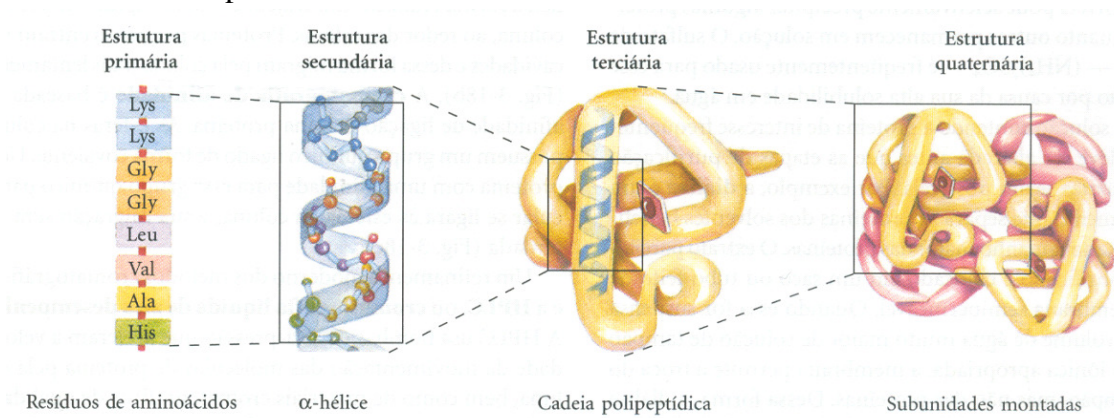
A concentração total desses íons metálicos em amostras biológicas ou ambientais tem sido normalmente determinada por métodos analíticos altamente sensíveis, como a AAS (Espectrometria de absorção atômica), ICP (Plasma acoplado indutivamente), ICP-MS (espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente), XRF (Espectrometria de fluorescência de raios-X), entre outros. Porém, muitos processos envolvendo elementos em baixas concentrações ou elementos traço estão longe de ser bem entendidos, pois a maioria das matrizes de interesse biológico, por exemplo, fluidos corporais, tecidos ou alimentos, são muito complexas e, portanto, de difícil análise.<sup>6,7</sup> Assim, as conclusões sobre a importância do metal para biomoléculas, mais especificamente as proteínas, são muitas vezes fragmentadas.<sup>4</sup>

A compreensão dos papéis que envolvam metais e proteínas depende da qualidade da informação obtida após a análise metal-proteína.<sup>4</sup> Dessa forma, a determinação de íons metálicos ligados à proteínas, mais especificamente de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), poderá trazer informações importantes para a área de fisiologia, genética e nutrição de peixes.

### 1.1.1. As Proteínas

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes e com maior diversidade de funções nos seres vivos. Por exemplo, enzimas e hormônios controlam e regulam o metabolismo do organismo, enquanto proteínas contráteis ensejam a realização de movimentos. Nos ossos, o colágeno forma uma estrutura para deposição de cristais de fosfato de cálcio. Na corrente sanguínea, a hemoglobina e albumina transportam moléculas essenciais à vida, enquanto as imunoglobulinas são responsáveis pela defesa, por exemplo, contra vírus e bactérias causadoras de infecções.<sup>8</sup>

Os 20 aminoácidos comumente encontrados em proteínas estão unidos entre si por ligações peptídicas. A seqüência linear dos aminoácidos ligados contém a informação necessária para formar a molécula protéica com uma estrutura tridimensional única. A complexidade da estrutura protéica é melhor analisada considerando-se a molécula em termos de quatro níveis de organização, denominados primário, secundário, terciário e quaternário.<sup>8,9</sup> A descrição de todas as ligações covalentes, principalmente ligações peptídicas e ligações dissulfeto, unindo resíduos de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica é sua **estrutura primária**. O mais importante elemento da estrutura primária é a sua seqüência de resíduos de aminoácidos. A **estrutura secundária** refere-se a arranjos particularmente estáveis de resíduos de aminoácidos dando origem a padrões estruturais recorrentes. A **estrutura terciária** descreve todos os aspectos do enovelamento tridimensional de um polipeptídeo. Quando uma proteína possui duas ou mais subunidades polipeptídicas, seu arranjo no espaço é referido como **estrutura quaternária**.<sup>9</sup> A Figura 1 mostra esquematicamente os níveis de estruturas das proteínas.



**Figura 1:** Níveis de estrutura nas proteínas.<sup>9</sup>

Muitas proteínas contêm apenas resíduos de aminoácidos e nenhum outro constituinte químico, sendo consideradas proteínas simples. Entretanto, algumas proteínas contêm permanentemente associados outros componentes químicos além dos aminoácidos. Essas proteínas são chamadas de proteínas conjugadas. A parte não-aminoácido de uma proteína conjugada é usualmente chamada de grupo prostético. Usualmente, o grupo prostético desempenha papel importante na função biológica da proteína. Proteínas conjugadas são classificadas com base na natureza química de seus grupos prostéticos. Por exemplo, as lipoproteínas contêm lipídios, as glicoproteínas contêm grupos açúcar e as metaloproteínas um metal específico.<sup>9</sup> A Tabela 1 mostra alguns exemplos de proteínas conjugadas.

**Tabela 1:** Proteínas conjugadas.<sup>9</sup>

Classe	Grupo Prostético	Exemplo
Lipoproteínas	Lipídios	$\beta_1$ -lipoproteína do sangue
Glicoproteínas	Carboidratos	Imunoglobulina G
Fosfoproteínas	Grupos fosfato	Caseína do leite
Hemoproteínas	Heme (porfirinas de ferro)	Hemoglobina
Flavoproteínas	Nucleotídios de flavina	Desidrogenase succínica
Metaloproteínas	Ferro	Ferritina
	Zinco	Desidrogenase alcoólica
	Cálcio	Calmodulina
	Molibdênio	Dinitrogenase
	Cobre	Plastocianina

### 1.1.2. Metaloproteínas e proteínas ligadas a metais

Embora os íons metálicos constituam uma pequena porção do tecido corporal (4%), são essenciais em muitos processos vitais. Os principais papéis desses íons metálicos podem ser descritos como estrutural e funcional. No aspecto funcional, destaca-se o papel catalisador nos sistemas enzimáticos, por meio da ligação desses íons a substratos, e a mediação nas reações de óxido-redução, através de mudanças reversíveis no estado de oxidação do íon metálico. No aspecto estrutural, destaca-se o papel como integrantes de compostos orgânicos do corpo, tais como o ferro na

hemoglobina, o iodo na tiroxina, o cobalto na vitamina B<sub>12</sub> e o enxofre na tiamina e biotina, eles atuam na estabilização dessas biomoléculas, por meio da estabilização e ou proteção de cargas negativas. Existem funções nas quais o balanço de íons é importante, por exemplo, para a formação dos ossos, para a quantidade e relação entre cálcio e fósforo, para a atividade muscular e para a relação entre cálcio e potássio no fluido extracelular. Os eletrólitos, dos quais os sais de sódio e potássio são os mais importantes, representam os principais fatores no controle osmótico do metabolismo da água.<sup>3,10-12</sup>

As metaloproteínas e os íons metálicos ligados às proteínas representam uma grande porção do número total de proteínas. Estima-se que aproximadamente 40% de todas as proteínas e enzimas necessitam de um íon metálico para realizar atividade biológica.<sup>4,10</sup> Esses íons são responsáveis por muitos processos metabólicos, como conversão de energia na fotossíntese e respiração, expressão e regulação gênica, além de processos catalíticos, como ligação a um substrato e ativação do mesmo, transporte e armazenamento.<sup>4</sup>

As metaloproteínas são consideradas diferentes das proteínas ligadas a metais. As metaloproteínas constituem um grupo de proteínas que contêm um cofator metálico incorporado por meio de ligações específicas, caracterizando-se pela alta afinidade da interação metal-proteína. Já as proteínas ligadas a metais constituem um grupo de proteínas onde os íons metálicos são incorporados por ligações não-específicas, caracterizando-se pela baixa afinidade da ligação metal-proteína. Assim, essa ligação é facilmente quebrada.<sup>4,13</sup> Fracamente ligados às proteínas, estão os íons monovalentes como o sódio e o potássio. De intensidade moderada, o magnésio e o cálcio. Dentre os metais que apresentam forte ligação às proteínas, mais frequentemente, estão os metais de transição, como ferro, cobre, zinco, manganês, molibdênio e cobalto, devido às suas propriedades (densidade, pequeno raio atômico e interação via eletromagnética e forças eletrostáticas), estão ligados à maioria das metaloproteínas.<sup>4,11,14-17</sup> Outro grupo de metaloproteínas, de baixa massa molecular (6-7 kDa), são as chamadas metalotioneínas. As metalotioneínas apresentam alta afinidade não só com íons metálicos essenciais, como cobre e zinco, mas também com os metais potencialmente tóxicos, como cádmio e mercúrio. Estas metalotioneínas estão presentes em vertebrados, plantas, fungos, algas e até em bactérias metal-resistentes.<sup>4,14-18</sup>

### 1.1.3. Proteínas que apresentam selênio

As proteínas que apresentam selênio, conhecidas até agora, são divididas em três grupos: proteínas com as quais o selênio está incorporado de forma não específica; proteínas com as quais o selênio está ligado de forma específica, definidas como selenoproteínas; e as proteínas ligadas a selênio. No primeiro grupo, o das proteínas com as quais o selênio está incorporado não especificamente, em dietas enriquecidas com selenometioninas, o selênio é metabolizado do mesmo modo como são metabolizados outros compostos de selênio como, por exemplo, selenito, selenato e selenocisteína. Porém, parte do selênio é depositada diretamente de forma não específica dentro de certas proteínas. O segundo grupo, o das selenoproteínas, após ingestão normal de selenito, selenato ou selenocisteína, quase todo o selênio é transportado para dentro dessas selenoproteínas. O terceiro grupo, o de proteínas ligadas ao selênio, constitui proteínas específicas nas quais o selênio está somente ligado às moléculas. Até agora somente duas proteínas, de 14 kDa e 56 kDa foram detectadas em fígado de camundongo. Porém as funções são ainda desconhecidas.<sup>19</sup>

A maioria das selenoproteínas identificadas até agora em mamíferos são selenoenzimas, com resíduos de selenocisteína, responsáveis pela função catalítica. Dentre elas, algumas com funções conhecidas como a glutathione peroxidase, responsável pela conversão de peróxido de hidrogênio em compostos atóxicos, protegendo a célula do dano oxidativo.<sup>19,20</sup> Essa enzima foi identificada no citosol celular, trato gastrointestinal e em núcleos de espermatozóides. Além das glutathione peroxidase também foram identificadas as iodotironinas deiodinase, responsáveis pela ativação/inativação dos hormônios da tireóide, que regulam vários processos metabólicos, as tioredoxinas redutase, presentes em vários tecidos, responsáveis por catalizar a redução NADPH-dependente, e as selenofosfatos sintetase.<sup>19</sup>

Selenoproteínas com funções desconhecidas também foram encontradas. Dentre elas a selenoproteína P, uma glicoproteína de 43 kDa que constitui mais de 60% do selênio no plasma. Outra selenoproteína de função desconhecida é a selenoproteína W, encontrada em músculo esquelético de ratos, pouco menor que 10 kDa. Uma selenoproteína denominada 15-kDa selenoproteína, detectada em ratos e humanos e outra denominada 18-kDa selenoproteína também foram encontradas.<sup>19</sup> Essa última, foi encontrada em tecidos de rim, cérebro, coração e fígado de ratos, alimentados com

dietas pobres em selênio. Além disso, grande diversidade de proteínas que continham selênio, também foram identificadas.<sup>21</sup>

#### **1.1.4. Utilização do selênio na nutrição de peixes**

Selênio em peixes deriva da água e da dieta. Um alto nível de selênio na água é tóxico ao peixe e pode acarretar-lhe a diminuição do crescimento ou mesmo sua morte. A captação de selênio pelas brânquias é muito efetiva, principalmente como selenito, e o elemento pode ser armazenado dentro de vários tecidos, em sua forma inorgânica, com exceção do fígado. Para selênio dietético que é armazenado na forma orgânica, a margem entre a exigência nutricional e o limiar tóxico é muito estreita. Normalmente, dietas com aproximadamente 1 mg de selênio/kg de alimento são consideradas ideais, variando de espécie para espécie, e o limite tóxico chega bem próximo ao valor ideal. Compostos de selênio estão presentes em vários alimentos. Selenito e selenato são formas inorgânicas de selênio, enquanto selenometionina, selenocistina e selenocisteína são formas orgânicas.<sup>22, 23</sup>

Vários fatores associados à quantidade de selênio nos alimentos ou com outros alimentos em dietas misturadas podem afetar a biodisponibilidade do elemento na dieta, influenciando a utilização da sua quantidade ingerida nas fases de digestão/absorção, ou metabolismo/excreção. Suplementações com selênio de sódio mostraram-se mais significativas na biodisponibilidade em comparação às dietas com outras formas de selênio.<sup>24,25</sup>

A estimativa da disponibilidade do selênio na nutrição animal obedece três critérios de respostas biológicas. A primeira é a metodologia preventiva, que envolve a avaliação da concentração de selênio necessária para suprir a deficiência desse elemento. A segunda é a avaliação das concentrações de selênio nos tecidos, que relaciona a eficiência relativa de uma quantidade conhecida em manter sua concentração em diferentes tecidos. A terceira é a chamada “ensaio funcional”, e envolve a avaliação da eficiência relativa de quantidades conhecidas de selênio em manter a atividade da glutathiona peroxidase em vários tecidos.<sup>26</sup>

### 1.1.5. Fracionamento de proteínas por eletroforese

A eletroforese é uma das técnicas analíticas mais importantes da investigação bioquímica atual.<sup>27</sup> A teoria relacionada com a eletroforese consiste na separação de moléculas em uma mistura, sangue, urina, líquor e outras soluções, sob influência de um campo elétrico aplicado. As moléculas dissolvidas no campo elétrico movem-se ou migram a uma velocidade determinada por suas cargas, ou seja, aplicando-se uma carga elétrica à estas moléculas, quanto maior a carga de uma molécula, maior será a velocidade com que essa molécula se moverá em relação às outras que possuem carga menor. No caso, as substâncias que apresentam pouca ou nenhuma carga, permanecerão relativamente paradas, enquanto que outros componentes, carregados eletricamente, se moverão em direção ao pólo de carga oposta.<sup>27-30</sup>

O avanço biotecnológico nos tempos modernos mostrou a relevância da eletroforese como meio de análise e purificação de produtos de natureza protéica, seja de origem animal ou vegetal. Dessa forma, a eletroforese tem sido comumente aplicada na separação e caracterização de aminoácidos, peptídeos, enzimas, proteínas, nucleotídeos e outras substâncias de relevância biológica que podem apresentar carga em função do pH do meio.<sup>31</sup>

#### 1.1.5.1. Fatores que afetam a eletroforese<sup>27,28,31</sup>

Dentre os principais fatores que influenciam a eletroforese pode-se destacar o pH, força iônica, temperatura e condições elétricas.

O pH do meio é decisivo na apresentação da carga da substância. Assim, se a substância é de origem protéica, ela apresentará um ponto isoelétrico (pI) ou pH isoelétrico, que é um pH característico onde a carga líquida da molécula é zero, e a migração só será possível se o pH for diferente do pI. Em uma curva de mobilidade de uma proteína em função do pH do meio da corrida eletroforética, é percebido que valores de  $\text{pH} > \text{pI}$  fazem a proteína se comportar como anionte, migrando para o anodo (pólo positivo), já valores de  $\text{pH} < \text{pI}$  fazem a proteína se comportar como cationte, migrando para o catodo (pólo negativo) e, quando pH for igual ao pI não haverá migração.

A força iônica influencia a espessura da dupla camada elétrica quando significativas concentrações de eletrólitos estão presentes. Assim, uma alta força iônica

no sistema irá acarretar em significativa resistência à migração eletroforética, com alta intensidade de corrente e baixa diferença de potencial (d.d.p.).

A mudança de temperatura acarretada pela passagem de corrente elétrica também influencia a mobilidade eletroforética. Em princípio, o aumento de temperatura aumenta a mobilidade eletroforética, porém, significativos aumentos podem gerar gradientes de temperatura no meio e acarretar em distorções das migrações. Além disso, a grande quantidade de calor produzida pode levar a evaporação dos sistemas líquidos do meio e provocar rachaduras e/ou rupturas do mesmo, inutilizando-o.

Quanto às condições elétricas, para haver migração eletroforética de uma partícula carregada, o meio deve estar desequilibrado eletricamente. Esse desequilíbrio é provocado por uma fonte de corrente contínua com capacidade de gerar uma força eletromotriz medida em volts. Essas condições elétricas irão definir o tempo de corrida eletroforética. Assim, baixas condições elétricas irão acarretar em maiores tempos de corrida, enquanto que altas condições irão acarretar em tempos menores de corrida.

#### **1.1.5.2. Tipos de eletroforese**<sup>27,28,31</sup>

Nos dias atuais, a eletroforese de proteínas está muito desenvolvida em meios gelatinosos (poliacrilamida e agarose). Nos primórdios da eletroforese, há cerca de 60 anos, o método usado era a eletroforese livre ou “moving boundary”. Nesse tipo, as proteínas eram separadas em meio líquido formado por uma solução tampão, na ausência de qualquer meio estabilizante. Dentre as eletroforeses estabilizadas distingui-se dois tipos: aquelas estabilizadas por um suporte sólido ou gelatinoso (papel, gel de amido, acetato de celulose ou poliacrilamida) e aquelas feitas em um meio líquido estabilizado por um gradiente, por exemplo, de sacarose.

O surgimento da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) permitiu o surgimento das chamadas eletroforeses descontínuas, que são baseadas na relação carga/peso molecular.

##### **1.1.5.2.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida**

Entre as técnicas eletroforéticas utilizadas no fracionamento de proteínas, a eletroforese em géis de poliacrilamida (PAGE) tem se mostrado a mais bem-sucedida na separação dessas macromoléculas. Nessa técnica, uma mistura de dois polímeros, a

acrilamida e a bisacrilamida, em diferentes concentrações, permite a criação de diferentes gradientes de separação.<sup>31,32</sup> A mobilidade das proteínas é dependente do tamanho dos poros do gel e da massa molar das proteínas. O percentual de acrilamida do gel é o que determina o tamanho de poro. Dessa forma, deve ser escolhido levando-se em consideração a massa molar da proteína a ser identificada.<sup>33</sup>

A eletroforese em gel de poliacrilamida pode ser classificada como em uma dimensão (1D) ou em duas dimensões (2D).

### **I) Eletroforese em gel de poliacrilamida em uma dimensão (1D-PAGE)**

Na eletroforese em gel de poliacrilamida em uma dimensão, pode-se analisar a proteína na forma nativa ou desnaturada, dependendo das condições empregadas na extração das proteínas. No sistema nativo ou não-dissociante as proteínas são separadas com base em sua carga, pelo método de focalização isoeletrica (IEF). Neste sistema é formado um gradiente de pH, no qual as proteínas carregadas eletricamente irão mover-se até um pH específico, onde apresentarão carga efetiva nula, conhecido como o pI da proteína. Em sistemas desnaturantes ou dissociantes as proteínas são solubilizadas em tampão contendo um reagente desnaturante, sendo o SDS (dodecilsulfato de sódio), o mais empregado. Esse detergente aniônico interage com as cadeias peptídicas das proteínas, desnaturando-as e formando um complexo SDS-Proteína, fornecendo-lhes cargas negativas. Assim todas as proteínas migram em direção ao eletrodo positivo e são separadas somente pelas diferenças relacionadas às suas massas molares. Esse tipo de eletroforese é conhecido como SDS-PAGE. Agentes redutores, tais como  $\beta$ -mercaptoetanol e DTT (1,4-ditiotreitol), são adicionados para romper as pontes dissulfetos (ligações -S-S-) presentes para facilitar o acesso do SDS às partes mais internas das proteínas.<sup>33,34</sup>

### **II) Eletroforese em gel de poliacrilamida em duas dimensões (2D-PAGE)**

Misturas complexas de proteínas não são bem resolvidas em eletroforese de apenas uma dimensão. Nesse caso, utiliza-se a eletroforese em géis bidimensionais, que combina dois métodos diferentes de separação. Nessa técnica, em uma primeira etapa, proteínas nativas são separadas em estreita fatia de gel em gradiente de pH imobilizado (gel de focalização isoeletrica). Cada proteína se deslocará até um ponto no gradiente que corresponde ao seu pI, como nesse ponto, sua carga líquida é zero, não ocorre mais migração da macromolécula. Atualmente, essa etapa ocorre em fitas pré-fabricadas de

gel de poliacrilamida onde os anfólitos estão imobilizados, formando assim um gradiente de pH. Após essa etapa a fita é incubada com um agente redutor e iodoacetamida, para se evitar a reoxidação dos grupos tióis. Em uma segunda etapa, a fita contendo as proteínas separadas por IEF é colocada no topo de outro gel, e assim as proteínas presentes na fita serão separadas de acordo com a massa molar por SDS-PAGE, em direção perpendicular a da primeira etapa. A associação destes dois tipos de eletroforese (IEF e SDS-PAGE) aumenta significativamente a resolução do método. Desta forma, cada ponto resultante observado no gel de 2D-PAGE corresponde a uma proteína específica, presente na amostra.<sup>34,35</sup>

## **1.1.6. Espectrometria Atômica**

### **1.1.6.1. Aspectos Históricos**

Conforme descrito no levantamento bibliográfico feito por Krug et al.:<sup>36</sup>

Os primeiros estudos referentes à absorção de luz datam de 1802, quando Wollaston e Fraunhofer descobriram a existência de linhas escuras no espectro da luz solar. Essa descoberta foi, posteriormente, melhor investigada por Fraunhofer que constatou que as linhas escuras indicavam a absorção de parte da energia da luz solar. Em 1820, Brewster estudando a absorção da luz, chegou à conclusão de que as raias de Fraunhofer poderiam ser devidas à presença de vapores atômicos na atmosfera solar, os quais absorveriam parte dessa radiação. Pouco tempo depois, Kirchhoff e Bunsen estabeleceram o princípio da absorção, após estudar sistematicamente várias linhas do espectro dos metais alcalinos e alcalino-terrosos. Em 1860, Kirchhoff estabeleceu a relação entre emissão e absorção e enunciou a seguinte lei: “Em condições especiais, todos os corpos podem absorver radiações que eles são capazes de emitir”. Em 1900, Max Planck estabeleceu a lei quântica de absorção e emissão da radiação, de acordo com a qual um átomo pode somente absorver radiação de comprimento de onda bem definido. Em 1955, o físico australiano Alan Walsh verificou que a maior parte dos átomos livres, presentes em um chama, permanecia no estado fundamental, pois a chama não tinha energia suficiente para promover transições eletrônicas para níveis mais elevados (exceto para os metais alcalinos e alguns alcalino-terrosos). Assim, com base nas leis de Kirchhoff e Planck, os átomos gerados em uma chama poderiam absorver a radiação proveniente de uma fonte de radiação primária e a quantificação dessa atenuação poderia ser utilizada para a determinação quantitativa dos mesmos. Dessa forma, Walsh propôs o conceito da espectrometria de absorção atômica e montou o primeiro protótipo de um espectrômetro de absorção atômica. No mesmo ano, Alkemade e Milatz também propuseram um espectrômetro de absorção atômica, porém Walsh é, reconhecidamente, o pai da técnica, devido a sua

insistência com a nova técnica e com as contribuições no desenvolvimento das lâmpadas de catodo oco. Em 1959, Boris V. L'Vov propôs o uso de um forno de grafite como atomizador para absorção atômica, com base em um modelo de forno proposto por King (1905). Pode-se considerar que essa técnica atingiu a maturidade a partir da proposição e aceitação das condições STPF “Stabilized Temperature Platform Furnace” proposta por Slavin e colaboradores. Em 1979, Harnly propôs o primeiro espectrômetro de absorção atômica com possibilidade de detecção simultânea, usando uma única lâmpada de xenônio como fonte de radiação contínua, podendo operar com chama ou com forno de grafite.

### 1.1.6.2. Aspectos Teóricos

A espectrometria atômica é uma das ferramentas mais importantes da química analítica. Devido à sua alta sensibilidade e à sua capacidade em distinguir um elemento de outro em uma amostra complexa, tem sido a técnica mais utilizada para a determinação de elementos individuais em amostras orgânicas e inorgânicas.<sup>37,38</sup>

Na espectrometria atômica, as amostras são vaporizadas em temperatura superiores à 2000 °C, decompondo-se em átomos.<sup>38</sup> Esses átomos são constituídos de um núcleo rodeado de elétrons. Todos os elementos possuem um número de elétrons que está associado com o núcleo atômico dentro da estrutura orbital que é única de cada elemento. Os elétrons ocupam posições nos orbitais em ordem e caminhos definidos. A energia mais baixa, que corresponde à configuração eletrônica estável do átomo, conhecida como “estado fundamental”, é a configuração normal para os átomos. Se alguma energia de grande magnitude é aplicada ao átomo, ela será absorvida e os elétrons mais externos (elétrons de valência) serão promovidos para configurações menos estáveis, denominadas “estados excitados”. Como este estado é instável, o átomo tende imediatamente e espontaneamente a retornar para a configuração do estado fundamental. O elétron irá retornar para o estado inicial, posição estável no orbital, e a energia radiante equivalente à quantidade absorvida no processo inicial de excitação será emitida.<sup>39-42</sup>

O processo descrito acima é representado pela Figura 2. Na primeira etapa ocorre a excitação forçada, proporcionada por fonte externa de energia, e na segunda etapa ocorre o processo espontâneo de decaimento, envolvendo emissão de luz.

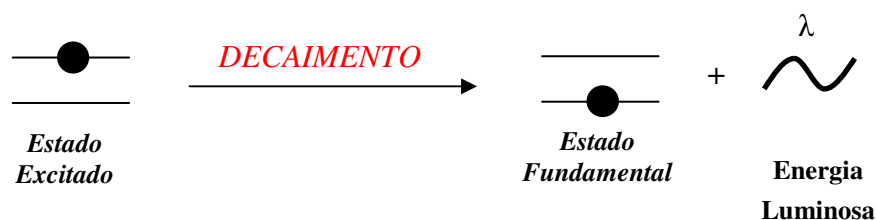
O comprimento de onda da energia radiante emitida está diretamente relacionado com a transição eletrônica ocorrida. Sabendo-se que todos os elementos possuem estrutura eletrônica única e que o comprimento de onda da luz emitida é uma

propriedade individual de cada elemento, sendo considerada uma “impressão digital do elemento”, é possível, então, determinar-se qualitativamente qual é o elemento em questão.<sup>39-42</sup>

### Primeira Etapa

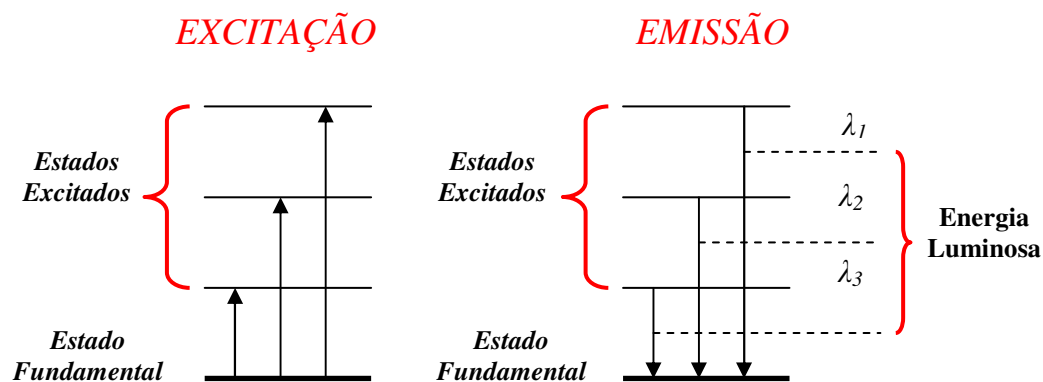


### Segunda Etapa



**Figura 2:** Processos de excitação e decaimento dos elétrons de valência.<sup>43</sup>

Como a configuração do orbital dos átomos pode ser complexa, podem ocorrer algumas transições eletrônicas. Estas transições resultam na emissão de comprimentos de onda característicos da luz, como é ilustrado pela Figura 3.



**Figura 3:** Transições de energia.<sup>43</sup>

A energia absorvida no processo de excitação e a emitida no processo de decaimento são quantificadas com propósitos analíticos. Este processo de excitação/decaimento para o estado fundamental está envolvido nas três linhas de espectroscopia atômica: 1) **Emissão**, na qual a amostra é submetida à alta energia, de natureza térmica, para produzir átomos no estado excitado, capazes de emitir luz. O

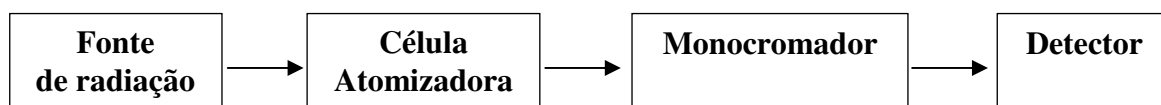
espectro de emissão pode ser utilizado como característica única do elemento para identificação qualitativa e quantitativa; 2) **Fluorescência atômica**, técnica que incorpora fundamentos da absorção atômica e da emissão atômica. Os átomos no estado fundamental são introduzidos na chama e excitados pela radiação que atravessa a nuvem atômica pelo processo de atomização. A quantidade de radiação absorvida durante o processo assemelha-se ao que é observado na absorção atômica, no entanto, a emissão resultante do decaimento de energia dos átomos excitados, é quantificada como observado no processo de emissão atômica; 3) **Absorção Atômica**, esta técnica é uma das formas mais sensíveis para a determinação quantitativa de mais de 60 metais e metalóides. A facilidade, velocidade, exatidão e precisão nas determinações fazem da absorção atômica um dos mais populares métodos para determinação de metais nos mais variados tipos de amostras. A absorção atômica é a mais utilizada entre as três técnicas e oferece inúmeras vantagens sobre as demais, mas dependendo do tipo de amostra e do analito em questão, benefícios particulares podem ser obtidos pelo uso da emissão atômica ou pelo uso da fluorescência atômica.<sup>39-42</sup>

### 1.1.6.3. Absorção Atômica<sup>39-42</sup>

O princípio fundamental da Absorção Atômica é a absorção de luz em um único e exato comprimento de onda por átomos no estado fundamental. Esses átomos podem absorver esta luz e atingir um estado excitado. A quantidade de interesse em determinações por absorção atômica é a quantidade de luz que é absorvida durante a passagem pelo interior da nuvem de átomos. Quando o número de átomos no caminho do feixe de radiação aumenta, a quantidade de radiação absorvida aumenta proporcionalmente. A quantificação da diferença entre a quantidade de luz emitida pela fonte e a quantidade de luz que passou pelo interior da nuvem de átomos corresponde à concentração de átomos do analito na amostra (Lei de Beer).

Os principais componentes da espectrometria de absorção atômica são: 1) **Fonte de radiação**, a qual emitirá radiação em um dado comprimento de onda; 2) **Célula atomizadora**, a qual ocorrerá a absorção de radiação pelos átomos, composta pela câmara nebulizadora e o queimador, quando o método for a Espectrometria de Absorção Atômica por Chama (FAAS), ou um forno de grafite, quando o método for a Espectrometria de absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS) 3) **Monocromador** ou seletor de comprimento de onda, o qual funciona como um filtro de radiação

específica para um dado elemento; 4) **Detector**, o qual a radiação não absorvida pelos átomos chegará. A Figura 4 esquematiza os principais componentes da espectrometria de absorção atômica.



**Figura 4:** Espectrometria de Absorção Atômica.

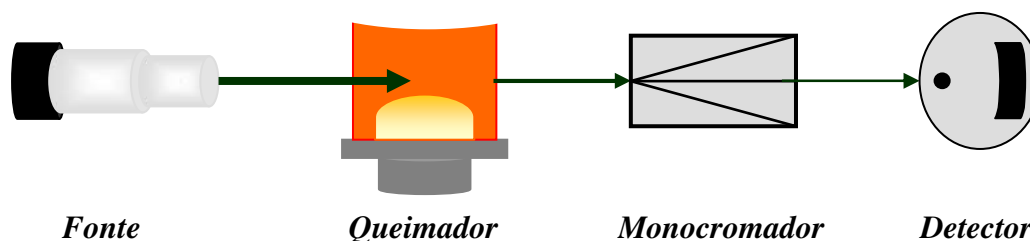
O uso de fontes especiais de radiação em comprimentos de onda cuidadosamente selecionados permite a determinação seletiva de elementos em presença de outros.

A nuvem atômica necessária para as determinações por absorção atômica é produzida por suplemento suficiente de energia térmica, que promove a dissociação dos componentes químicos em átomos livres. Estes átomos livres, em contato com a radiação proveniente da fonte externa, são então promovidos para estados excitados, e esta energia absorvida para promover a mudança é o fator que possibilita a quantificação dos elementos na amostra. Todo o processo de quantificação do analito está diretamente relacionado com a eficiência da etapa de atomização, se esta for eficiente, a maioria dos átomos estará na forma do estado fundamental e serão capazes de absorver a radiação proveniente da fonte.

#### 1.1.6.3.1. Espectrometria de Absorção Atômica por chama – FAAS<sup>39-42</sup>

Na atomização por chama, uma solução da amostra é nebulizada por um fluxo de oxidante gasoso, misturada com um combustível gasoso, e levada à chama onde ocorre a atomização. A maioria dos espectrômetros utiliza um queimador de fluxo laminar, onde o combustível, o oxidante e a amostra são misturados antes de serem introduzidos na chama.

Uma lâmpada de catodo oco, usada como fonte, que emite radiação em um comprimento de onda específico, para o analito de interesse, quando bombardeada com íons neônio ou argônio, com energia elevada, no interior da lâmpada, provoca excitação dos átomos do elemento de interesse e faz com que eles emitam radiação com as mesmas frequências absorvidas pelo analito presente na amostra. Esta radiação passa através da chama, é selecionada pelo monocromador e chega ao detector que mede a quantidade de radiação que passou através da chama. A Figura 5 ilustra o processo de absorção atômica por chama.



**Figura 5:** Espectrometria de Absorção Atômica por chama.<sup>43</sup>

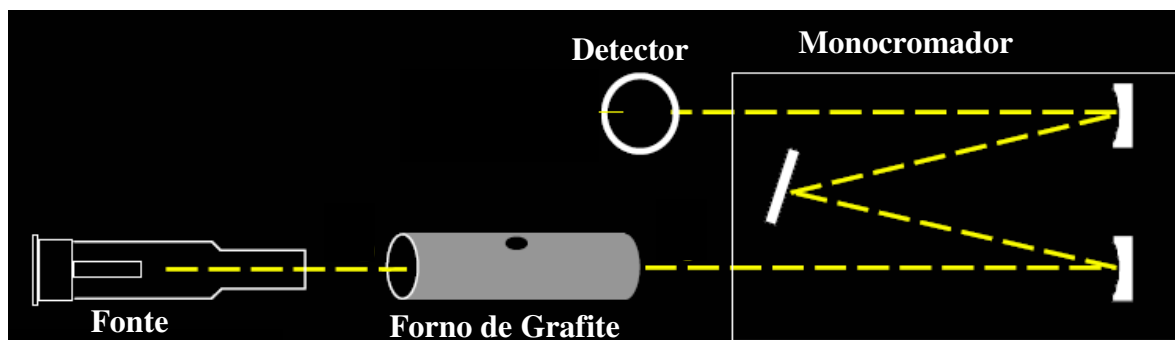
### 1.1.6.3.2. Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite – GFAAS<sup>39-42</sup>

A técnica de espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite, apesar de ser monoelementar, é adequada para a determinação de baixas concentrações de metais e semimetais. A atomização em forno de grafite oferece sensibilidade maior do que a proporcionada pela chama, isso porque a amostra inteira é atomizada em um período curto e o tempo médio de permanência dos átomos no caminho óptico é de um segundo. Além disso, a técnica apresenta boa seletividade, necessita de pequenos volumes de amostra (cerca de 1 a 100  $\mu\text{L}$  de amostra são injetados dentro do forno de grafite através do seu orifício) e possui limites de detecção, para a maioria dos elementos, em concentrações da ordem de  $\text{ng L}^{-1}$  e  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A Figura 6 ilustra um tubo de grafite.



**Figura 6:** Tubo de grafite utilizado em GFAAS.<sup>43</sup>

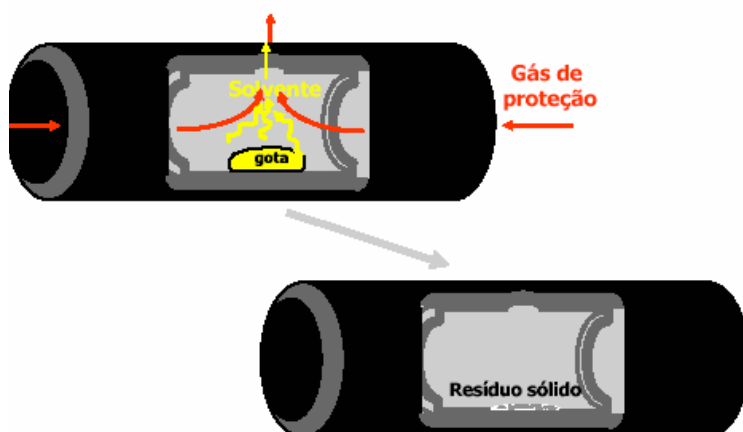
A radiação proveniente da lâmpada de cátodo oco (HCL), usada como fonte, passa através das aberturas existentes em cada uma das extremidades do tubo de grafite. Dentro do tubo de grafite ocorre a atomização do analito de interesse. Em seguida, a radiação chega ao monocromador e logo após, ao sistema detector. A Figura 7 ilustra o processo de absorção atômica em forno de grafite.



**Figura 7:** Espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite.<sup>43</sup>

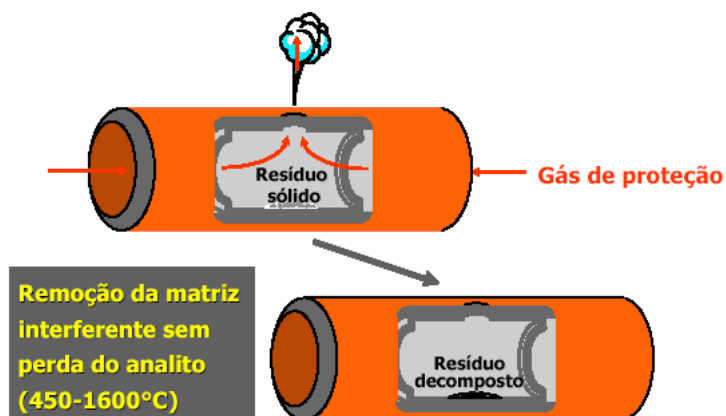
Comparado com a chama, o forno de grafite exige maior habilidade do operador em encontrar condições apropriadas para cada tipo de amostra. Eles são aquecidos em três ou mais etapas para atomizar corretamente a amostra. As etapas de aquecimento no forno de grafite são: **secagem, pirólise, atomização e limpeza.**

Na etapa de secagem, o forno é programado para secar a amostra de modo a remover o solvente, o ácido ou a mistura azeotrópica. Nesta etapa, temperaturas da ordem de 200-250 °C são atingidas (Figura 8).



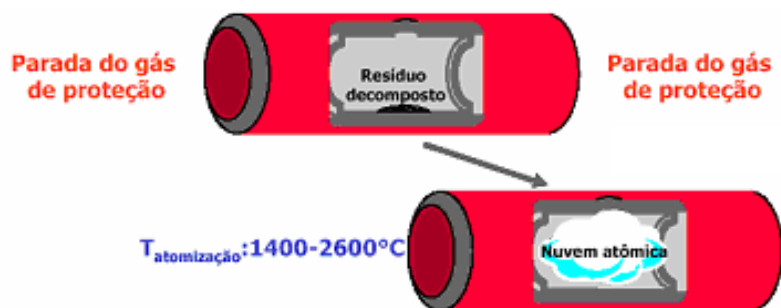
**Figura 8:** Etapa de secagem da amostra no programa de aquecimento para determinação de metais por GFAAS.<sup>43</sup>

Após a etapa de secagem, a matéria orgânica e outros concomitantes da amostras são incinerados em temperaturas da ordem de 450-1600 °C, separando assim o analito (metal, semimetal) dos outros componentes da matriz sólida. Esta etapa do processo é denominada de pirólise (Figura 9).



**Figura 9:** Etapa de pirólise da amostra no programa de aquecimento para determinação de metais por GFAAS.<sup>43</sup>

Após a etapa de pirólise, a corrente elétrica responsável pelo aquecimento do tubo de grafite é aumentada rapidamente até amperagem que eleve a temperatura na ordem de 1400 °C a 2600 °C, provocando formação de uma nuvem atômica dos analitos metálicos. Esta etapa é denominada de atomização (Figura 10) e ocorre em período de milissegundos até segundos. Nesta etapa, a medida de absorção da radiação é feita na região imediatamente acima da superfície do tubo.

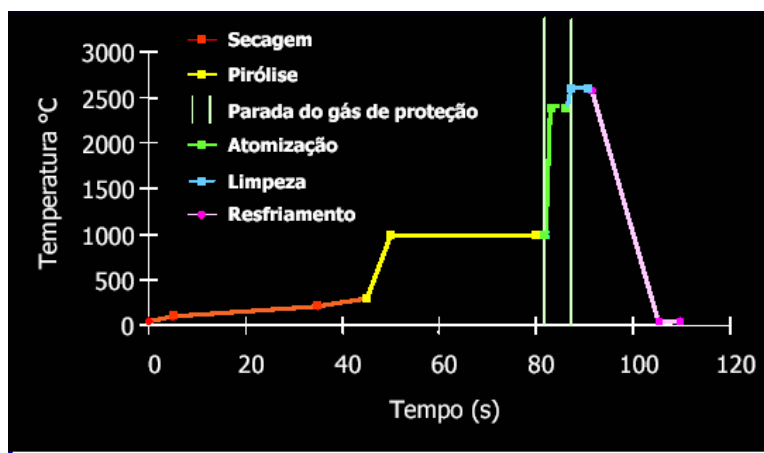


**Figura 10:** Etapa de atomização da amostra no programa de aquecimento para determinação de metais por GFAAS.<sup>43</sup>

Após a medida da absorbância do analito, é feita então uma etapa de limpeza, em temperaturas superiores a 2600 °C, para eliminar qualquer resíduo que tenha permanecido. Em seguida ocorre rápido resfriamento.

As etapas de secagem, pirólise e limpeza são assistidas por uma corrente de argônio (fluxo de  $\cong 1 \text{ L min}^{-1}$ ) para remover os componentes da matriz volatilizados em cada etapa. Durante a etapa de atomização, o fluxo de gás é interrompido para evitar

perdas do analito. As quatro etapas envolvidas no processo de atomização para determinação de um analito por GFAAS estão sumarizadas na Figura 11.



**Figura 11:** Etapas envolvidas no programa de aquecimento para atomização de um analito por GFAAS.<sup>43</sup>

### 1.1.6.3.3. Análises Quantitativas em Absorção Atômica<sup>37-42</sup>

Uma fonte, geralmente uma lâmpada de cátodo oco (HCL), emite radiação em determinado comprimento de onda e com intensidade inicial  $I_0$ . Esta radiação está direcionada para a chama ou para o forno de grafite, que contém os átomos no estado fundamental. A intensidade inicial de radiação ( $I_0$ ) sofre decréscimo devido à absorção de parte desta energia pelos átomos que passaram do estado fundamental para o estado excitado. A radiação que chega até o sistema detector com atenuação da intensidade é denominada  $I$ , e a quantidade de radiação absorvida pelos átomos do analito na nuvem atômica é determinada pela comparação entre os valores de  $I$  e  $I_0$ . A diferença de intensidade entre  $I$  e  $I_0$  corresponde à concentração do analito na amostra, como detalhado a seguir.

Relação entre  $I_0$ ,  $I$  e concentração:

A radiação absorvida para passar determinado átomo de seu estado fundamental para seu estado excitado corresponde a comprimentos de ondas específicos característicos de cada elemento que podem ser determinados pela equação de Planck (Equação 1):

$$\Delta E = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{Equação 1}$$

Onde,  $\Delta E$  é a energia excitação ou a energia necessária para passar um átomo do seu estado fundamental para seu estado excitado;  $h$  é a constante de Planck ( $h = 6,62608 \times 10^{-34}$ );  $c$  é a velocidade da luz ( $c = 2,99792 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$ ); e  $\lambda$  é o comprimento de onda.

A fração de átomos excitados em determinado nível de energia é uma função da temperatura e do comprimento de onda (Tabela 2) e é dada pela distribuição de Boltzmann (Equação 2):

$$\frac{N^*}{N_0} = \frac{g^* e^{-\Delta E/KT}}{g_0} \quad \text{Equação 2}$$

Sendo,  $N^*$  o número átomos no estado excitado e  $N_0$  o número de átomos no estado fundamental;  $g^*$  e  $g_0$  o peso estatístico no estado excitado e fundamental, respectivamente;  $\Delta E$  a energia específica da excitação;  $K$  é a constante de Boltzmann ( $k=1,38066 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$ ); e  $T$  é a temperatura absoluta.

**Tabela 2:** Razão  $N^*/N_0$  e a dependência com a Temperatura e o comprimento de onda.

Elemento	Energia de Excitação (eV)	$\lambda$ (nm)	$g^*/g_0$	$N^*/N_0$		
				2000 K	3000 K	4000 K
Zn	5,80	213,9	3	$7,29 \cdot 10^{-15}$	$5,58 \cdot 10^{-10}$	$1,48 \cdot 10^{-7}$
Cu	2,93	422,7	3	$1,21 \cdot 10^{-7}$	$3,69 \cdot 10^{-5}$	$6,03 \cdot 10^{-4}$
Na	2,11	589,0	2	$0,86 \cdot 10^{-4}$	$5,88 \cdot 10^{-4}$	$4,44 \cdot 10^{-3}$
Cs	1,46	852,1	2	$4,44 \cdot 10^{-4}$	$7,24 \cdot 10^{-3}$	$2,98 \cdot 10^{-2}$

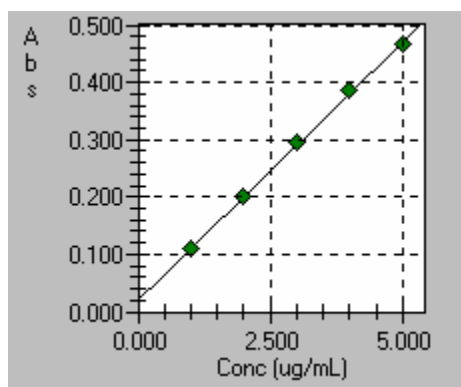
Com isso, chega-se à lei de Lambert-Beer, relacionando a absorvância ( $A$ ) ou densidade óptica com o número de átomos no estado fundamental ( $N$ ) (Equação 3).

$$A = \log \frac{\Phi_0(\lambda)}{\Phi_{tr}(\lambda)} = 0,43 N k(\lambda) \quad \text{Equação 3}$$

Onde,  $\Phi_0(\lambda)$  é a potência radiante emitida em  $\lambda$  ( $I_0$ );  $\Phi_{tr}(\lambda)$  é a potência radiante transmitida em  $\lambda$  ( $I$ );  $N$  é o número de átomos livres na camada absorvedora;  $l$  é o comprimento da camada absorvedora; e  $k(\lambda)$  é o coeficiente de absorção atômica espectral.

Esta equação representa, simplificada, que a concentração é diretamente proporcional à concentração dos átomos que absorvem dentro dos parâmetros pré-estabelecidos de análise.

A proporção direta entre concentração e absorvância é claramente evidenciada quando soluções com concentrações conhecidas são utilizadas na construção das curvas analíticas. Quando a absorvância é “plotada” em função da concentração, uma relação de linearidade é observada para certos intervalos de concentração (Figura 12). Dentro destas regiões onde a Lei de Beer é mantida, o crescimento da absorvância é diretamente proporcional ao crescimento da concentração.



**Figura 12:** Curva analítica para um íon metálico qualquer.<sup>43</sup>

Quando a concentração e a absorvância aumentam, observa-se comportamento não ideal no processo de absorção em função da concentração, o que acarreta desvios da linearidade (não representado na Figura 12).

O comportamento linear apresentado entre concentração e absorvância em determinados intervalos de concentração é a base para a construção das “curvas de calibração” ou “curvas analíticas”. Com o uso das curvas de calibração é possível determinar a concentração dos analitos nas amostras por interpolação dos valores obtidos nestas curvas.

#### **1.1.6.3.4. Determinação de nutrientes metálicos por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite**

A determinação de nutrientes metálicos em amostras biológicas (vegetais, sangue, fezes de animais, alimentos, etc.) por GFAAS proporciona diversas vantagens. Dentre elas, pode-se citar a alta sensibilidade da técnica, com limites de detecção em níveis de  $\text{ng kg}^{-1}$ , utilização de pequenos volumes de amostra, determinação de ampla variedade de traços de elementos e considerando-se que o atomizador pode agir como reator químico, tem-se a possibilidade de amostragem sólida, o que elimina a etapa de

decomposição prévia total da amostra, diminuindo a quantidade de resíduos gerados para o ambiente.<sup>44</sup>

A amostragem de sólidos na forma de suspensão apresenta vantagens sobre os procedimentos de digestão convencionais, como redução no tempo de preparo da amostra, diminuição nas perdas do analito, por manipulação excessiva ou retenção sobre produtos insolúveis, redução da possibilidade de contaminação da amostra e principalmente a minimização da ação de ácidos perigosos ao analista.<sup>45-48</sup>

A pré-concentração da amostra por evaporação do solvente, utilizando-se a queima da matriz em mufla a 600 °C, é uma das formas utilizadas para aumentar a sensibilidade da técnica de quantificação do analito, quando fatores de pré-concentração de 10 a 40 podem ser obtidos. Este procedimento de pré-concentração é utilizado principalmente na determinação de elementos traço em amostras de sangue.<sup>49</sup>

Quando se trabalha com amostragem de sólidos na forma de suspensão, a homogeneidade da suspensão, a utilização de agentes protetores e antiaglutinantes, o tamanho das partículas, a utilização de modificadores químicos e de corretor de fundo adequados, são os principais fatores para se conseguir uma boa exatidão e precisão nas medidas analíticas.<sup>50</sup>

#### **1.1.6.3.5. Outras aplicações da técnica de espectrometria de absorção atômica em forno de grafite**

A determinação de elementos voláteis em amostras de solos e sedimentos tem sido feita utilizando-se suspensões dessas matrizes. Suspensões da ordem de 0,5 a 3% (m/v) em ácido fluorídrico (HF), com injeção de 1% (m/v) de níquel (Ni) como modificador químico, possibilita a determinação de selênio (Se) nessas amostras, eliminando-se assim a etapa de extração/digestão manual que envolve a utilização de reagentes perigosos.<sup>51</sup>

Determinações de chumbo, selênio e cádmio em suspensões de alimentos para bebês por GFAAS, podem ser feitas em meio de Triton X-100 0,1% (m/v), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (v/v) e HNO<sub>3</sub> 1% (v/v). Os modificadores de matriz mais eficientes neste método são: Ni 0,5% (m/v) para selênio, Ni + NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1% (m/v) para cádmio e NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1% (m/v) para chumbo. A calibração do equipamento pode ser feita utilizando-se padrões aquosos para selênio e chumbo, para cádmio deve-se utilizar o método da adição de analito.<sup>52</sup>

Nas últimas décadas diversos trabalhos têm destacado a importância da utilização de modificadores químicos adequados nas determinações de metais traços por GFAAS, tanto em amostras líquidas quanto em suspensão.<sup>53-64</sup> O uso do modificador nessas determinações, visa obter uma temperatura de pirólise o mais elevada possível ao analito, para garantir a remoção da matriz com eficiência. De maneira geral, temperaturas a partir de 1000 °C têm se mostrado suficientes para a pirólise total da matriz.

Modificadores químicos como níquel e paládio estão entre os mais utilizados em determinações de elementos traços por GFAAS. A mistura desses modificadores estabiliza elementos voláteis, como o selênio, permitindo a utilização de temperaturas de pirólise da ordem de 1000 °C, garantindo assim a eliminação quase que total dos componentes da matriz.<sup>53</sup>

A utilização de níquel e cobre e a mistura de cobre com nitratos de ferro e magnésio tem se mostrado eficiente na estabilização de diferentes espécies químicas de selênio para posterior determinação desse analito por GFAAS. A mistura de cobre com nitrato de magnésio apresenta-se como melhor modificador, quando comparado ao níquel. Essa mistura de modificadores proporciona melhor sensibilidade e estabilização do selênio em seus três estados de oxidação até 1100 °C.<sup>54</sup>

O paládio, quando misturado com nitrato de magnésio, proporciona a estabilidade térmica de cerca de 21 elementos a altas temperaturas, eliminando a maior parte dos componentes de várias matrizes. Essa mistura é considerada como modificador químico universal.<sup>55</sup> Essa mistura de modificadores, destaca-se principalmente na determinação de elementos voláteis, como arsênio e selênio, presentes na forma de traços em amostras de água mineralizadas, utilizadas na medicina. O uso desses modificadores elimina principalmente a alta absorção de fundo, causada pela grande concentração de sódio presente nessas amostras e a contaminação do tubo de grafite devido à alta concentração de íons sulfato.<sup>56</sup>

A mistura de cloreto paládio com cloreto de cádmio permite a determinação de elementos voláteis como selênio, em amostras de aerodispersóides (Ex. fuligem de carvão) por GFAAS. Essa mistura de modificadores permite a remoção dos concomitantes da matriz e elimina a interferência do ferro, elemento comum presente nesse tipo de amostra.<sup>57</sup>

A utilização de compostos orgânicos como modificadores químicos, como a glicose, tem sido proposta para determinação de antimônio e selênio em suspensões de

amostras biológicas por GFAAS. Misturas da amostra com a glicose nas proporções 0,001% (m/v) e 2% (m/v) permitem a estabilização térmica do selênio e antimônio até 1300 °C. A interferência espectral causada pela presença de fosfato, principalmente em relação ao selênio, é bastante minimizada.<sup>58</sup> Outra mistura alternativa de modificadores utilizada na determinação de selênio, é a de platina com níquel. O uso desse modificador na determinação direta de selênio em amostras de sucos de frutas silvestres por GFAAS, permite a eliminação de interferências espectrais causadas principalmente por potássio, fosfato e cálcio.<sup>59</sup>

Um método alternativo para determinação direta de elementos voláteis em amostras biológicas por GFAAS, consiste na diluição da amostra em solução a 10% de aminas terciárias e a adição de nitrato de paládio como modificador químico. Nessas condições, consegue-se diminuir o tempo de análise, consumo de reagentes e o risco de contaminação, além disso, a sensibilidade aumenta significativamente, principalmente para elementos como o selênio.<sup>60</sup>

De maneira geral, a utilização de paládio como modificador de matriz, mais especificamente de nitrato de paládio, tem se mostrado mais eficiente. Mesmo em determinações de suspensões de amostras biológicas, esse modificador proporciona a quantificação de diversos elementos, principalmente os voláteis como selênio, arsênio e antimônio. Pode ainda melhorar a estabilidade térmica, perfil do sinal transiente, exatidão e precisão do método, além é claro de proporcionar aumento significativo da sensibilidade.<sup>61-63</sup> A capacidade do paládio em estabilizar elementos, como o selênio, em elevadas temperaturas de pirólise, está relacionada à formação de um composto intermetálico, que mantém o elemento estável termicamente em temperaturas superiores a 900 °C.<sup>64</sup>

#### **1.1.6.4. Fluorescência de raios-X com radiação síncrotron (SR-XRF)**

A fluorescência de raios-X é um dos métodos analíticos mais utilizados na identificação qualitativa de elementos com número atômico maior que o oxigênio, podendo ser empregada em análise elementar semi-quantitativa ou quantitativa. Uma das vantagens dessa técnica, comparada às outras técnicas de análise elementar, é seu caráter não destrutivo da amostra.<sup>37,65,66</sup> Este método permite a resolução espectral total da amostra, ou seja, a presença de todos os elementos traços a partir de uma determinada energia de irradiação.<sup>67</sup> A irradiação da amostra é feita com feixe de

raios-X de um tubo de raios-X ou fonte radioativa. Com isso, os elementos na amostra são excitados pela absorção do feixe primário de raios-X e, em seguida, emitem suas linhas características de fluorescência.<sup>37</sup>

A fluorescência de raios-X com fonte de radiação síncrotron tem sido utilizada quando são necessárias maiores sensibilidade e resolução para a identificação dos elementos em uma amostra. Esta fonte apresenta alta intensidade ( $10^3$  a  $10^6$  mais intensa que as fontes convencionais) com isso é possível obter limites de detecção (LOD) da ordem de  $\text{ng g}^{-1}$ .<sup>4</sup>

A técnica de SR-XRF tem sido aplicada na identificação de metais ligados a diversas matrizes biológicas. Dentre as matrizes destaca-se a determinação de: Elementos traço em cabelo humano;<sup>67</sup> Cobre, mercúrio e zinco em rim de ratos;<sup>68</sup> Selênio em cérebro de ratos;<sup>69</sup> Em proteínas separadas por eletroforese a identificação de metais já foi realizada para: Ferro, cobre e zinco em metaloproteínas de citosol de fígado humano, separadas por SDS-PAGE;<sup>13</sup> Ferro, cobre e zinco em metaloproteínas de carcinoma hepatocelular humano, separadas por IEF;<sup>70,71</sup> Selênio em proteínas de testículos de ratos, separadas por SDS-PAGE;<sup>72,73</sup> Cálcio, cobre, ferro, potássio e zinco em proteínas de calos embriogênicos de *Citrus*;<sup>74</sup> Potássio, cálcio, crômio, manganês, ferro, cobalto, níquel e zinco em metaloproteínas de folhas de girassol separadas por SDS-PAGE;<sup>75</sup> Cálcio, cobre, potássio, magnésio, manganês e zinco em proteínas de sementes de soja transgênica e não transgênica separadas por SDS-PAGE;<sup>76</sup> e crômio, ferro e manganês em proteínas de castanha da Índia, previamente separadas por SDS-PAGE.<sup>77</sup>

Com base no exposto o presente trabalho teve como objetivo investigar a presença de selênio em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por eletroforese em gel e espectrometria atômica. Assim, o trabalho apresenta-se dividido em duas pesquisas (Capítulos II e III).

O capítulo II, intitulado “**Selênio em spots protéicos de plasma e tecidos muscular e hepático de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por SR-XRF após separação por 2D-PAGE**” apresenta-se de acordo com as normas da revista *Talanta*. Este trabalho teve como objetivo mapear o selênio nos spots de proteínas de plasma, tecidos muscular e hepático, utilizando a eletroforese em gel de poliacrilamida em segunda dimensão (2D-PAGE), para separação das proteínas, e a fluorescência de raios-X com radiação síncrotron (SR-XRF), para o mapeamento do selênio.

O capítulo III, intitulado “**Determinação de selênio em amostras de tecidos muscular e hepático de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por GFAAS utilizando extração por ultra-som**” apresenta-se de acordo com as normas da revista *Journal of Hazardous Materials*. Este trabalho teve como objetivo a determinação de selênio em amostras de tecidos muscular e hepático, por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) utilizando ultra-som no processo de extração do analito.

## 2. REFERÊNCIAS

1. GONÇALVES, S.G.; PEZZATO, L.D.; PADILHA, P.M.; BARROS, M.M. Disponibilidade aparente do fósforo em alimentos vegetais e suplementação da enzima fitase para tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p.1473-1480, 2007.
2. SA, M.V.C.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; PADILHA, P.M. Relative bioavailability of zinc in supplemental inorganic and organic sources for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Nutrition**, v.11, p.273-281, 2005.
3. ANDERSON, L.; DEBBLE, M.V.; TURKKI, P.R.; MITCHELL, H.S.; RYNBERGEN, H.J. **Nutrição**. 17ª ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1988. 737p.
4. GARCIA, J.S.; MAGALHÃES, C.S.; ARRUDA, M.A.Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. **Talanta**, v.69, p.1-15, 2006.
5. SZPUNAR, J. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.378, p.54-56, 2004.
6. HARAGUCHI, H. Metallomics as integrated biometal science. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v.19, p.5-14, 2004.
7. JAKUBOWSKI, N.; LOBINSKI, R.; MOENS, L. Metallobiomolecules. The basis of life, the challenge of atomic spectroscopy. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.19, p.1-4, 2004.
8. CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. **Bioquímica Ilustrada**. 3ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2006. 544p.
9. LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**. 4ª ed., São Paulo: Sarvier, 2006. 1202p.
10. ROMANOWSKI, S.M.M.; MANGRICH, A.S.; NEVES, A. Síntese e caracterização de novos compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes não-simétricos N,O-

doadores: contribuições para o sítio ativo da galactose oxidase. **Química Nova**, v.24, p.592-598, 2001.

11. VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentals of biochemistry**. Upgrade Edition, John Wiley & Sons, Inc., 2002. 931p.

12. FENTON, D.E. **Biocoordination Chemistry**. New York: Oxford Chemistry Primers, 1995. 96p.

13. GAO, Y.; CHEN, C.; ZHANG, P.; CHAI, Z.; HE, W.; HUANG, Y. Detection of metalloproteins in human liver cytosol by synchrotron radiation X-ray fluorescence after sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v.485, p.131-137, 2003.

14. VALLEE, B.L. Metallothionein historical review and perspectives. In: J.H.R. Kagi, M. Nordberg (Eds.). **Metallothionein**. Birkhauser, Switzerland, 1979. p.19–40.

15. KAGI, J.H.R.; SCHAFFER, A. Biochemistry of metallothionein. **Biochemistry**, v.27, p.8509–8515, 1988.

16. STILLMAN, M.J.; SHAW, C.F.; SUZUKI, K.T. Metallothioneins. In: M.J. Stillman, C.F. Shaw, K.T. Suzuki (Eds.). **Metallothioneins**. New York: VCH Publishers, 1992. p.1–13.

17. ARNESANO F.; BANCI, L.; BERTINI, I.; CAPOZZI, F.; CIOFI-BAFFONI, S.; CIURLI, S.; LUCHINAT, C.; MANGANI, S.; ROSATO, A.; TURANO, P.; VIEZZOLI, M.S. An Italian contribution to structural genomics: Understanding metalloproteins. **Coordination Chemistry Reviews**. v.250, p.1419-1450, 2006.

18. GOMEZ-ARIZA, J.L.; GARCIA-BARRERA, T.; LORENZO, F.; BERNAL, V.; VILLEGAS, M.J.; OLIVEIRA, V. Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems. **Analytica Chimica Acta**, v.524, p.15-22, 2004.

19. BEHNE, D.; KYRIAKOPOULOS, A. Mammalian selenium-containing proteins. **Annual Review of Nutrition**, v.21, p.453-473, 2001.

20. WATANABE, T.; KIRON, V.; SATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. **Aquaculture**, v.151, p.185-207, 1997.

21. KYRIAKOPOULOS, A.; BERTELSMANN, H.; GRAEBERT, A.; HOPPE, B.; KUHBAKER, M.; BEHNE, D. Distribution of an 18 kDa-selenoprotein in several tissues of the rat. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.16, p.57-62, 2002.

22. LOVELL, R.T. **Nutrition and feeding of fish**. 2.ed. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, 1998, 267p.
23. NRC - National Research Council. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7.ed. Washington: National Academy Press, 2001, 408p.
24. COMBS, G.F.; LIU, C.H.; LU, Z.H.; SU, Q. Uncomplicated selenium deficiency produced in chicks fed a corn-soy-based diet. **Journal of Nutrition**, v.114, p.964-976, 1984.
25. ELODIE, F.; CHRISTELLE, A.; JEAN-CHARLES, M.; GARNIER-LAPLACE, J. Bioaccumulation of waterborne selenium in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: influence of feeding-induced ventilatory activity and selenium species. **Aquatic Toxicology**, v.72, n.3, p.251-260, 2005.
26. AMWEG, E.L.; STUART, D.L.; WESTON, D.P. Comparative bioavailability of selenium to aquatic organisms after biological treatment of agricultural drainage water. **Aquatic Toxicology**, v.63, n.1, p.13-25, 2003.
27. NAOUM, P.C. **Eletroforese**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1990. 174p.
28. MELVIN, M. **Electrophoresis**. Chichester: John Wiley & Sons, 1987. 130p.
29. RICHARDSON, B.; BAVERSTOCK, P.; ADANS, M. **Allozyme Electrophoresis**. England-Sheffield Academic Press Ltd., 1998, p.155-157.
30. PARE, J.R.J.; BELANGER, J.M.R. **Instrumental Methods in Food Analysis**. Copyright Elsevier B.V., 1997.
31. SILVA JUNIOR, J.G. **Eletroforese de proteínas: guia teórico-prático**. Rio de Janeiro: Interciência, 2001, 125p.
32. LANÇAS, F.M.; SILVA, J.C.R.; BICUDO, R.C.; NETO, M.B. A química analítica do proteoma. **Analytica**, v.6, p.60-67, 2003.
33. HAMES, B.D.; RICKWOOD, D. **Gel Electrophoresis of proteins: A practical approach**. 2<sup>a</sup> ed., New York: IRL Press, 1990. 383p.
34. GARCIA, J.S. **Avaliação do desenvolvimento de girassol por meio de análise de proteínas e metaloproteínas**. 2006, 150p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de Campinas, Campinas/SP.
35. GORG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; HARDER, A.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v.21, p.1037-1053. 2000.

36. KRUG, F.J.; NOBREGA, J.A.; OLIVEIRA, P.V. Espectrometria de Absorção Atômica Parte 1. Fundamentos e atomização com chama. CENA-USP, p.1-39, 2004. Disponível em:<<http://web.cena.usp.br/apostilas/krug/AAS%20geral%20parte%201%20Orevisada.pdf>>. Acesso em 08-07-2009.
37. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.
38. HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 6ª ed., Rio de Janeiro: LTC, 2005. 876p.
39. RICHARD, D.B.; JACK, D.K. **Concepts, instrumentation and techniques in atomic absorption spectrometry**. The Perkin Elmer Corporation, Norwalk, USA, 1993.
40. VOLYNSKY, A.B. Terminology for the modification of graphite tubes with high-melting carbides used in electrothermal atomic absorption spectrometry, **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.50, p.1417-1419, 1995.
41. VOLYNSKY, A.B.; SEDYKH, E.M. Principal processes in graphite atomizers modified by high-melting carbides. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.4, p.71-76, 1989.
42. DEAN, J.R. **Atomic Absorption and Plasma Spectroscopy**. 2<sup>nd</sup> ed. Chichester: John Wiley & Sons, 1997. 206p.
43. SILVA, F.A. **Avaliação da biodisponibilidade aparente de selênio pela tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*) utilizando-se espectrometria de absorção atômica em forno de grafite**. 2006, 80p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
44. MILLER-IHLI, N.I. Advances in ultrasonic slurry graphite furnace absorption atomic spectrometry. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v.345, p.482-489, 1993.
45. BENDICHO, C.; LOOS-VOLLEBREGT, M.T.C. Solid sampling in electrothermal atomic absorption using commercial atomizers. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.6, p.353-374, 1991.
46. LIANG, Y.Z.; LI, M.; RAO, Z. Nickel and strontium nitrates as modifier for determination of selenium in urine by zeeman platform graphite-furnace atomic absorption spectrometry. **Analytical Science**, v.12, p.629-633, 1996.
47. SILVA, F.A.; NEVES, R.C.F.; QUINTERO-PINTO, L.G.; PADILHA, C.C.F.; JORGE, S.M.A.; BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E.; PADILHA, P.M. Determination

of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the bioavailability of this micronutrient in feed used in pisciculture. **Chemosphere**, v.68, p.1542-1547, 2007.

48. NEVES, R.C.F.; MORAES, P.M.; SALEH, M.A.D.; LOUREIRO, V.R.; SILVA, F.A.; BARROS, M.M.; PADILHA, C.C.F.; JORGE, S.M.A.; PADILHA, P.M. FAAS determination of metal nutrients in fish feed after ultrasound extraction. *Food Chemistry*, v.113, p.679-683, 2009.

49. MINAMI, H.; INOUE, Y.; SAKATA, K.; ATSUIA, I. Determination of traces levels of selenium in biological samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry with a solid sampling technique. Application of pre-ashing concentration technique. **Analytical Science**, v.13, p.397-402, 1997.

50. CHEM W.K.; YEN, C.C.; WEI, B.L.; HU, C.C.; YU, J.J.; CHUNG, C.; KUO, S.C. Direct determination of selenium in serum by electrothermal atomic absorption spectrometry using automated ultrasonic slurry sampling. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.53, p.131-138, 1998.

51. LOPES-GARCIA, I.; SANCHES-MERLOS, M.; HERNANDES-CÓRDOBA, M. Rapid determination of selenium in soil and sediments using slurry sampling-electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.11, p.1003-1006, 1996.

52. VINAS, P.; PARDO-MARTÍNEZ, M.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Rapid determination of selenium, lead and cadmium in baby food samples using electrothermal atomic absorption spectrometry and slurry atomization. **Analytica Chimica Acta**, v.412, p.121-128, 2000.

53. GRAMMELGAARD, B.; JONS, O. Comparison of palladium chemical modifiers for determination of selenium in plasma by zeeman-effect background corrected electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.12, p.465-470, 1997.

54. WELZ, B.; SCHLEMMER, G.; VOELLKOPE, U. Influence of the valence state on the determination of selenium in graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.39, p.501-510, 1984.

55. WELZ, B.; SCHLEMMER, G.; MUDAKAVI, J.R. Palladium nitrate - magnesium nitrate modifier for electrothermal atomic absorption spectrometry .5. Performance for the determination of 21 elements. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.7, p.1257-1271, 1992.

56. FISCHER, J.L.; RADEMEYER, C.J. Kinetics selenium atomization in electrothermal atomization atomic absorption spectrometry (ETA-AAS) Part 2: selenium with palladium modifiers. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.53, p.549-567, 1998.
57. ALLER, A.J. Atomization characteristics of selenium from graphite tube in the presence of calcium and chemical modifier. **Analytical Science**, v.13, p.183-194, 1997.
58. GARCIA-OLALLA, C.; ROBLES, L.C.; ALEMANY, M.T.; ALLER, A.J. Determination of selenium in coal fly ashes by graphite atomic absorption spectrometry using a cadmium-palladium chemical modifier. **Analytica Chimica Acta**, v.247, p.19-25, 1991.
59. LIU, Y.; GONG, B.; LI, Z.; XU, Y.; LIN, T. Direct determination of selenium in a wild fruit juice by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v.43, p.985-989, 1996.
60. BOZSAI, G. Determination of arsenic, cadmium, lead, and selenium in highly mineralized waters by graphite-furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v.37, p.545-549, 1990.
61. ALEIXO, P.C.; NOBREGA, J.A.; SANTOS JR., D.; MULLER, R.C.S. Determinação de selênio em água de coco e em leite de coco utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite. **Química Nova**, v.23, p. 310-312, 2000.
62. PEREZ-CORONA, M.T.; DELACALLEGUNTINAS, M.B.; MADRID, Y.; CAMARA, C. Glucose as a chemical modifier for the determination of antimony and selenium by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.10, p.321-324, 1995.
63. STYRIS, D.L.; PRELL, L.J.; REDFIELD, D.A.; HOLCOMBE, J.A.; BASS, D.A.; MAJIDI, V. Mechanisms of selenium vaporization with palladium using electrothermal atomization and mass-spectrometric detection. **Analytical Chemistry**, v.63, p.508-517, 1991.
64. QUIAO, H.; JAKSON, K.W. Modification by palladium in the analysis of slurries by graphite furnace atomic absorption spectrometry: a physical mechanism. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.47, p.1267-1276, 1992.
65. ASCONE, I.; MEYER-KLAUCKE, W.; MURPHY, L. Experimental aspects of biological X-Ray absorption spectroscopy. **Journal of Synchrotron Radiation**, v.10, p.16-22, 2003.

66. NATOLI, C.R.; BENFATTO, M.; LONGA, S.D.; HATADA, K. X-Ray absorption spectroscopy: state-of-the-art analysis. **Journal of Synchrotron Radiation**, v.10, p.26-42, 2003.
67. TRUNOVA, V.; PARSHINAB, N.; KONDRATYEV, V. Determination of the distribution of trace elements in human hair as a function of the position on the head by SRXRF and TXRF. **Journal of Synchrotron Radiation**, v.10, p.371-375, 2003.
68. TAKEDA, S.H.; KUMAGAI, Y.; SHINYASHIKI, M.; SHIMOJO, N. Application of synchrotron radiation X-ray fluorescence imaging combined with histochemical staining to the renal section of mercury-treated rats. **Journal of Synchrotron Radiation**, v.5, p.57-59, 1998.
69. SCHULMANN-CHORON, N.; CHEVALLIER, P.; CEAURRIZ, J.; SOULEAU, C. Determination of selenium in rat brain by synchrotron radiation X-ray fluorescence. **Analisis**, 2000, 28, 316-323.
70. GAO, Y.; CHEN, C.; CHAI, Z.; ZHAO, J.; LIU, J.; ZHANG, P.; HEB, W.; HUANG, Y. Detection of metalloproteins in human liver cytosol by synchrotron radiation X-ray fluorescence combined with gel filtration chromatography and isoelectric focusing separation. **The Analyst**, v.127, 1700–1704, 2002.
71. GAO, Y.; LIU, Y.; CHEN, C.; LI, B.; HE, W.; HUANG, Y.; CHAI, Z. Combination of synchrotron radiation X-ray fluorescence with isoelectric focusing for study of metalloprotein distribution in cytosol of hepatocellular carcinoma and surrounding normal tissues. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.20, p.473-475, 2005.
72. KÜHBACHER, M.; WESELOH, G.; THOMZIG, A.; BERTELSMANN, H.; FALKENBERG, G.; RADTKE, M.; RIESEMEIER, H.; KYRIAKOPOULOS, A.; BEEKES, M.; BEHNE, D. Analysis and localization of metal- and metalloid-containing proteins by synchrotron radiation X-ray fluorescence spectrometry. **X-Ray Spectrometry**, v.34, p.112-117, 2005.
73. WESELOH, G.; KÜHBACHER, M.; BERTELSMANN, H.; ÖZASLAN, M.; KYRIAKOPOULOS, A.; KNÖCHEL, A.; BEHNE, D. Analysis of metal-containing proteins by gel electrophoresis and synchrotron radiation X-ray fluorescence. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v.259, p.473-477, 2004.
74. VERBI, F.M.; ARRUDA, S.C.C.; RODRÍGUEZ, A.P.M.; PÉREZ, C.A.; ARRUDA, M.A.Z. Metal-binding proteins scanning and determination by combining

gel electrophoresis, synchrotron radiation X-ray fluorescence and atomic spectrometry.

**Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.62, p.97-109, 2005.

75. GARCIA, J.S.; SILVA, G.A.; ARRUDA, M.A.Z.; POPPI, R.J. Application of Kohonen neural network to exploratory analyses of synchrotron radiation x-ray fluorescence measurements of sunflower metalloproteins. **X-Ray Spectrometry**, v.36, p.122-129, 2007.

76. SUSSULINI, A.; GARCIA, J.S.; MESKO, M.F.; MORAES, D.P.; FLORES, E.M.M.; PÉREZ, C.A.; ARRUDA, M.A.Z. Evaluation of soybean seed protein extraction focusing on metalloprotein analysis. **Microchimica Acta**, v.158, p.173-180, 2007.

77. MAGALHÃES, C.S.; ARRUDA, M.A.Z. Sample preparation for metalloprotein analysis: A case study using horse chestnuts. **Talanta**, v.71, p.1958-1963, 2007.

## ANEXO I

### Lista de Abreviaturas

**1D-PAGE:** Eletroforese em gel de poliacrilamida em uma dimensão, do inglês, “*one-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis*”

**2D-PAGE:** Eletroforese em gel de poliacrilamida em duas dimensões, do inglês, “*two-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis*”

**AAS:** Espectrometria de Absorção Atômica, do inglês, “*Atomic Absorption Spectrometry*”

**Da:** Dalton

**FAAS:** Espectrometria de Absorção Atômica com Chama, do inglês, “*Flame Atomic Absorption Spectrometry*”

**GFAAS:** Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite, do inglês, “*Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*”

**HCL:** Lâmpada de catodo oco, do inglês, “*Hollow Cathode Lamp*”

**ICP:** Plasma acoplado Indutivamente, do inglês, “*Inductively Coupled Plasma*”

**ICP-MS:** Espectrometria de Massas com fonte de Plasma acoplado Indutivamente, do inglês, “*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*”

**IEF:** Focalização Isoelétrica, do inglês, “*Isoelectric Focusing*”

**PAGE:** Eletroforese em gel de poliacrilamida, do inglês, “*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*”

**pI:** Ponto Isoelétrico

**SDS:** Dodecil sulfato de sódio, do inglês, “*sodium dodecyl sulphate*”

**SDS-PAGE:** Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, do inglês, “*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*”

**SR-XRF:** Fluorescência de raios-X com Radiação Síncrotron, do inglês, “*Synchrotron Radiation X-ray Fluorescence Spectrometry*”

**XRF:** Fluorescência de raios-X com radiação síncrotron, do inglês, “*X-ray Fluorescence Spectrometry*”

# ***CAPÍTULO II***

## **Avaliação de Selênio em spots protéicos de plasma e tecidos muscular e hepático de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por SR-XRF após separação por 2D-PAGE**

### **Resumo**

O presente trabalho teve como objetivo investigar a presença de selênio em spots protéicos de amostras de plasma, músculo e fígado de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) obtidos após separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida em segunda dimensão (2D-PAGE) e posterior avaliação qualitativa por fluorescência de raios-X com radiação síncrotron (SR-XRF). A análise dos espectros de fluorescência obtidos indicaram a presença de selênio em oito proteínas do plasma, seis proteínas do músculo e cinco proteínas do fígado. Observou-se que o selênio está distribuído em sua maioria em proteínas com massa molar menor que 50 kDa. Proteínas acima de 50 kDa foram encontradas somente no plasma.

Palavras-chave: Metaloproteínas, selênio, eletroforese em segunda dimensão, fluorescência de raios-X com radiação síncrotron.

**Evaluation of selenium in protein spots in plasma and muscle and liver tissue of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using SR-XRF after 2D-PAGE separation**

**Abstract**

An investigation was made into selenium in protein spots of samples of plasma, muscle and liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) obtained after protein separation by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) and subsequent qualitative evaluation by synchrotron radiation X-ray fluorescence (SR-XRF). An analysis of the fluorescence spectra indicated the presence of selenium in eight plasma proteins, six muscle proteins, and five liver proteins. Selenium was found to be distributed mainly in proteins with a molar mass smaller than 50 kDa. Proteins with a molar mass higher than 50 kDa was found only in the plasma.

Keywords: Metalloproteins, selenium, two-dimensional electrophoresis, synchrotron radiation X-ray fluorescence spectrometry

## 1. Introdução

As metaloproteínas e os íons metálicos ligados às proteínas representam uma grande porção do número total de proteínas. Estima-se que aproximadamente 40% de todas as proteínas necessitam de um íon metálico para uma atividade biológica [1]. As metaloproteínas são consideradas diferentes das proteínas ligadas a metais. As metaloproteínas constituem um grupo de proteínas que contêm um cofator metálico incorporado por meio de ligações específicas, caracterizando-se pela alta afinidade da interação metal-proteína. Já as proteínas ligadas a metais constituem um grupo de proteínas onde os íons metálicos são incorporados por ligações não-específicas, caracterizando-se pela baixa afinidade da ligação metal-proteína, com isso, essa ligação é facilmente quebrada [2,3]. Fracamente ligados as proteínas, estão os íons monovalentes como o sódio e potássio. De intensidade moderada, magnésio e cálcio. Dentre os metais que apresentam forte ligação às proteínas, mais freqüentemente, estão os metais de transição, como ferro, cobre, zinco, manganês, molibdênio e cobalto, que devido às suas propriedades (densidade, pequeno raio atômico e interação via eletromagnética e forças eletrostáticas), estão ligados à maioria das metaloproteínas [1-5].

O selênio é um micronutriente essencial presente nos tecidos do corpo. Este elemento é parte integrante da enzima glutathiona peroxidase que atua no citosol celular convertendo peróxido de hidrogênio em compostos atóxicos [6]. A maioria das selenoproteínas identificadas até agora em mamíferos são selenoenzimas, com resíduos de selenocisteína, responsáveis pela função catalítica como a glutathiona peroxidase, responsável pela conversão de peróxido de hidrogênio em compostos atóxicos, protegendo a célula do dano oxidativo. Essa enzima foi identificada no citosol celular, no trato gastrointestinal e em núcleos de espermatozóides. Além das glutathionas peroxidase também foram identificadas as iodotironinas deiodinase, responsáveis pela ativação/inativação dos hormônios da tireóide que regulam vários processos metabólicos, as tioredoxinas redutase, presentes em vários tecidos, responsáveis por catalizar a redução NADPH-dependente, e as selenofosfatases [6,7]. Na nutrição animal, mais especificamente na nutrição de peixes, a quantidade de selênio dietético que é armazenado na forma orgânica, apresenta uma margem entre a exigência nutricional e o limiar tóxico é muito estreita. Estudos de mapeamento do selênio em proteínas do sangue e dos tecidos desses animais, poderão trazer informações

importantes para a área de genética, fisiologia e nutrição de peixes, principalmente em relação a avaliação da eficiência relativa de quantidades conhecidas de selênio para manter a atividade da glutathiona peroxidase em vários tecidos [8-10].

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo investigar a presença de selênio em spots protéicos de amostras de plasma, músculo e fígado de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por SR-XRF após separação utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida em segunda dimensão (2D-PAGE).

## 2. Experimental

### 2.1. Equipamentos

Além de vidrarias convencionalmente utilizadas em laboratório de Química Analítica, foram empregados os seguintes equipamentos e acessórios para o desenvolvimento do trabalho: Agitador por efeito Vórtex, marca Thermolyne, modelo M-37600 (Dubuque, EUA), balança analítica, marca Mettler, modelo AE200 (Bedford, EUA), cubas para eletroforese do tipo SDS-PAGE, marca GE (Uppsala, Suécia), espectrofotômetro UV/Visível, marca ThermoSpectronic, modelo Genesys 6, (Rochester, EUA), mesa agitadora, marca Quimis, modelo Q225M (Diadema, Brasil), sistema para eletroforese 2D-PAGE, marca GE Healthcare, modelo Ettan™ Daltsix (Uppsala, Suécia), sistema para focalização isoeletrica, marca Amersham Biosciences, modelo EPS1001 (Uppsala, Suécia), Scanner (GE Healthcare), Ultracentrífuga refrigerada, marca BioAgency, modelo Bio-Spin-R (São Paulo, Brasil), Espectrômetro de absorção atômica Shimadzu, modelo AA-6800 (Tokyo, Japão), Forno de Microondas Provecto Analítica, modelo DGT 100 plus (Campinas/São Paulo, Brasil).

### 2.2. Reagentes e Soluções

Água ultrapura ( $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ) obtida pelo sistema Elga modelo PURELAB Ultra Ionic foi utilizada em todo o trabalho no preparo das soluções. Ácidos acético (J. T. Backer) e fosfórico (Mallinckodt) de pureza analítica, nítrico e clorídrico (Merck) de grau espectroscópico foram utilizados em todo o trabalho no preparo de soluções tampão e soluções eletroforéticas. Todos os solventes orgânicos utilizados (e.g. etanol, acetona, metanol) foram de pureza analítica e de procedência Merck. As soluções

utilizadas nas separações eletroforéticas e padrões protéicos foram preparadas com reagentes de pureza analítica de procedência Amersham Biosciences. Azul de Coomassie G-250 (J. T. Backer) e Albumina de Soro Bovino (Merck) foram utilizados nas determinações de proteína total. Todas as soluções foram estocadas em frascos de polipropileno e/ou vidro, sendo as soluções utilizadas nas separações eletroforéticas foram guardadas em refrigerador a 4 °C (e.g. ) ou em freezer a -20 °C.

Todos os frascos de estocagem das soluções tampões, soluções extratoras, padrões protéicos, vidrarias e foram lavados com ácido nítrico 10% v/v por 24 horas e em seguida enxaguados com água ultrapura e secos por jatos de ar puro antes da utilização.

### *2.3. Coleta e preparo das amostras*

As amostras de plasma, fígado e músculo foram obtidas a partir de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, Botucatu/SP. Ao final do manejo alimentar, os peixes foram anestesiados, com solução de benzocaína (100 mg L<sup>-1</sup>) para coleta de sangue do vaso caudal com auxílio de seringa de 1,0 mL para obtenção da amostra de plasma. Após a coleta, o sangue foi transferido para tubos do tipo Eppendorf<sup>®</sup>, o qual continha K<sub>2</sub>EDTA (3,0%) que foi utilizado como anticoagulante. O sangue foi então centrifugado a 13000 rpm durante 5 minutos em ultracentrífuga refrigerada para obtenção do plasma, em seguida essas amostras foram armazenadas a -20 °C. Após este procedimento, os peixes anestesiados com benzocaína foram sacrificados para retirada de filés do músculo e fígado inteiro. As amostras de músculo e fígado foram então transferidas para frascos de polipropileno de 15 mL e armazenadas em freezer a -20 °C.

### *2.4. Preparação das amostras para eletroforese*

#### *2.4.1. Extração das proteínas das amostras*

As amostras de plasma sanguíneo, após procedimento de separação do sangue, conforme descrito anteriormente, apresentam-se prontas para serem quantificados os teores totais de proteínas e utilizadas nas corridas eletroforéticas. Já as amostras de

músculo e fígado foram maceradas em água deionizada, com auxílio de almofariz e pistilo. Em seguida, os extratos contendo as proteínas de músculo e fígado foram separados da parte sólida por centrifugação à 13000 rpm e a 4 °C durante 5 minutos, em ultracentrífuga refrigerada. Os extratos protéicos obtidos dessas amostras foram transferidos para tubos do tipo Eppendorf® e foram utilizados posteriormente para quantificação dos teores protéicos e corridas eletroforéticas [11-13].

#### *2.4.2. Precipitação e Ressolubilização das proteínas*

Para quantificação do teor protéico nas amostras, fez-se necessário um procedimento prévio de precipitação das proteínas. A precipitação das proteínas contidas nos extratos protéicos de plasma, músculo e fígado foi realizada com solução gelada de acetona 80% (v/v) na proporção de 1:4 (amostra:acetona). Essa precipitação foi conduzida durante três horas a -20 °C, garantindo que a precipitação ocorresse de maneira quantitativa. Em seguida, o precipitado protéico foi centrifugado a 10000 rpm em ultracentrífuga refrigerada (BioAgency) por 10 minutos e o sobrenadante foi retirado. Esse precipitado protéico foi lavado mais duas vezes com a solução de acetona gelada utilizada para a precipitação. As amostras de plasma e fígado foram submetidas a um processo de remoção de albumina por meio do uso de um kit de remoção de albumina (Millipore), visto que essas amostras apresentam altas concentrações de albumina [14,15]. Após estes procedimentos parte dos precipitados protéicos foi ressolubilizada em tampão Tris-HCl a 1 mol L<sup>-1</sup> (pH 6,8), para quantificação do teor total de proteínas, e parte dos precipitados foi ressolubilizada em tampão contendo uréia a 7 mol L<sup>-1</sup>, tiouréia a 2 mol L<sup>-1</sup>, CHAPS a 2% (m/v), anfólitos de pH 3 a 10 a 0,5% (v/v) e azul de bromofenol a 0,002%, além disso 2,8 mg de DTT foram adicionados a este tampão, esta mistura foi utilizada nas separações eletroforéticas [13].

#### *2.4.3. Determinação da concentração das proteínas totais*

A concentração de proteínas totais nos extratos protéicos de plasma e fígado foi determinada de acordo com o método de Bradford, já a amostra de músculo foi quantificada pelo método de Biureto, ambos empregando Albumina de Soro Bovino como padrão [11,12].

Curvas analíticas de calibração foram feitas na faixa de 25 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , para as amostras de plasma e fígado, a partir de solução padrão estoque de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Albumina de Soro Bovino, com o mesmo tampão utilizado na ressolubilização das proteínas. Quando necessário, as amostras foram diluídas com o mesmo tampão. Em cubetas de plástico foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de padrão/amostra diluída apropriadamente, e 2,5 mL do reagente de Bradford. Após 5 min de reação, as leituras de absorbância foram medidas a 595 nm em espectrofotômetro. Para a amostra de músculo, uma curva analítica na faixa de 10 a 100  $\text{mg mL}^{-1}$  foi feita a partir de solução padrão estoque de 1000  $\text{mg mL}^{-1}$ . Em cubetas de plástico foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de padrão/amostra diluída apropriadamente, e 2,5 mL do reagente do Biureto. A mistura padrão ou amostra com o reagente foi mantida a 32 °C em banho Maria durante 15 min. Após o tempo de reação as leituras de absorbância foram medidas a 545 nm em espectrofotômetro.

### *2.5. Separações eletroforéticas*

Antes do início das separações eletroforéticas uma massa de aproximadamente 250  $\mu\text{g}$  de proteínas dos extratos protéicos de plasma, músculo e fígado foram aplicadas em fitas para focalização isoeletrica de 13 cm, que continham o gel pré-fabricado com os anfólitos imobilizados de pH 3 a 10 ou 4 a 7. Essas fitas foram colocadas em um aparato, sobre o qual permaneceu por 12h, a temperatura ambiente, para serem rehidratadas com o extrato protéico. Além do extrato protéico foram adicionados também cerca de 900  $\mu\text{L}$  de óleo mineral sobre essas fitas. Após este período, a fita rehidratada foi levada ao sistema para focalização isoeletrica para corrida em primeira dimensão da eletroforese bi-dimensional.

Após a etapa de rehidratação da fita com o extrato protéico, a primeira dimensão do processo eletroforético foi realizada em sistema para focalização isoeletrica, seguindo o programa descrito na Tabela 1.

**Tabela 1:** Programa utilizado na separação eletroforética em primeira dimensão (IEF).

Etapa	Tensão (V)	Acúmulo (Vh)
1	500	500
2	1000	800
3	10000	11300
4	10000	3000

O programa de separação em primeira dimensão durou em média 4,5 h. Após o término da focalização isoeletrica, a fita com as proteínas separadas em função do pI, foi equilibrada em duas etapas. Na primeira etapa, foram utilizados 10 mL de solução contendo uréia 6 mol L<sup>-1</sup>, SDS 2 % (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mmol L<sup>-1</sup>, azul de bromofenol 0,002% (m/v) e DTT 1% (m/v). Esta etapa denominada redução tem a finalidade de manter as proteínas em suas formas reduzidas. Na segunda etapa foi utilizada uma solução de composição similar porém, substituindo-se o DTT por iodoacetamida 2,5% (m/v). Esta etapa é denominada alquilação e sua finalidade é alquilar os grupos tióis das proteínas, prevenindo que elas sejam reoxidadas durante o processo eletroforético. Cada uma destas etapas durou 15 min e foi realizada sob leve agitação em mesa agitadora [13].

Após a etapa de equilíbrio das fitas foi realizada a segunda dimensão do processo eletroforético (SDS-PAGE). A fita de proteínas de plasma foi aplicada em gel de poliacrilamida 10% e as fitas de músculo e fígado em gel de poliacrilamida 12,5%, previamente preparados em placa de vidro de 180x160x1,5 mm. O géis de poliacrilamida foram preparados a partir das seguintes soluções: Acrilamida, N,N'-metilenobisacrilamida, Tris-hidroximetil amino metano, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), N,N',N,N'-tetrametilenodiamina (TEMED), Ácido Clorídrico (HCl) e Persulfato de Amônio. Foi colocado sobre o gel de poliacrilamida, ao lado da fita, um pedaço de papel de filtro, ao qual foi aplicado 10 µL de padrão de massa molar contendo as proteínas β-fosforilase (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactoalbumina (14,4 kDa). A fita e o papel de filtro foram vedados com solução quente de agarose 0,5% (m/v) em tampão adequado, de modo a garantir o contato destes com o gel de poliacrilamida. Em seguida, a corrida eletroforética em segunda dimensão foi efetuada em sistema para eletroforese 2D-PAGE, em duas etapas, conforme descritas na Tabela 2.

**Tabela 2:** Programa utilizado na separação eletroforética em segunda dimensão (SDS-PAGE).

	Etapas	
	1	2
Tensão (V)	90	250
Corrente Elétrica (mA)	25	25
Potência (W)	100	100
Tempo (h)	0,5	5

Após o período de corrida (aproximadamente 5,5 h) as proteínas foram reveladas empregando-se o corante Coomassie coloidal, que consiste em uma solução de sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 1,6% (v/v), azul de coomassie G-250 0,08% (m/v) e metanol 25% (v/v). Antes da revelação, as proteínas foram fixadas durante 1 h, empregando-se solução contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v). O corante ficou em contato com o gel durante 72 h e depois foi removido por sucessivas lavagens com água ultrapura. Os géis obtidos, feitos em triplicatas para os três tipos de amostra, foram escaneados em Scanner, e as imagens foram tratadas, para análises de correlação entre as repetições de géis, bem como a contagem de spots dos mesmos, utilizando o programa *ImageMaster platinum 6.0*.

#### 2.6. Determinação qualitativa do selênio por SR-XRF nos spots de proteínas das amostras

As determinações qualitativas de selênio nos spots de proteínas foram feitas em linha de Fluorescência de raios-X com radiação Síncrotron, disponível no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, localizado na cidade de Campinas-SP/Brasil. Os spots de proteínas foram retirados do gel com o auxílio de uma ponteira de pipeta, secos com lâmpada de infravermelho durante 20 min e fixados em plataforma de alumínio. Após serem estabelecidas as condições de análise, o mapeamento do selênio foi realizado por irradiação do spot por 200 s em dois pontos. Os espectros coletados foram processados por meio do programa AXIL, que permite corrigir a variação da intensidade do feixe da radiação síncrotron fazendo-se a normalização da área dos picos das espécies químicas detectadas pela contagem do pico de argônio [16].

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Determinação da concentração de proteínas totais nas amostras

A determinação do teor total de proteínas nas amostras de plasma, fígado e músculo foi realizada para se obter a melhor massa protéica a ser aplicada nos géis das corridas eletroforéticas por 2D-PAGE, levando-se em consideração a resolução do gel. Os resultados obtidos nessas determinações constam na Tabela 3. Observa-se que o músculo e o plasma de tilápia do Nilo apresentam maior concentração de proteína, se comparados ao fígado. Com base nesses resultados foram aplicados nas fitas contendo gel pré-frabricado para focalização isoeétrica, volumes de 10  $\mu\text{L}$  das amostras de plasma e músculo e de 50  $\mu\text{L}$  da amostra de fígado, que continham aproximadamente 250  $\mu\text{g}$  de proteína.

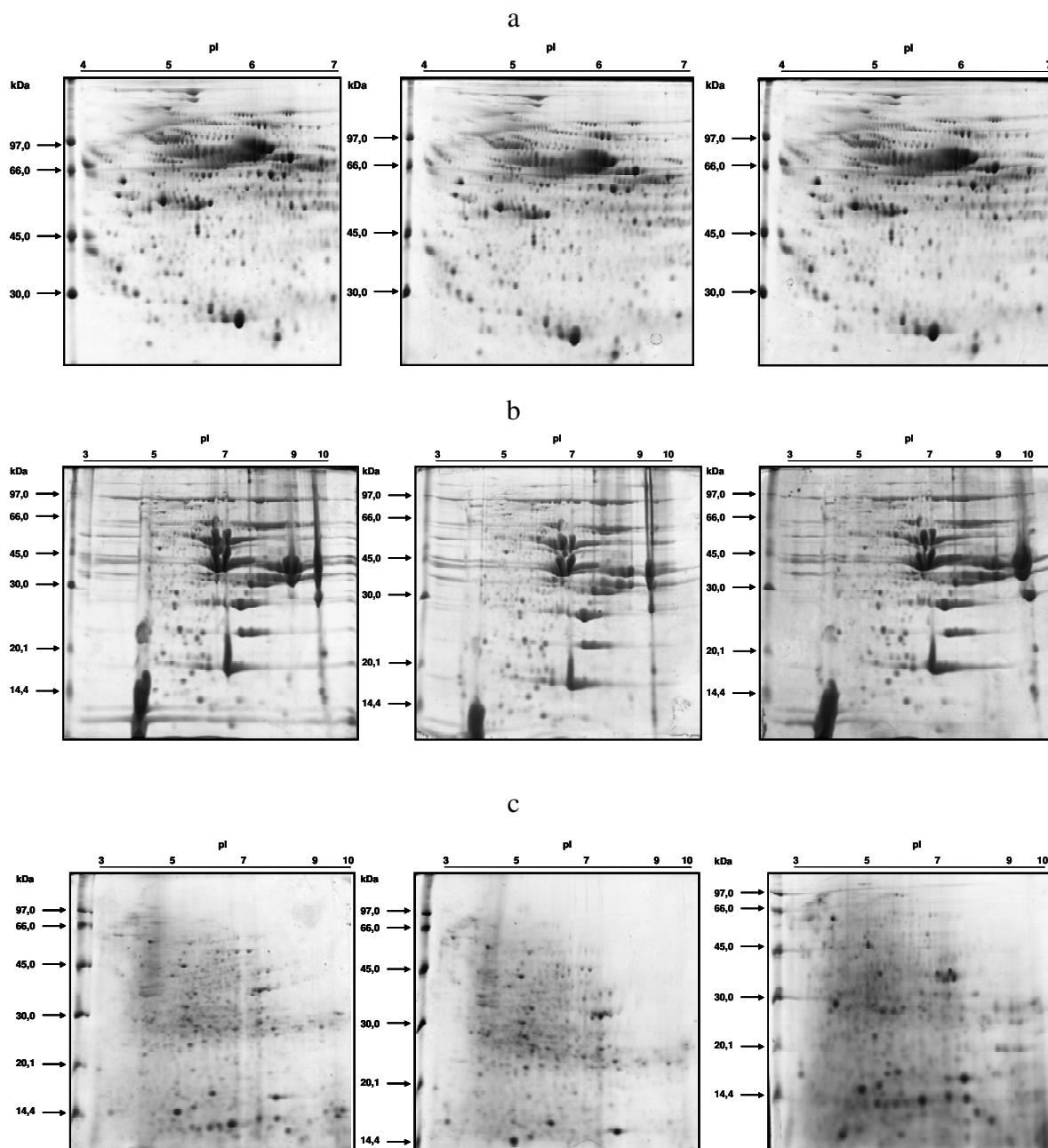
**Tabela 3:** Concentrações de proteínas totais (concentração  $\pm$  desvio padrão, n = 3) de amostras de plasma, músculo e fígado de tilápia do Nilo.

Amostra	Concentração de proteínas totais ( $\text{g kg}^{-1}$ )
Plasma	$25,7 \pm 2,0^*$
Músculo	$25,1 \pm 0,3$
Fígado	$5,3 \pm 0,3$

\*resultado expresso em  $\text{mg mL}^{-1}$

#### 3.2. Otimização das separações eletroforéticas

Na tentativa de obter géis de eletroforese com boas resoluções testou-se sistemas de separação 2D-PAGE, visto que o sistema de separação eletroforética somente em uma dimensão não apresentaria boa resolução e sim bandas eletroforéticas de um grupo de proteínas com massas molares semelhantes. Na eletroforese 2D-PAGE cada mancha no gel, ou mais comumente denominado “spot” representa uma única proteína [17-19]. Os géis obtidos para as amostras de plasma, músculo e fígado são apresentados na Figura 1 (a, b e c, respectivamente).



**Figura 1:** Gel de poliacrilamida com proteínas de amostras de plasma (a), músculo (b) e fígado (c) de tilápia do Nilo.

Conforme mostra a Figura 1a, os géis de plasma apresentaram boa resolução, o que demonstra que a separação de proteínas ocorreu de forma eficiente. Os géis mostram ainda que há grande diversidade de proteínas, espalhadas em todo o gel, com algumas mais intensas com pI entre 5 e 6 e massa molar em torno de 70,0 kDa. A análise de correlação entre os três géis demonstrou que 89,5% das proteínas estavam presentes nos três géis, o que representa aproximadamente 515 spots de proteínas. O número médio de spots nos géis foi de 575 com desvio padrão de 13 spots.

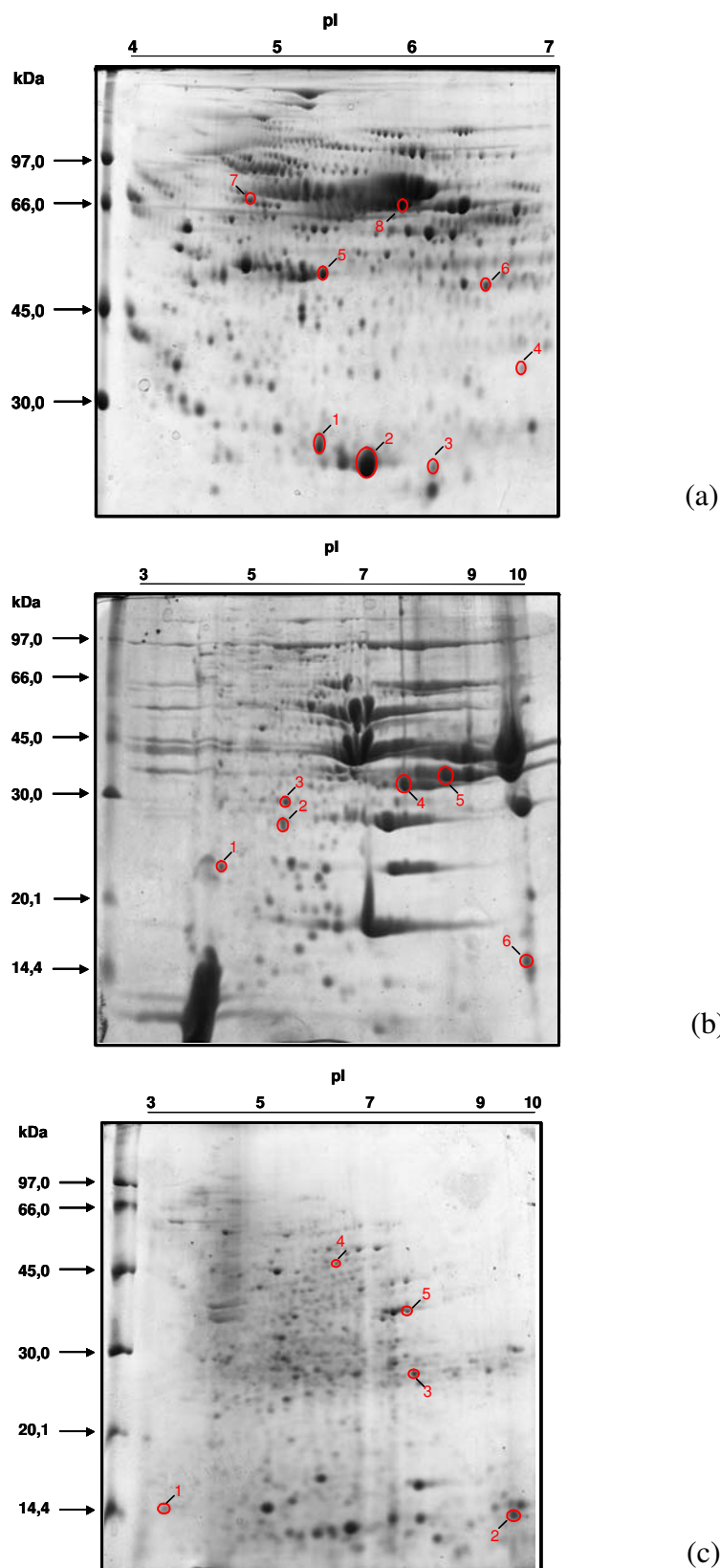
Os géis da amostra de músculo (Figura 1b) também apresentaram boa resolução. Observa-se na análise desses géis grande diversidade de proteínas com pI entre 5 e 7 e massa molar entre 14,4 e 97,0 kDa, com algumas proteínas de pI entre 7 e 10 e massa molar entre 30,0 e 45,0 kDa aparecendo em maior intensidade. A análise de correlação entre os três géis demonstrou que 71,7% das proteínas estavam presentes nos três géis, o que representa aproximadamente 272 spots de proteínas. O número médio de spots nesses géis foi de 380 com desvio padrão de 16 spots.

Em relação aos géis da amostra de Fígado (Figura 1c), observa-se boa resolução e separação eficiente das proteínas. Os géis mostram que há uma grande diversidade de proteínas com pI entre 5 e 7 e massa molar entre 30,0 e 45,0 kDa, sendo que alguns spots protéicos com massa molar menor que de 14,4 kDa, apresentam-se com maior intensidade. A análise de correlação entre os dois géis demonstrou que 66,4% das proteínas estavam presentes nos dois géis, o que representa aproximadamente 335 spots de proteínas. O número médio de spots nos géis foi de 505 com desvio padrão de 12 spots.

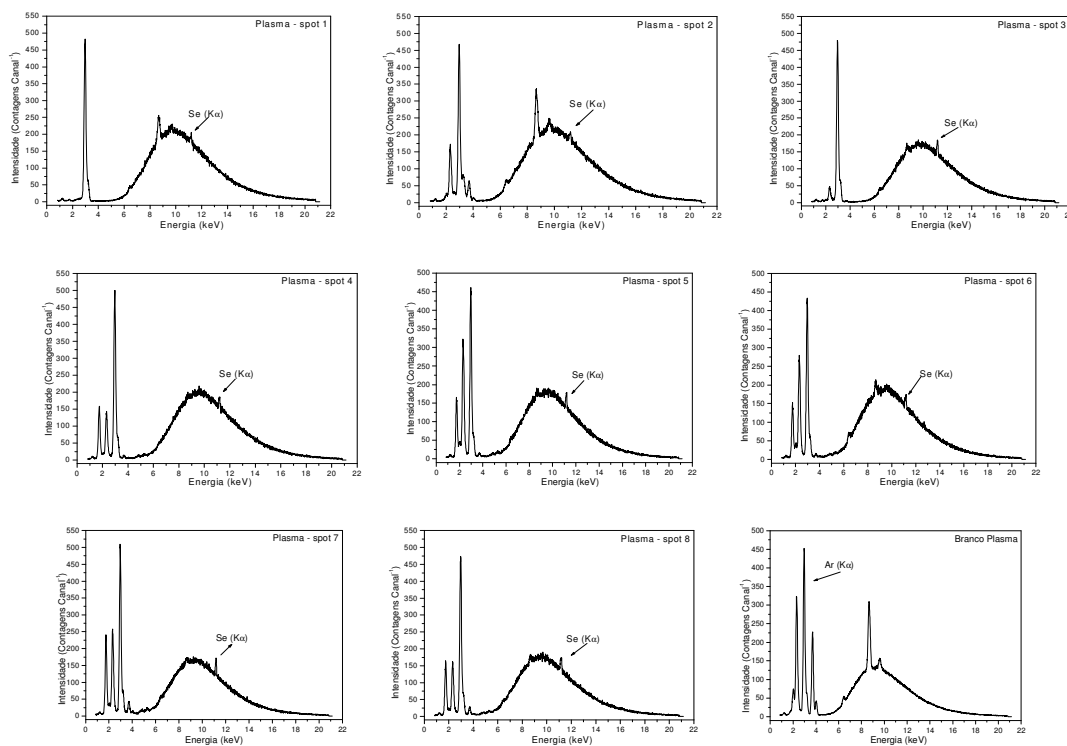
### *3.3. Avaliação qualitativa de selênio por SR-XRF nos spots protéicos das amostras de plasma, músculo e fígado de tilápia do Nilo*

A avaliação qualitativa de selênio ligado às proteínas nos spots protéicos foi realizada considerando-se a sensibilidade da técnica SR-XRF e que o selênio possivelmente estaria em baixas concentrações nos diversos spots. Dessa forma, somente os spots com maior intensidade nos géis foram submetidos à análise [20,21]. Na Figura 2 (a-plasma; b-músculo; c-fígado) são apresentados os géis com a identificação dos spots protéicos analisados por SR-XRF que apresentaram selênio. Nas Figuras 3, 4 e 5 são mostrados os gráficos dos espectros de fluorescência de raios-X com radiação sincrotron obtidos para os spots protéicos das amostras de plasma, músculo e fígado, respectivamente, além do branco analítico (região do gel onde não havia spots protéicos). De acordo com os gráficos apresentados nas Figuras 3, 4 e 5, nota-se que os espectros apresentam fundos contínuos intensos. Tais fundos devem-se, principalmente, ao espalhamento Compton dos raios-X incidentes sobre a matriz do gel, o qual pode mascarar os sinais do elemento de interesse [16]. Dessa forma, utilizando os valores das áreas dos picos normalizados (após desconto do branco analítico) dos

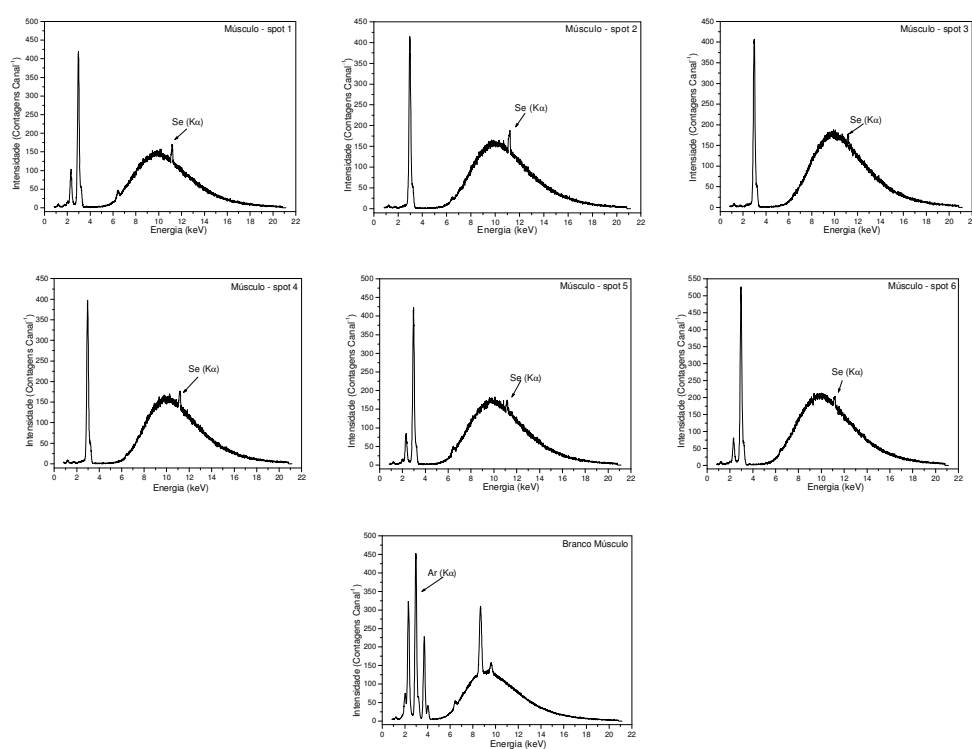
espectros de SR-XRF, foi possível identificar o selênio ligado às proteínas dos spots marcados em vermelho, apresentados na Figura 2.



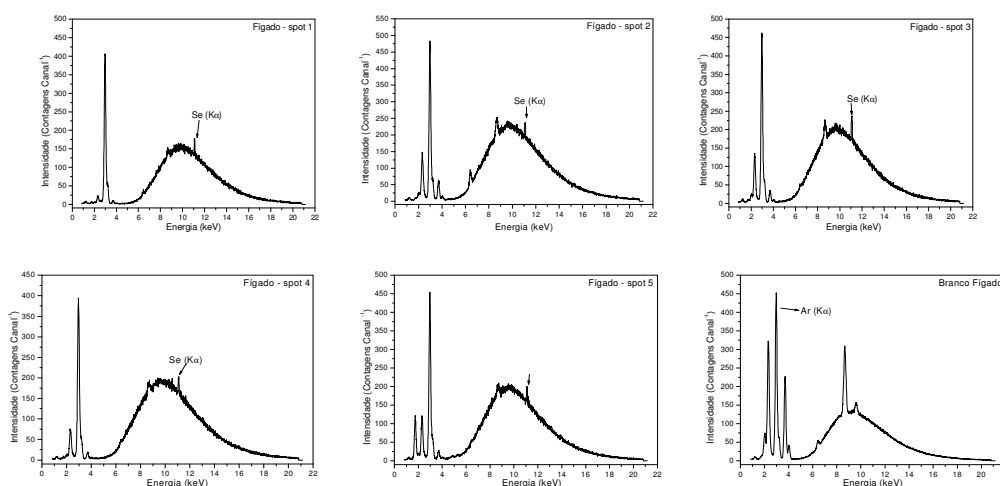
**Figura 2:** Mapeamento do selênio nos spots de proteínas do plasma (a), músculo (b) e fígado (c) de tilápia do Nilo, separadas em gel de poliacrilamida por eletroforese 2D.



**Figura 3:** Espectros de fluorescência de raios-X com radiação Síncrotron obtidos para os spots protéicos (1 a 8) de plasma de tilápia do Nilo.



**Figura 4:** Espectros de fluorescência de raios-X com radiação Síncrotron obtidos para os spots protéicos (1 a 6) de músculo de tilápia do Nilo.



**Figura 5:** Espectros de fluorescência de raios-X com radiação Síncrotron obtidos para os spots protéicos (1 a 5) de fígado de tilápia do Nilo.

Na Tabela 4, estão indicados os spots nos quais foram identificados a presença de selênio.

**Tabela 4:** Massa molar (MM) e ponto isoelétrico (pI) dos spots nos quais foram identificados a presença de selênio nos três diferentes tipos de amostra.

Amostra								
Plasma			Músculo			Fígado		
spot	MM	pI	spot	MM	pI	spot	MM	pI
1	28,5	5,4	1	23,3	4,6	1	14,4	3,4
2	26,7	5,7	2	28,5	5,7	2	14,0	9,8
3	26,7	6,2	3	31,8	5,8	3	28,8	7,9
4	37,1	6,8	4	34,4	7,8	4	47,3	6,5
5	51,2	5,4	5	36,5	8,6	5	38,6	7,8
6	49,2	6,6	6	15,0	10,0			
7	68,6	4,9						
8	65,8	6,0						

A análise das Figura 2, 3, 4 e 5 e dos resultados apresentados na Tabela 4 sugerem a presença de selênio em oito spots protéicos do plasma, seis spots do músculo e cinco spots do fígado. Pode-se observar que das 19 proteínas encontradas nos três tipos de amostras, o selênio está distribuído em sua maioria em proteínas com massa

molecular menor que 50 kDa e que algumas proteínas com massa molecular maior que 50 kDa foram encontradas somente no plasma. Esses resultados sugerem que as proteínas nas quais foram identificadas a presença de selênio, possivelmente apresentam nas cadeias laterais de seus fragmentos peptídicos grupos funcionais com átomos de enxofre (grupos tióis), grupos estes com características de bases moles e, conseqüentemente ligam-se preferencialmente a metais/metalóides com características de ácidos moles, como no caso, o selênio (na forma R-Se<sup>+</sup>) [22].

#### 4. Conclusão

A utilização da eletroforese 2D PAGE como etapa inicial no estudo de avaliação de metaloproteínas foi eficiente no fracionamento das proteínas presentes em amostras de plasma, músculo e tecido hepático de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). A boa correlação obtida nas repetições dos géis indicou que os procedimentos de extração de proteínas totais preservaram a estrutura metal-proteína, o que possibilitou o mapeamento de selênio nos spots protéicos por SR-XRF.

#### Referências

- [1] D. VOET, J.G. VOET, C.W. PRATT, Fundamentals of biochemistry. Upgrade Edition, John Wiley & Sons, Chichester, 2002, p. 931.
- [2] D.E. FENTON, Biocoordination Chemistry, Oxford Chemistry Primers, New York, 1995, p. 96.
- [3] J.S. GARCIA, C.S. MAGALHÃES, M.A.Z. ARRUDA, Talanta 69 (2006) 1-15.
- [4] Y. GAO, C. CHEN, P. ZHANG, Z. CHAI, W. HE, Y. HUANG, Anal. Chim. Acta 485 (2003), 131-137.
- [5] F. ARNESANO, L. BANCI, I. BERTINI, F. CAPOZZI, S. CIOFI-BAFFONI, S. CIURLI, C. LUCHINAT, S. MANGANI, A. ROSATO, P. TURANO, M.S. VIEZZOLI, Coord. Chem. Rev. 250 (2006) 1419-1450.
- [6] D. BEHNE, A. KYRIAKOPOULOS, Annu. Rev. Nutr. 21 (2001) 453-473.
- [7] A. KYRIAKOPOULOS, H. BERTELSMANN, A. GRAEBERT, B. HOPPE, M. KUHBAKER, D.J. BEHNE, Trace Elem. Med Biol. 16 (2002) 57-62.
- [8] T. WATANABE, V. KIRON, S. SATOH, Aquaculture 151 (1997) 185-207.

- [9] R.T. LOVELL, Nutrition and feeding of fish, Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, 1998, p. 267.
- [10] E.L. AMWEG, D.L. STUART, D.P. WESTON, *Aquat. Toxicol.* 63 (2003) 13-25.
- [11] M.M. BRADFORD, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- [12] F.O. BOBBIO, P.A. BOBBIO, *Introdução à química de alimentos*, Livraria Varela, São Paulo, 2003, p. 238.
- [13] T. BERKELMAN, T. STENSTEDT, *2-D Electrophoresis: Principles and Methods*, Amersham Biosciences, 1998, p. 101.
- [14] P.C. CHAMPE, R.A. HARVEY, D.R. FERRIER, *Bioquímica Ilustrada*, Artmed, Porto Alegre, 2006, p. 544.
- [15] A.L. LEHNINGER, *Princípios de Bioquímica*, Sarvier, São Paulo, 2006, p. 1202.
- [16] B. VEKEMANS, P. JANSSENS, L. VINCZE, F. ADAMS, P. VAN ESPEN, *X-Ray Spectrom.* 23 (1994) 278-285.
- [17] M. MELVIN, *Electrophoresis*, John Wiley & Sons, Chichester, 1987, p. 130.
- [18] J.G. SILVA JUNIOR, *Eletroforese de proteínas: guia teórico-prático*, Interciência, Rio de Janeiro, 2001, 125p.
- [19] B.D. HAMES, D. RICKWOOD, *Gel Electrophoresis of proteins: A practical approach*, IRL Press, New York, 1990, p. 383.
- [20] G.F. COMBS, S.B. COMBS, *The role of selenium in nutrition*, Academic Press, London, 1986, p. 180.
- [21] WATANABE, T.; KIRON, V.; SATOH, S. *Aquaculture* 151 (1997) 185-207.
- [22] PEARSON, R.G. *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 3533-3539.

## ANEXO II

### Lista de Abreviaturas

**2D-PAGE:** Eletroforese em gel de poliacrilamida em duas dimensões, do inglês, “*two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*”

**CHAPS:** Sulfonato de 3-[(3-cloroamidopropil)-dimetilamônio]-1-propano

**DTT:** 1,4 Ditioneitol

**HCl:** ácido clorídrico

**K<sub>2</sub>EDTA:** ácido etilenodiaminotetraacético dipotássico

**MM:** massa molar

**pI:** Ponto isoelétrico

**SDS:** Dodecil sulfato de sódio

**SDS-PAGE:** Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, do inglês, “*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*”

**SR-XRF:** Fluorescência de raios-X com Radiação Síncrotron, do inglês, “*Synchrotron Radiation X-ray Fluorescence Spectrometry*”

**TEMED:** *N,N',N,N'*-tetrametiletilenodiamina

**Tris-HCl:** Tris-hidroximetil amino metano-ácido clorídrico

# ***CAPÍTULO III***

## **Determinação de selênio em amostras de tecido muscular e hepático de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por GFAAS utilizando extração por ultra-som**

### **Resumo**

No presente trabalho é proposto um método para determinação de selênio em amostras de tecidos muscular e hepático de peixes utilizando ultra-som no processo de extração do analito e posterior quantificação por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS). Utilizando como solução extratora HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup>, as condições ótimas de extração estabelecidas foram: massa de amostra de 100 mg; granulometria da amostra < 60 µm; tempo de sonificação de cinco ciclos de 40 s e potência de sonificação de 136 W. As determinações de selênio foram feitas por GFAAS utilizando-se temperaturas de secagem de 90-250 °C, temperatura de pirólise de 1300 °C, temperatura de atomização de 2300 °C e temperatura de limpeza de 2800 °C. Foi utilizado como modificador químico nitrato de paládio co-injetado junto com as amostras e tungstênio como modificador permanente. A exatidão e precisão do método de extração proposto foram avaliadas utilizando-se padrão certificado Bovine Muscle – NIST RM 8414. Os resultados obtidos pelo método proposto mostraram-se equivalentes aos obtidos pelo método utilizando-se a mineralização ácida. Deve-se destacar que a metodologia proposta diminui consideravelmente o tempo de análise, o que favorece a velocidade analítica. Além disso, a quantidade de resíduos gerados para o ambiente também é bastante minimizada.

Palavras-chave: Selênio em peixes, micronutrientes, essencialidade de nutrientes, espectrometria atômica, cavitação acústica.

**Selenium determination in muscle and liver tissues samples of Nile tilapia  
(*Oreochromis niloticus*) by GFAAS using ultrasound extraction**

**Abstract**

In this paper we proposed a method for determination of selenium in samples of muscle and liver tissues of fish using ultrasound in the analyte extraction process, and subsequent quantification by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). Using  $0.10 \text{ mol L}^{-1}$  of HCl as extraction solution, the optimal conditions of extraction were established as follows: the mass of the sample of 100 mg, sample granulometry of less than  $60 \mu\text{m}$ ; sonication time of five cycles of 40 s and sonication power of 136 W. The selenium determinations were carried out by GFAAS using a drying temperature of  $90 - 250 \text{ }^\circ\text{C}$ , pyrolysis temperature of  $1300 \text{ }^\circ\text{C}$ , atomization temperature of  $2300 \text{ }^\circ\text{C}$  and cleaning temperature of  $2800 \text{ }^\circ\text{C}$ . Was used as chemical modifier palladium nitrate co-injected with the samples and tungsten as permanent modifier. The accuracy and precision of the extraction method was evaluated using a standard certificate Bovine Muscle - NIST RM 8414 and also by comparison with determinations made using the acid mineralization of samples. The results proved consistent with that obtained from samples mineralized by acid digestion. It should be pointed out that the proposed methodology considerably reduced the time spent on the analysis, favoring the analytical speed. Furthermore, the toxic residues generated to the environment is also very minimized.

Keywords: Selenium in fish, Micronutrient, essentiality of nutrients, atomic spectrometry, acoustic cavitation

## 1. Introdução

Por apresentarem proporções e quantidades variáveis no tecido corporal dos animais, os elementos inorgânicos são classificados como macroelementos (elementos que o organismo necessita em grandes quantidades) e microelementos (elementos que o organismo necessita em menores quantidades). Dos elementos químicos presentes na tabela periódica, 25 podem ser classificados como essenciais. No entanto, do ponto de vista prático, são considerados macroelementos essenciais o cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cloro e enxofre e como microelementos essenciais o cobre, cobalto, ferro, iodo, manganês, selênio e zinco [1-4].

O selênio é um micronutriente que apresenta a margem da exigência nutricional e o limite tóxico para os animais bem próximos. Este elemento é parte integrante da enzima glutathione peroxidase que atua no citosol celular convertendo peróxido de hidrogênio em compostos atóxicos. O nível de atividade dessa enzima no fígado ou plasma é indicativo do suprimento de selênio do organismo. O principal indicador bioquímico da deficiência do selênio nos animais é a redução da atividade da glutathione peroxidase. Um monitoramento adequado da concentração deste elemento nos tecidos e no sangue dos animais é importante em estudos de stress oxidativo [4-6].

Por apresentar concentrações em níveis bastante baixos nos tecidos dos animais (na faixa de  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), a etapa de extração do selênio no processo de quantificação deste micronutriente é problemática. Normalmente, essa extração é feita por mineralização ácida das amostras sob aquecimento lento em blocos digestores, utilizando-se mistura nítrica-perclórica. Os extratos resultantes são soluções ácidas contendo os nutrientes inorgânicos. Este procedimento além de demorado pode acarretar em perda do selênio por volatilização [7]. A extração de analitos inorgânicos por ultra-sonificação, tem se apresentado como técnica alternativa bastante robusta [8]. Os ultra-sons ocorrem devido ao fenômeno da cavitação acústica, que é o processo de nucleação, crescimento e colapso de bolhas transientes em líquidos expostos a ondas ultra-sônicas de baixa frequência ( $< 1 \text{ MHz}$ ). No preparo de amostras, o colapso das microbolhas favorece a extração de espécies químicas a partir de materiais sólidos, bem como a dissolução destes ou completa mineralização no caso de compostos orgânicos. Assim, a utilização da extração de compostos e/ou ions inorgânicos de amostras biológicas por ultra-sonificação pode permitir a eliminação da mineralização ácida [9-13].

Considerando o exposto, este trabalho descreve o desenvolvimento de um método para determinação de selênio em tecido muscular e hepático de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS), utilizando extração assistida por ultra-som, procurando-se eliminar a etapa de digestão ácida das amostras.

## **2. Experimental**

### *2.1. Reagentes e soluções*

Água ultrapura ( $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ) obtida pelo sistema Elga modelo PURELAB Ultra Ionic, ácido nítrico e clorídrico (Merck) de grau espectroscópico foram utilizados em todo o trabalho. As soluções estoque de selênio e dos concomitantes foram preparadas por diluições de padrões titrisol Merck. As demais soluções, incluindo as soluções extratoras foram preparadas a partir de reagentes Merck. Todas as soluções foram estocadas em frascos de polipropileno.

Todos os frascos de estocagem de amostras e soluções padrão, vidrarias e os frascos do amostrador do espectrômetro de absorção atômica foram lavados com ácido nítrico 10% v/v por 24 horas e em seguida enxaguados com água ultrapura e secos por jatos de ar puro antes da injeção de padrões e/ou amostras.

### *2.2. Coleta e preparo das amostras*

As amostras de tecido muscular e hepático foram coletadas após experimentos de digestibilidade envolvendo juvenis de tilápia do Nilo que foram submetidos a uma dieta com diferentes fontes alimentares. Esses experimentos foram desenvolvidos na UNESP, FMVZ, Laboratório de Nutrição Organismos Aquáticos, Botucatu-SP. Ao final do manejo alimentar, os peixes de cada aquário foram anestesiados, com solução de benzocaína ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) e sacrificados para retirada de amostras de músculo e fígado que, em seguida foram transferidas para frascos de polipropileno de 15 mL e armazenadas a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  [14-17].

As amostras foram preparadas para a etapa de extração do selênio procedendo-se inicialmente a desidratação em estufa de recirculação forçada de ar a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  por 48 horas e posteriormente a moagem por maceração em Grau de Porcelana na presença de

nitrogênio líquido até a obtenção de partículas com granulometria menor que 60  $\mu\text{m}$  [18].

### 2.3. Extração do selênio

Após a etapa de secagem e moagem, aproximadamente 100 mg de amostra e 10 mL de solução 0,10 mol L<sup>-1</sup> de ácido clorídrico foram transferidas para frascos de teflon de 50 mL. A mistura amostra/solução foi então submetida à agitação por ultra-som para extração do selênio. Utilizando-se este procedimento foram avaliados diferentes tempos de sonificação e potências de ultra-som no processo de extração do analito. Os extratos ácidos obtidos foram separados da fase sólida remanescente por centrifugação.

Uma parte das amostras foi também mineralizada em bloco digestor. Para isso, massas de aproximadamente 100 mg de amostras foram transferidas diretamente para tubos de vidro de borosilicato, adicionando-se em seguida 3 mL de ácido nítrico 14 mol L<sup>-1</sup> mais 0,50 mL de peróxido de hidrogênio 30% m/m e, procedendo-se o aquecimento do sistema até a completa mineralização das amostras.

### 2.4. Equipamentos

Para a secagem e digestão das amostras foram utilizados estufa de circulação forçada de ar TECNAL modelo TE – 394/1 e bloco digestor Marconi modelo MA-447/6/100, composto por seis tubos de borosilicato do tipo Kjeldahl, respectivamente.

Para determinação de selênio foi utilizado espectrômetro de absorção atômica SHIMADZU modelo AA-6800, equipado com corretor de absorção de fundo com lâmpada de deutério e sistema self-reverse (SR), tubo de grafite pirolítico com plataforma integrada e amostrador automático ASC-6100. Foi utilizada lâmpada de cátodo oco de selênio SHIMADZU, operada com 10 mA de corrente. O comprimento de onda utilizado foi de 196,0 nm e a resolução espectral foi de 0,5 nm. Argônio foi utilizado como gás inerte, mantendo-se um fluxo constante de 1 L min<sup>-1</sup> durante todo o programa de aquecimento, exceto na etapa de atomização, na qual o fluxo de gás foi interrompido. Os sinais de absorbância foram medidos em de área de pico.

Desruptor de células ultra-sônico UNIQUE, composto com macro e micro ponteira de titânio, foi utilizado no processo de extração do selênio.

### 2.5. Preparo do tubo de grafite recoberto internamente com carbeto de tungstênio

Os tubos de grafite pirolíticos com plataforma integrada utilizados nas determinações de selênio tiveram suas paredes internas recobertas com tungstênio. Para isso, alíquotas de 25  $\mu\text{L}$  de solução contendo 1000  $\text{mg L}^{-1}$  do modificador tungstato de sódio foram injetadas dentro do atomizador, o qual em seguida foi submetido às etapas do programa de aquecimento descrito na Tabela 1. Esse procedimento foi repetido 20 vezes. Com aquecimento acima de 1000  $^{\circ}\text{C}$  íons tungstênio são depositados sobre a plataforma do tubo de grafite, formando uma camada de carbeto de tungstênio que atua como modificador químico [7]. A massa de tungstênio depositado na plataforma do tubo de grafite foi de 500  $\mu\text{g}$ . Com esse tratamento foi possível utilizar o tubo de grafite em 626 queimas de amostras.

**Tabela 1.** Programa de aquecimento utilizado para o recobrimento da parede interna do tubo de grafite com carbeto de tungstênio.

Etapa	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Estágios		Fluxo de Argônio ( $\text{L min}^{-1}$ )
		Rampa (s)	Aquecimento (s)	
Secagem	110	10	25	0.30
Secagem	150	10	25	0.30
Redução	600	10	20	0.30
Redução	1200	10	20	0.30
Limpeza	2600	0	5	0.30

### 2.6. Preparo da curva analítica

Curva analítica foi preparada utilizando-se solução padrão estoque de selênio (Merck), sendo as leituras das absorvâncias feitas por GFAAS. Para isso, volumes de 4, 8, 16, 20 e 40  $\mu\text{L}$  de solução padrão contendo 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de selênio, 5  $\mu\text{L}$  de ácido nítrico suprapuro 14  $\text{mol L}^{-1}$ , 50  $\mu\text{L}$  de Triton X-100 a 1% v/v, 100  $\mu\text{L}$  de solução 1000  $\text{mg L}^{-1}$  de Pd(II) e água ultrapura foram transferidos para os frascos do autoamostrador do espectrômetro, de modo que o volume final das soluções ficasse igual 1000  $\mu\text{L}$  e as concentrações de selênio na faixa de 2 a 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

### 2.7. Preparo dos extratos ácidos para injeção no tubo de grafite

Após o processo de extração por ultra-som, 500  $\mu\text{L}$  dos extratos ácidos obtidos foram transferidos diretamente para os copos do autoamostrador do espectrômetro de absorção atômica e em seguida foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de ácido nítrico suprapuro 14  $\text{mol L}^{-1}$ , 50  $\mu\text{L}$  de Triton X-100 a 1% v/v, 100  $\mu\text{L}$  de solução 1000  $\text{mg L}^{-1}$  de Pd(II) e 345  $\mu\text{L}$  de água ultrapura.

### 2.8. Procedimentos analíticos

Após a etapa de preparo das amostras (extratos ácidos) e das soluções padrão, preparadas diretamente nos copos do autoamostrador, um volume de 20  $\mu\text{L}$  de padrão e/ou amostra foi injetado para dentro do tubo de grafite (recoberto internamente com carbeto de tungstênio) pela micropipeta do autoamostrador. As medidas foram feitas com três repetições. O programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para determinação de selênio encontra-se descrito na Tabela 2.

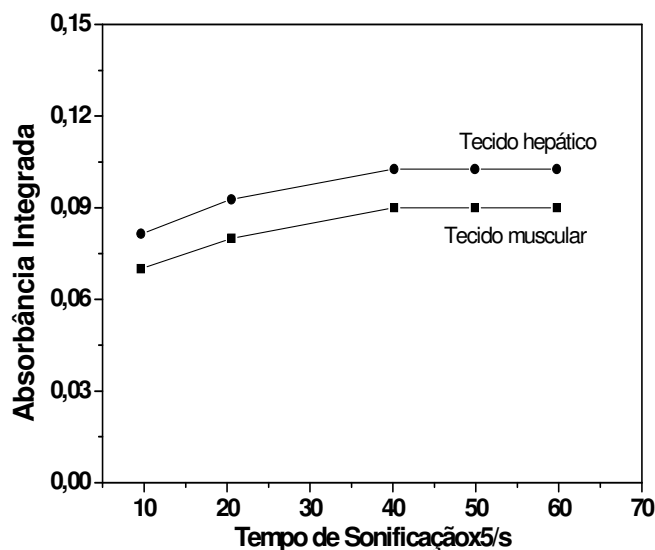
**Tabela 2.** Programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para determinação de selênio nos extratos ácidos obtidos das amostras de tecido muscular e hepático.

Etapas	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Estágios		Fluxo de Argônio ( $\text{L min}^{-1}$ )
		Rampa (s)	Aquecimento (s)	
Secagem	90	10	0	1
Secagem	150	10	5	1
Secagem	250	10	5	1
Pirólise	1300	5	10	1
Atomização	2300	1	5	0
Limpeza	2800	5	0	1

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Otimização do tempo de sonificação no processo de extração do selênio

A eficiência do processo de extração por ultra-som de selênio nas amostras de tecido muscular e hepático foi avaliada variando-se o tempo de extração e a potência ultra-sônica. Na etapa de moagem da amostra, procurou-se obter a menor granulometria possível, o que favorece a homogeneidade do analito no material sólido e evita possíveis erros associados à representatividade da amostra. Nessa etapa também foi evitada a manipulação excessiva das amostras, procurando-se evitar possíveis fontes de contaminação. Conforme já discutido na literatura, as ondas ultra-sônicas promovem a extração dos analitos da matriz devido à atuação destas sobre as moléculas orgânicas presentes na amostra, destruindo-as e provocando a quebra da ligação do metal com essas moléculas [8,13,19]. Dessa forma, inicialmente foram feitos experimentos de otimização do tempo de sonificação no processo de extração dos analitos das amostras. A Figura 1 mostra os resultados obtidos nesses experimentos.

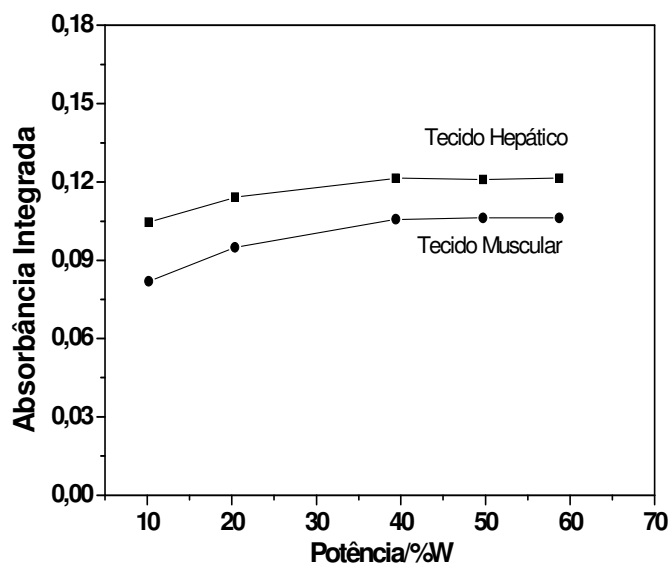


**Figura 1.** Influência do tempo de sonificação no processo de extração de selênio de amostras de tecido muscular e hepático de tilápia do Nilo. Condições Experimentais: Tempo de Sonificação – 5 ciclos de 10, 20, 40, 50 e 60 s; Potência utilizada – 136 W; Solução Extratora – Ácido clorídrico 0,10 mol L<sup>-1</sup>.

O aumento do tempo de sonificação provoca o aumento da temperatura do meio extrator. Normalmente, observa-se que temperaturas em torno de 50°C, a eficiência de extração é favorecida devido ao aumento do número de núcleos de cavitação acústica formado nas proximidades da superfície da fase sólida da suspensão (sistema sólido-líquido) [19]. No entanto, quando a temperatura do meio extrator se aproxima da temperatura de ebulição da fase líquida, ocorre decréscimo na eficiência da sonificação devido à diminuição da tensão superficial do meio e aumento da pressão de vapor dentro das microbolhas, o que provoca uma diminuição nas ondas de choque.<sup>23</sup> Existe, dessa forma, um tempo considerado ótimo de sonificação no processo de extração de metais de uma amostra sólida. Nesse tempo ocorre a cavitação acústica, ou o ciclo de formação, crescimento e colapso das microbolhas formadas pela propagação das ondas. Após o colapso das bolhas de cavitação, ocorre a liberação de grande quantidade de energia na microrregião próxima da superfície da fase sólida, provocando assim extração do íon metálico e em alguns casos até a dissolução do material sólido [13]. Analisando-se os gráficos apresentados na Figuras 1, observa-se que a partir de 5 ciclos de 40 segundos de agitação ultra-sônica (3,30 minutos), os sinais de absorbância medidos por GFAAS, permaneceram praticamente constantes e a temperatura medida no sistema sólido-líquido foi de 62 °C. Dessa forma, este tempo foi considerado eficiente no processo de extração do selênio.

### *3.2. Otimização da potência do ultra-som no processo de extração do selênio*

A intensidade do ultra-som transmitida ao meio está diretamente relacionada à amplitude da vibração da ponta do sonotrodo. Geralmente, um aumento na intensidade da potência favorecerá um aumento nos efeitos químicos provocados pela sonificação. A influência da amplitude do ultra-som na escala 20-60% da potência total de trabalho (340 W) é mostrada nos gráficos apresentados na Figura 2.

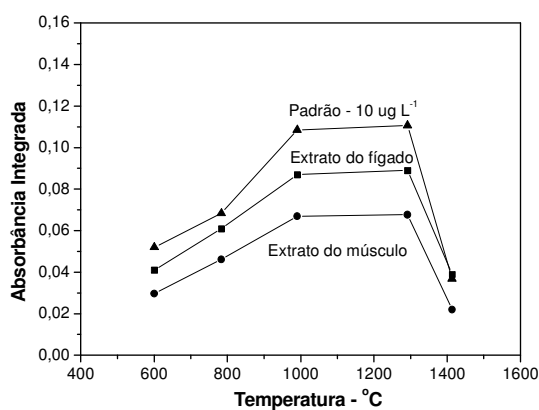


**Figura 2.** Influência da potência de sonificação no processo de extração de selênio de amostras de tecido muscular e hepático de tilápia do Nilo. Condições Experimentais: Tempo de Sonificação – 5 ciclos de 40 s; Solução Extratora – Ácido clorídrico  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ .

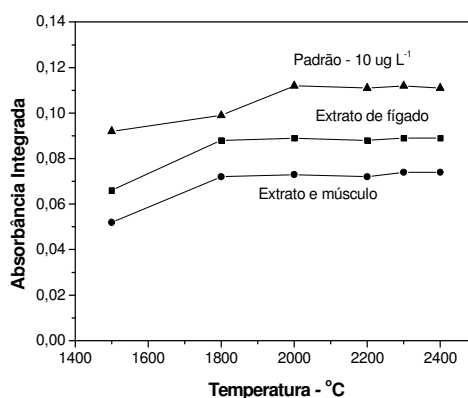
Quando se utiliza amplitude vibracional muito elevada, um grande número de bolhas de cavitação é gerado na solução, o que pode desfavorecer o crescimento e o colapso dessas bolhas, tendo como consequência uma diminuição da energia liberada através da fase líquida. Para o selênio, a eficiência da extração conforme mostra a Figura 2, aumenta com amplitude crescente de 68 a 136 W (20– 40%), permanecendo constante para os valores mais elevados de amplitude. Os resultados obtidos indicaram, dessa forma, que a eficiência máxima do processo de extração foi conseguida na escala de amplitude 136-272 W (40–60%) de potência. Optou-se então por utilizar a amplitude de 136 W (40%) de potência em todos os demais experimentos a serem desenvolvidos, pelo fato dessa potência provocar um menor aumento de temperatura da solução extratora  $62 \text{ }^\circ\text{C}$ , contra  $76$  e  $84 \text{ }^\circ\text{C}$  para as amplitudes de 204 W e 272 W (50 e 60%, respectivamente) de potência [10-13, 19].

### 3.3. Otimização das condições experimentais para determinação de selênio por GFAAS nos extratos ácidos obtidos no processo de extração

Curvas de pirólise e de atomização foram feitas para se determinar às temperaturas ótimas de pirólise e atomização do selênio nas soluções padrão e nos extratos ácidos das amostras de tecido muscular e hepático de tilápia do Nilo, obtidos no processo de extração por ultra-som, utilizando-se tubo de grafite recoberto internamente com carbeto de tungstênio. A influência das temperaturas de pirólise e atomização sobre sinal de absorvância obtido para o selênio em padrão contendo  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  e nos extratos ácidos das amostras de materiais biológicos, são mostradas nas Figuras 3 e 4.



**Figura 3.** Curvas de temperatura de pirólise dos extratos ácidos das amostras de tecido muscular e hepático de tilápia do Nilo e do padrão contendo  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Se.

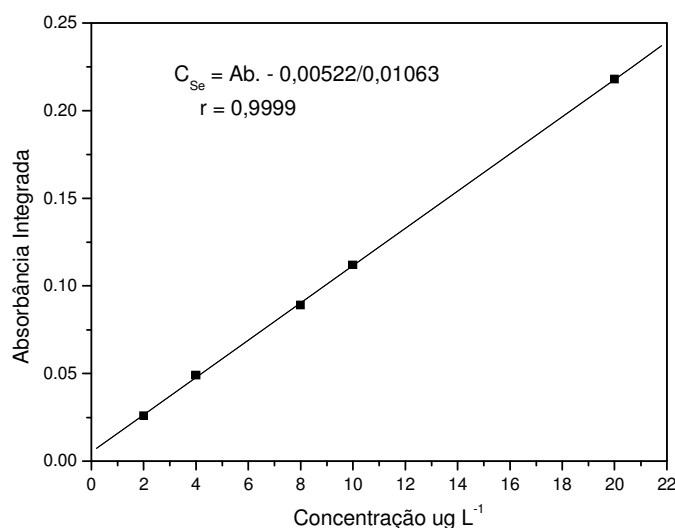


**Figura 4.** Curvas de temperatura de atomização dos extratos ácidos das amostras de tecido muscular e hepático de tilápia do Nilo e do padrão contendo  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Se.

A temperatura de pirólise de 1300 °C foi escolhida, conforme mostra a Figura 3, porque os sinais de absorvância obtidos para o Se permanecem constantes a partir de 1000 °C, sofrendo um rápido decréscimo a partir de 1300 °C. Todos os demais experimentos foram feitos utilizando essa temperatura na etapa de pirólise, porque até esse valor de temperatura o selênio apresentou-se termicamente estável. Em relação à temperatura de atomização (Figura 4), observa-se que os sinais de absorvância obtidos para o selênio são constantes a partir de 2000 °C. Considerando esse comportamento, a temperatura de atomização de 2300 °C foi selecionada para todos os demais experimentos, pois nessa temperatura houve uma maior linearidade da curva, além de melhor reprodutibilidade e repetibilidade de leituras, conforme resultados obtidos em outros trabalhos [7]. A boa estabilidade térmica do selênio obtida nesses experimentos demonstra a eficiência do modificador químico Pd(II) co-injetado junto com a amostra e do carvão de tungstênio que atuou como modificador permanente [20,21].

#### 3.4. Obtenção da curva analítica

Considerando-se os parâmetros físico-químicos otimizados (temperatura de pirólise e atomização), foi preparada curva analítica de selênio na faixa de concentração de 2 - 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A Figura 5 mostra a curva analítica obtida com a sua respectiva equação da reta.



**Figura 5.** Curva analítica obtida a partir de soluções padrão aquosas contendo 2, 4, 8, 10 e 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  de selênio.

Os valores obtidos nas leituras de absorvância dos padrões de selênio (n=3) apresentaram boa repetibilidade e reprodutibilidade (desvios padrão relativo menores que 2%), o que reforça a eficiência dos modificares químicos, Pd(II) e carbeto de tungstênio, na estabilização térmica do selênio durante e etapa pirólise e atomização do programa de aquecimento utilizado. As massas características calculadas em relação ao padrão de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de selênio foi de 45 pg e os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), calculados considerando o desvio padrão de 20 leituras obtidas em relação ao branco das soluções padrão e da inclinação da curva analítica ( $\text{LOD} = 3\sigma/\text{slope}$  e  $\text{LOQ} = 10\sigma/\text{slope}$ ), foram respectivamente 0,38 e  $0,92 \mu\text{g L}^{-1}$  de selênio. O tempo de vida útil do tubo de grafite foi equivalente a 626 queimas, que para o método proposto é aceitável quando comparada com outros métodos descritos na literatura, considerando-se a complexidade das matrizes biológicas [20-26].

### 3.5. Figuras de mérito do método de extração por ultra-som

Após a otimização dos parâmetros físico-químicos no processo de extração por ultra-som e de quantificação por GFAAS do selênio, o método proposto foi aplicado na determinação do analito em um pool de amostras de tecido muscular e hepático de tilápia do Nilo. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos utilizando-se a mineralização ácida das amostras (Tabela 3). A precisão e exatidão do método foram avaliadas por determinação de selênio em padrão certificado Bovine Muscle – NIST RM 8414, também apresentado na Tabela 3, utilizando os mesmos procedimentos de extração para a amostra, porém substituindo o volume de ácido por 3 mL.

**Tabela 3.** Resultados (n=3) obtidos nas determinações de selênio em um pool de amostras de tecido muscular e hepático de tilápia do Nilo e em padrão certificado Bovine Muscle – NIST RM 8414.

Amostras	Extração por ultra-som ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Mineralização ácida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Pool de tecido muscular	280,4±4,2	284,2±17,1
Pool de tecido hepático	592,3±6,7	589,5±35,2
Padrão certificado* NIST 8414	75,6±1,4	74,1±3,7

\*Valor Certificado –  $0,076\pm 0,010 \text{ mg kg}^{-1} = 76\pm 10 \mu\text{g kg}^{-1}$

Analisando-se os resultados obtidos utilizando-se a extração por ultra-som (Tabela 3), observa-se que estes são concordantes com os resultados obtidos utilizando-se a mineralização das amostras. Os desvios-padrão relativos calculados foram menores que 2% (contra 6% da mineralização ácida), mostrando que o método apresenta boa precisão das medidas. Em relação ao resultado determinado para padrão certificado, observa-se que além dos valores apresentarem desvios-padrão relativos menores que 2% (contra 5% da mineralização ácida), o que caracteriza uma boa repetibilidade entre as medidas, este se apresenta bem mais próximo do valor certificado do que o resultado obtido utilizando a mineralização ácida, comprovando assim a melhor exatidão do método de extração proposto.

#### **4. Conclusões**

Os resultados obtidos pelo método proposto para determinação de selênio em amostras de tecido muscular e hepático de tilápia do Nilo, utilizando-se extração por ultra-som, mostraram-se equivalentes aos obtidos pelo método utilizando-se a mineralização ácida das amostras. No entanto, deve-se destacar que a metodologia proposta diminui consideravelmente o tempo de análise, o que favorece a frequência analítica. Além disso, a exatidão e a precisão obtida nos valores das determinações de selênio foram melhores que da mineralização ácida das amostras.

#### **Referências**

- [1] L.R. McDowell, Minerals in animal and human nutrition, Academic Press, New York, 1992, pp.1-18.
- [2] R.M. Smith, Trace elements in human and animal nutrition, Academic Press, New York, 1987.
- [3] J.W. Hilton, The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish, *Aquaculture* 79 (1987) 223-244.
- [4] T. Watanabe, V. Kiron, S. Satoh, Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture* 151 (1997) 185–207.
- [5] G.F. Combs, S.B. Combs, The Role of Selenium in Nutrition, Academic Press, London, 1986, p. 180.

- [6] H.A. Poston, G.F. Combs, L. Leibovitz. Vitamin E and selenium inter-relations in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) gross, histological, and biochemical deficiency signs, J. Nutr. 106 (1976) 892-904.
- [7] F.A. Silva, R.C.F. Neves, L.G. Quintero-Pinto, C.C.F Padilha, S.M.A. Jorge, M.M. Barros, L.E. Pezzato, P.M. Padilha, Determination of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the bioavailability of this micronutrient in feed used in pisciculture, Chemosphere 68 (2007) 1542-1547.
- [8] A. Elik, Ultrasound assisted pseudo-digestion of street dust samples prior to determination by atomic absorption spectrometry, Talanta 66 (2005) 882-888.
- [9] T.J. Mason, J.P. Lorimer, Sonochemistry: Theory, applications and uses of ultrasound in Chemistry, Ellis Horwood: Chichester, 1988.
- [10] A. Francony, C. Pétrier, Sonochemical degradation of carbon tetrachloride in aqueous solution at two frequencies: 20 kHz and 500 kHz, Ultrason. Sonochem. 3 (1996) S77-S82.
- [11] C.C. Nascentes, M. Korn, M.A.Z. Arruda, A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables, Microchem. J. 69 (2001) 37-43.
- [12] J. Ruiz- Jiménez, J.L. Luque-Garcia, M.D. Luque de Castro, Dynamic ultrasound-assisted extraction of cadmium and lead from plants prior to electrothermal atomic absorption spectrometry, Anal. Chim. Acta 480 (2003) 231-237.
- [13] A. Elik, Ultrasonic-assisted leaching of trace metals from sediments as a function of pH, Talanta 71(2007) 790-794.
- [14] M.V.C. Sá, L.E. Pezzato, M.M. Barros, P.M. Padilha, Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles diets, Aquaculture 238 (2004) 385-401.
- [15] M.V.C. Sa, L.E. Pezzato, M.M. Barros, P.M. Padilha, Apparent absorption of zinc from supplemental inorganic and organic sources to Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles, J. World Aquacult. Soc. 36 (2005) 380-388.
- [16] M.V.C. Sa, L.E. Pezzato, M.M. Barros, P.M., Padilha, Relative bioavailability of zinc in supplemental inorganic and organic sources for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fingerlings, Aquacult. Nutr. 11 (2005) 273-285.
- [17] G.S. Gonçalves, L.E. Pezzato, P.M Padilha, M.M. Barros, Disponibilidade aparente do fósforo em alimentos vegetais e suplementação da enzima fitase para tilápia-do-nilo, Rev. Bras. Zootec. 36 (2007) 1473-1480.

- [18] F.A. Silva, C.C.F. Padilha, M.M. Barros, L.E. Pezzato, P.M. Padilha, Determination of chromium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the apparent digestibility of nutrients in feed used in pisciculture, *Talanta* 69 (2006) 1025-1030.
- [19] A.V. Filgueiras, J.L. Capelo, I. Lavilla, C. Bendicho, Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry, *Talanta* 53 (2000) 433-441.
- [20] C.R. Rosa, M. Moraes, J.A.G. Neto, J.A. Nóbrega, A.R.A. Nogueira, Effect of modifiers on thermal behaviour of Se in acid digestates and slurries of vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Food Chem.* 79 (2002) 517-523.
- [21] J.L. Fischer, C.J. Rademeyer, Kinetics selenium atomization in electrothermal atomization atomic absorption spectrometry (ETAAAS). Part 2: selenium with palladium modifiers, *Spectrochim. Acta, Part B* 53 (1998) 549-567.
- [22] P.C. Aleixo, J.A. Nóbrega, D.J. Santos, R.C.S. Muller, Determinação de selênio em água de coco e em leite de coco utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite, *Quim. Nova* 23 (2000) 310-312.
- [23] H. Minami, M. Yada, T. Yoshida, Q. Zhang, S. Inoue, I. Atsuya, Simultaneous direct determination of aluminum, calcium and iron in silicon carbide and silicon nitride powders by slurry-sampling graphite furnace AAS, *Anal. Sci.* 20 (2004) 455-459.
- [24] N.I. Millerihli, Advances in ultrasonic slurry graphite furnace absorption atomic spectrometry, *Fresen. J. Anal. Chem.* 345 (1993) 482-489.
- [25] C. Bendicho, M.T.C. Loos-Vollebregt, Solid sampling in electrothermal atomic absorption using commercial atomize, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 6 (1991) 353-374.
- [26] Y.Z. Liang, M. Li, Z. Rao, Nickel and strontium nitrates as modifier for determination of selenium in urine by zeeman platform graphite-furnace atomic absorption spectrometry, *Anal. Sci.* 12 (1996) 629-633.

### ANEXO III

#### Lista de Abreviaturas

**GFAAS:** Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite, do inglês, “*Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*”

**LOD:** Limite Óptico de Detecção

**LOQ:** Limite Óptico de Quantificação

**Pd (II):** Paládio

# *CAPÍTULO IV*

## **Implicações**

A metalômica é um novo campo de investigação que une estudos de proteínas com estudos de metais. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de protocolos analíticos para avaliação dessas metaloproteínas, principalmente em relação aos chamados micronutrientes metálicos, os quais apresentam faixa de essencialidade e toxicidade muito próximas, como o caso do selênio. Neste contexto, o presente trabalho mostra-se como pioneiro nos estudos metaloproteômicos em animais, mais especificamente os peixes. Assim, foi possível mapear o selênio em spots de proteínas de diferentes tecidos, bem como o desenvolvimento de um método alternativo para determinação de selênio em tecidos muscular e hepático, em substituição ao método de digestão ácida convencional, diminuindo a quantidade de resíduos tóxicos gerados para o ambiente.

Este trabalho servirá de alicerce para caracterização de proteínas em animais, mais especificamente em peixes, com a possibilidade de descobrimento de novas proteínas e possíveis descobertas de função das mesmas, trazendo contribuições significativas para a área de fisiologia,