

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

**Desenvolvimento de metodologias analíticas para estudos metaloproteômico do
cobre em plasma, tecido muscular e hepático da Tilápia do Nilo**

Renato de Cássio Ferreira Neves

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

BOTUCATU – SP
Junho – 2010

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

**Desenvolvimento de metodologias analíticas para estudos metaloproteômico do
cobre em plasma, tecido muscular e hepático da Tilápia do Nilo**

Renato de Cássio Ferreira Neves
Biólogo

ORIENTADOR: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

BOTUCATU – SP
Julho – 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Neves, Renato Cássio Ferreira.

Desenvolvimento de metodologias analíticas para estudos metaloproteômicos do cobre em plasma, tecido muscular e hepático da Tilápia do Nilo/ Renato de Cássio Ferreira Neves.-Botucatu,2010

Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Pedro de Magalhães Padilha

Assunto CAPES: 50701029

1. Tilápia (Peixe)
2. Eletroforese - Avaliação

Palavras-chave: ; 2D-PAGE; Espectrometria de absorção atômica; GFAAS;
Metaloproteínas: SR-XRF; Tilápia do Nilo

Dedico esta Tese de Doutorado
A minha família, esposa e filho,
aos meus familiares pelo apoio
e incentivo de sempre

Agradecimentos

“Dai-me senhor, a perseverança das ondas do mar que fazem de cada recua um ponto de partida para um novo avanço”

Aos professores do Departamento de Química e Bioquímica: José Pedro, Ana Maria, Giuseppina, Margarida, Gustavo, Júlio, Assunta, Válber.

Professor, Luis Edivaldo Pezzato, pelo apoio de sempre.

Ao professor em especial, em memória, Professor Ariovaldo, sempre incentivador da leitura, ‘Deve-se ler para fazer perguntas’

Aos Funcionários: Lourdes, Maria, Ivalde, Rafinha, Fabinho, Elaine.

Funcionários da Pós-Graduação, Carlo e Seila.

Meus queridos amigos do Departamento, Murilo ‘velho’, Felipe ‘Magrelo’, Paula Lima ‘Leitinho’, Barbara, ‘Grande Tonhão’, Paula Moraes, ‘Birrenta’, Guilherme, ‘Floral’

Minhas primas(o): Carla, Henrique, Beatriz, Juliana

Minha Esposa pela paciência e compreensão, em que às vezes fiquei ausente, Te amo

A minha querida vóvo, dona Ana Gertrudes de Magalhães, sempre preocupada comigo,

Para minha Mãe; Ser mãe é desfibrar, fibra por fibra, o coração
dos filhos

“O que sabemos é uma gota, o que não sabemos é um oceano”

Isaac Newton

“O estudo, a busca da verdade e da beleza são domínios em que
nos é consentido sermos crianças por toda a vida”

Albert Einstein

Este verso vai para meu Amigo e Orientador, Pedro de Magalhães
Padilha

‘A sabedoria nasce menos da inteligência e mais do coração’ que
em muitos casos, sempre agiu pelo coração, obrigado pelo
aprendizado de hoje e sempre, por acreditar em mim.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1.INTRODUÇÃO	01
1.1. Considerações iniciais e justificativas	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	02
2.1. Tilápia do Nilo	02
2.2. Cobre	04
2.2.1. Deficiência.....	05
2.2.2. Toxicidade.....	06
2.2.3. Bioacumulação	07
2.2.4. Absorção.....	07
2.2.5. Distribuição.....	08
2.2.6. Essencialidade.....	09
2.3. Proteínas e Complexos Protéicos	11
2.4. Proteoma.....	13
2.5. Metaloproteínas.....	14
2.6. Cobre-Proteína.....	17
2.7. Eletroforese Bidimensional em gel de Poliacrilamida.....	18
2.7.1. Preparo das Amostras.....	22
2.7.2. Solubilização das Proteínas.....	23

2.7.3. Utilização dos detergentes Sulfactantes.....	24
2.8. Detecção das Proteínas separadas por 2D-Page.....	25
2.8.1. Tratamento de imagens dos géis.....	26
2.9. Fluorescência de Raio-X (XRF).....	27
2.9.1. Fundamentos da Fluorescência de Raio-X.....	28
2.9.2. Excitação dos Elementos.....	29
2.9.3 Espalhamento Compton.....	30
2.9.4. Fluorescência de Radiação Síncroton	30
2.10. Espectrometria de Absorção Atômica.....	32
2.11. Extração dos íons metálicos por ultra-som	36
3. Referências Bibliográfica.....	37
CAPÍTULO II	
Resumo	53
Abstract.....	54
1.Introdução.....	55
2. Material e métodos	57
2.1. Reagentes e soluções.....	57
2.2. Coleta e preparo das amostras	57
2.3. Extração do cobre	58
2.4. Equipamentos.....	58
2.5. Determinação da concentração de cobre por GFAAS.....	59

2.5.1. Preparo do tubo de grafite recoberto internamente com carbeto de tungstênio.....	59
2.5.2. Preparo da curva analítica.....	60
2.5.3. Preparo dos extratos ácidos para injeção no tubo de grafite.....	60
2.5.4. Procedimentos analíticos.....	60
3. Resultados e discussão.....	61
3.1. Otimização do tempo e da potencia de sonicação na extração do cobre.....	61
3.2.Otimização das condições experimentais para determinação de cobre por GFAAS	62
3.3. Obtenção da curva analítica.....	65
3.3. Concentração de cobre nas amostras de tecidos de tilápia do Nilo.....	66
4. Conclusões.....	69
5. Referências	70
 CAPÍTULO III	
Resumo	77
Abstract.....	78
1.Introdução.....	79
2. Experimental	81
2.1. Equipamentos.....	81
2.2. Reagentes e Soluções.....	81
2.3. Coleta e preparo das amostras.....	82
2.4. Preparação das amostras para eletroforese.....	83
2.5. Determinação da concentração das proteínas totais.....	84
2.6. Separações eletroforéticas.....	84
2.7. Determinação qualitativa de cobre por SRXRF nos spots protéicos.....	87

2.8. Determinação quantitativa de cobre por GFAAS nos spots protéicos.....	87
3. Resultados e discussão.....	88
3.1. Determinação da concentração de proteínas totais nas amostras.....	88
3.2. Otimização das separações eletroforéticas.....	89
3.3. Avaliação qualitativa de cobre por SR-XRF nos spots protéicos.....	92
3.4. Avaliação quantitativa de cobre nos spots protéicos das amostras.....	97
4. Conclusões.....	99
5. Capítulo IV.....	103
1. Implicações	104
2. Anexo I.....	105
3. Anexo II.....	106
4. Anexo III	107

LISTA DE ABREVIATURAS

1D	Uma Dimensão
1D – PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em uma dimensão
2D	Duas Dimensões
2D – PAGE	Eletroforese em Gel Poliacrilamida em duas dimensões
IEF	Focalização Isoelétrica
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
M	Massa Molar

PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
pI	Ponto Isoelétrico
SDS -PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
DTT	1,4-ditiotreitol
Spot	Banda 2D de proteínas
SR	Radiação Síncroton
SRXRF	Fluorencência de Raios-X com Radiação Síncroton
kDa	QuiloDalton ($1,661 \times 10^{-21}$ g)
TEMED	N,N',N,N'-tetrametiletenodiamina
CHAPS	3-[(3- cloroamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
PMSF	Felimetilsulfonil Fluoreto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
MDa	Mega Dalton

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Concentração média de cobre nos fluidos gastrintestinais e secreção diária no homem.....	08
Tabela 2. Principais cuproenzimas com atividade oxidativa e redutora no homem.....	10
Tabela 3. Metaloenzimas típicas e suas funções biológicas.....	15
Tabela 4. Requisitos instrumentais e operacionais necessários para atender as condições	STPF e os resultados

obtidos.....	33
--------------	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Resultados (n=3) obtidos nas determinações de cobre em amostras de filé e tecido hepático de tilápia do Nilo e em padrão certificado Lake Michigan Fish Tissue – NIST SRM 1947.....	68
--	----

CAPÍTULO III

Tabela 1. Massa molar (M) e ponto isoelétrico (pI) de proteínas do pool de amostras de plasma de tilápia do Nilo separadas por 2D PAGE que apresentaram cobre ligados em suas estruturas.....	96
--	----

Tabela 2: Concentração de cobre e estimativa das massas de proteínas determinadas nos spots protéicos das amostras de plasma, nos quais foi detectada a presença desse elemento por SRXRF.....	97
---	----

Tabela 3. Estimativa do número de moléculas de proteínas contendo cobre ligado e do número de átomos de cobre por spot protéico.....	98
---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Um modelo esquemático do sistema biológico, mostrando a relações entre genômica, proteômica, metabolômica e metalômica, onde os íons metálicos são mostrados.....	16
--	----

Figura 2. Mapa proteômico padrão. As setas azuis apontam os “spots” no gel. Setas pretas indicam um aumento gradativo tanto de ponto isoelétrico (eixo X), quanto de Massa molar (eixo Y)..... 20

Figura 3. Representação de como a utilização de strips com uma faixa estreita de pH pode otimizar a visualização dos spots..... 22

Figura 4. Separação eletroforética 2D de glóbulos vermelhos humanos proteínas de membrana, do plasma (150µg) foram carregados em gel 2D. A primeira dimensão é um gradiente de pH 4-8 linear, com a segunda dimensão de um gel de acrilamida 10%. Algumas proteínas identificadas são indicadas: As proteínas são extraídas e focada em uma solução contendo uréia 7M, tiouréia 2M, 20 mM DTT, 0,4% sendo que em A: 4% CHAPS, B: 2% Triton X-100, C: 2%, Brij56: D: 2% SDS, 2%ASB14..... 24

Figura 5. Produção das radiações características..... 30

CAPÍTULO II

Figura 1. Curvas de temperatura de pirólise dos extratos ácidos das amostras de filé e tecido hepático de tilápia do Nilo e do padrão contendo 5,00 µg L-1 de cobre..... 62

Figura 2. Curvas de temperatura de atomização dos extratos ácidos das amostras de tecido muscular e hepático de tilápia do Nilo e do padrão contendo 5,00 µg L-1 de cobre..... 63

Figura 3. Curva analítica obtida a partir de soluções padrão aquosos contendo 2,00, 4,00, 6,00, 8,00 e 10,00 µg L-1 de cobre..... 64

CAPÍTULO III

Figura 1. Gel de poliacrilamida 10% (m/v) de plasma de tilápia do Nilo com pI situado na faixa de 3 a 10 e massa molar de proteína na faixa de 20,1 a 97,0 kDa.....	88
--	----

Figura 2. Gel de poliacrilamida 12% (m/v) de músculo de tilápia do Nilo com pI situado na faixa de 3 a 10 e massa molar de proteína na faixa de 14,4 a 97,0 kDa.....	89
---	----

Figura 3. Gel de poliacrilamida 12% (m/v) de fígado de tilápia do Nilo com pI situado na faixa de 3 a 10 e massa molar de proteína na faixa de 14,4 a 97,0 kDa.....	90
--	----

Figura 4. Espectros de fluorescência de raios-X com radiação Síncrotron obtidos para os spots protéicos 5, 12 e 16 de plasma de tilápia do Nilo.....	92
---	----

Figura 5. Espectros de fluorescência de raios-X com radiação Síncrotron obtidos para os spots protéicos 4 e 13 de músculo de tilápia do Nilo.....	93
--	----

Figura 6. Espectros de fluorescência de raios-X com radiação Síncrotron obtidos para os spots protéicos 6 e 21 de fígado de tilápia do Nilo.....	94
---	----

1. Introdução

1.1. Considerações iniciais e justificativas

A pesca e a aquicultura são consideradas, pela Organização das Nações Unidas, atividades estratégicas para a segurança alimentar sustentável do planeta, pois são capazes de fornecer alimento protéico de alta qualidade e gerar empregos tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento.¹ Nas últimas décadas, a piscicultura sofreu constantes transformações, tendo se consolidado como importante atividade no agronegócio brasileiro, substituindo em parte o peixe proveniente da pesca extrativa.¹⁻³

Dentre as espécies ícticas criadas em ambientes tropicais de água doce, destaca-se a tilápia do Nilo, com uma produção mundial que ultrapassa cerca de 2 milhões de toneladas. No Brasil.¹ Desse modo, o desenvolvimento de mais pesquisas com a tilápia nas áreas de fisiologia, nutrição e expressão gênicas, principalmente relacionadas aos nutrientes metálicos, componentes estruturais de muitos processos vitais e que funcionam como sinalizadores ou catalisadores, torna-se fundamental.

O estudo de sistemas que contêm metaloproteínas ou proteínas ligadas a metais pode fornecer informações a respeito de diversas situações, tais como: estresse, biomarcadores de estudos sobre alimentação, rações com antibióticos ou outros tipos de fármacos. A concentração total desses íons metálicos em amostras biológicas ou ambientais tem sido 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 microminerais, no caso da nutrição animal, estão longe de serem bem entendidos. Isso porque a maioria das matrizes de interesse biológico, como fluidos corporais, tecidos e alimentos, por exemplo, apresentam-se na forma de complexos de alta estabilidade e são, portanto, de difícil análise. Assim, as conclusões sobre a importância do metal para as biomoléculas, mais especificamente as proteínas, são muitas vezes fragmentadas.⁴

A compreensão dos papéis que envolvem metais e proteínas depende da qualidade da informação obtida após a análise metal-proteína. Considerando o exposto, a determinação de íons metálicos ligados às proteínas, mais especificamente de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), poderá trazer informações importantes para a área de fisiologia, genética e nutrição de peixes.⁵

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*)

No Brasil, durante as últimas décadas, a piscicultura sofreu constantes transformações, consolidando-se como importante atividade no agronegócio brasileiro e substituindo, em parte, o peixe proveniente da pesca extrativa.¹⁻³

O potencial para esse crescimento justifica-se, principalmente, pelas características naturais do país relacionadas à abundância de recursos hídricos, 5.5 milhões de hectares de grandes reservatórios naturais e artificiais, clima favorável e disponibilidade de grãos para o processamento de rações balanceadas.^{1,6} Em 2005, o Brasil ocupava o 18º lugar no ranking mundial de produção aquícola (3.689.523,50 t), e o 12º em termos de receitas geradas, com 1,4% do total, sendo o segundo país em importância na produção aquícola na América do Sul, logo após o Chile.² As principais espécies de peixes de água doce criadas representam 87% da produção nacional, que em ordem decrescente, são: tilápias (71.253,50 t), carpas (45.831,50 t), tambaqui (26.672,00 t), tambacu (10.989,50 t) e pacu (10.625,50 t).⁷

No grupo das tilápias (*Oreochromis* spp), tem destaque a tilápia-do-Nilo (*O. niloticus*). Em termos mundiais, é o segundo peixe mais produzido, precedido somente pela produção de carpas (*Cyprinus carpio*).⁸

As pesquisas visando a criação da tilápia, originária da África, tiveram início no Congo Belga (atual Zaire) no começo do século XIX. A partir de 1924, sua criação foi intensificada no Quênia e sua expansão para outras partes do mundo se deu a partir da Malásia.⁹ No Brasil, foi introduzida em 1971 por intermédio do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) nos açudes do Nordeste e difundiu-se para todo o país.¹⁰ A criação de espécies exóticas no Brasil (tilápia, carpa, truta e catfish americano) mostra uma grande vantagem sobre as nativas em relação ao conhecimento técnico e científico disponível tanto no campo da biologia quanto no de tecnologias de

produção. Além disso, a tilápia do Nilo encontra-se amplamente disseminada nas regiões tropicais e subtropicais, como em Israel, no Sudeste Asiático (Indonésia, Filipinas e Formosa) e no Continente Americano (EUA, México, Panamá e toda a América do Sul).^{16,17} É uma espécie tropical, cuja temperatura ideal de desenvolvimento varia entre 25 e 30°C. Seu crescimento é afetado em temperaturas abaixo de 15°C e não resiste a temperaturas por volta de 9°C.¹⁷⁻¹⁹ Entre as espécies de água doce e de hábito alimentar onívoro, a tilápia destaca-se por diversos fatores: precocidade; rápido crescimento; alimentação por itens básicos da cadeia trófica; aceitação de grande variedade de alimentos; resposta com a mesma eficiência à ingestão de proteínas de origem vegetal e animal; capacidade fisiológica de adaptar-se em diferentes ambientes e sistemas de produção; e resistência a doenças, densidades de estocagem elevadas e baixas concentração de oxigênio dissolvido.^{20,21}

Entre outras características, a tilápia apresenta: carne saborosa com baixo teor de gordura (0,9 g Kg⁻¹ de carne) e de calorias (117 kcal g Kg⁻¹ de carne), alto rendimento de filé (35 a 40%) e ausência de espinhos em forma de “Y” (mioceptos), o que a torna apropriada para industrialização. Devido à qualidade de sua carne, apreciada em nível mundial, e à facilidade para a criação em diferentes sistemas de produção, apresenta elevado valor comercial, principalmente em países desenvolvidos.^{2,10}

A piscicultura em tanques-rede com tilápia (*Oreochromis* spp.) também vem ocupando lugar de destaque por esta ser uma espécie precoce e apresentar um bom desempenho em sistemas intensivos de produção.¹¹ O sistema de criação de peixes em tanques-rede ou gaiolas é classificado como sistema intensivo de produção com alta e contínua renovação de água, que promove a remoção dos metabólitos e dejetos produzidos pelos peixes e mantém a qualidade da água.^{12,13} Trata-se de excelente alternativa para o aproveitamento de corpos d’água inexplorados pela piscicultura convencional e de ambientes aquáticos existentes, dispensando o desmatamento de grandes áreas e evitando problemas de erosão e assoreamento.^{12,14}

Com relação ao manejo alimentar, deve-se considerar que a ração fornecida aos peixes deva atender às exigências nutricionais quanto à proteína, energia, lipídios, vitaminas e minerais para promover o bom crescimento dos animais. As dietas comerciais para tilápia possuem de 24,0 a 56,0% de proteína bruta, o que implica em elevada participação de ingredientes protéicos, que correspondem a mais de 50,0% de seu custo.¹² As proteínas e os minerais correspondem aos nutrientes de máxima

importância para o animal em relação ao seu crescimento, e o perfil dos aminoácidos é decisivo para a qualidade, determinando seu valor como componente da dieta.¹⁵

2.2. Cobre

Assim como outros nutrientes metálicos, o cobre é um mineral essencial na nutrição dos peixes. Tanto a deficiência quanto o excesso desse micronutriente metálico pode causar alterações nas funções fisiológicas e na resposta imunológica, aumentando a susceptibilidade do animal a infecções. Em nível adequado, suprimento de cobre na ração é indispensável ao normal funcionamento do organismo e, conseqüentemente, do desenvolvimento do animal.⁶

Possui importantes funções no organismo dos peixes, sendo necessário no metabolismo de vários nutrientes e como constituinte de diversas enzimas.^{6,22} Destacam-se como exemplos de sua importância a participação como cofator para, entre outras, a enzima ALA-desidrogenase, que participa na síntese do complexo heme em sua incorporação na hemoglobina.²³ Esse elemento é indiretamente responsável pela formação do colágeno e da elastina, pela conversão da tirosina em melanina, pela destruição de ânions superóxido, que são espécies reativas do oxigênio e potencialmente destrutivos para as células. O excesso desse mineral pode causar efeitos nocivos ao organismo, como intoxicação hepática e formação de complexos insolúveis junto com outros elementos metálicos, resultando na não absorção do cobre.⁶

O cobre participa de vários processos metabólicos, sendo constituinte de diversas enzimas do organismos vivos (mamíferos, peixes e entre outros). As mais conhecidas são: a superóxido dismutase (SOD), que auxilia na defesa contra os radicais livres; a tirosinase; e a dopamina b hidroxilase. Junto com o zinco, o cobre também faz parte da enzima superóxido dismutase citoplasmático, que participa do metabolismo dos radicais livres. Por esse motivo, um dos indicadores da deficiência de cobre é o aumento na produção de radicais livres. No entanto, por ser um elemento amplamente distribuído nos alimentos, praticamente não se observa a deficiência de cobre na nutrição animal. A deficiência desse elemento, em casos raros dentro da nutrição animal, pode estar relacionada a um excesso de zinco, manganês e molibdênio, os quais disputam com o cobre pelos sítios de absorção do mesmo.

A presença de elementos em baixas concentrações como chumbo, mercúrio e cádmio na dieta alimentar do animal também dificulta a absorção do cobre. A baixa

concentração de cobre em estágios mais avançados causa anemia microcítica, que é resistente ao tratamento habitual com ferro e pode causar também danos aos vasos sangüíneos.⁶

2.2.1. Deficiência

O cobre é amplamente distribuído em alimentos e no ambiente aquático, portanto, sua deficiência poderia ocorrer em peixes sob condições extremas. A deficiência de cobre é bem reconhecida em animais domésticos, e os sintomas incluem: anemia, doenças ósseas, desmielinização da medula espinhal, fibrose do miocárdio, distúrbios gastrintestinais e ruptura da aorta.²⁴

É um elemento essencial para toda biota, e estudos mostram que a deficiência deste micronutriente afeta o crescimento de animais e plantas. Para satisfazer sua demanda metabólica interna todas as espécies de um habitat estão adaptadas às concentrações dos elementos essenciais naturalmente presentes. Desse modo, o cobre pode ser tóxico em elevadas concentrações, mas, em concentrações muito baixas, pode ser limitante ou causar sinais de deficiência.²⁵

Como mencionado anteriormente, o cobre é um micronutriente essencial, e está incorporado a um grande numero de enzimas e proteínas estruturais. Como outros metais, desempenha papel importante na regulação da expressão gênica, e vários estudos demonstram a existência de fatores de transcrição regulados pelo cobre. O mecanismo de regulação transcricional se deve à ligação do cobre aos promotores de metalotioneína, mais precisamente a composto que respondem a metais.²⁶ A necessidade de cobre nos vários órgãos ou nos sistemas do organismo é regulada por mecanismos de controle homeostáticos. A toxicidade ocorre quando tais mecanismos de controle dentro de um determinado compartimento são sobrecarregados e/ou quando os mecanismos de reparo celular são destruídos.²⁷

2.2.2. Toxicidade

A toxicidade do cobre no ambiente aquático está intimamente relacionada à forma livre do metal no meio e ao tempo de exposição sobre os organismos.²⁸ O cobre pode se apresentar sob diversas formas tóxicas, como CuCO_3 , $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})^{+2}$, CuOH^+ e Cu^{+2} , sendo esta última considerada a mais tóxica. Nos peixes, no entanto, antes de ser

transportado através das brânquias, o Cu^{+2} (íon cúprico) é aparentemente reduzido a Cu^{+} (íon cuproso), sugerindo que esta forma seria a verdadeira responsável pelo efeito tóxico do metal.²⁹

Os peixes podem acumular o cobre em diversos órgãos e tecidos de através da água, ou por meio de alimentos, sendo que acúmulo pode resultar em alterações nos processos fisiológicos e bioquímicos do organismo.^{30, 31}

As brânquias são o órgão alvo na toxicidade do cobre para os peixes, devido a sua extensa área de superfície em contato direto com o ambiente aquático.³² O cobre causa alterações nos mecanismos de regulação iônica: inicia-se com uma rápida diminuição nos eletrólitos plasmáticos, devido à inibição do influxo de Na^{+} , e, resulta conseqüentemente, na inibição da enzima $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase nas brânquias.^{33,34} Em concentrações mais elevadas, o cobre também atua na permeabilidade das junções paracelulares, ao causar o deslocamento do cálcio (principal íon responsável pelo controle da permeabilidade branquial), favorecendo o efluxo dos íons. A inibição do influxo de íons Na^{+} e Cl^{-} branquiais, juntamente com o aumento do efluxo de Na^{+} , ocasiona a diminuição desses íons plasmáticos. Como conseqüência, a água presente no plasma flui para os tecidos, tornando o sangue concentrado, o que é agravado pela liberação de eritrócitos por contração do baço. A alta viscosidade sanguínea causa falhas no sistema circulatório do peixe, podendo levá-lo à morte.³⁵

Além dos distúrbios iônicos e hematológicos vistos anteriormente, peixes expostos ao cobre podem apresentar diversas alterações, tais como danos histopatológicos nas brânquias e fígado (alterações no sistema imunológico e efeitos citotóxicos e genotóxicos). Assim, pode-se observar que a exposição ao cobre resulta em sérios efeitos sobre peixes.^{36,37,38,39}

2.2.3. Bioacumulação

O cobre é um elemento essencial para toda a biota. Foi identificado em plantas e animais no século XIX e proclamado como co-fator biológico no século XX. Estudos nutricionais subseqüentes demonstraram que o cobre e outros metais são necessários para o crescimento ótimo de plantas e animais.^{40,41} Para satisfazer sua demanda metabólica interna, todas as espécies de um *habitat* estão adaptadas às concentrações dos elementos essenciais naturalmente presentes. Assim, as concentrações de nenhum efeito observado (CNEO) obtidas em laboratório, significativamente inferiores aos

valores de referência do cobre, requerem atenção por violarem os princípios evolucionários. Isto pode ser explicado pelo conceito de Concentração Ótima dos Elementos Essenciais (COEE).⁴¹ A bioacumulação é definida como a rede de absorção do metais pelos microrganismos, plantas ou animais a partir de seu entorno (água, sedimento, solo e dieta). É afetada pela disponibilidade da substância, que pode ser influenciada pela espécie do metal, bem como por outras propriedades físico-químicas. Quanto maior a disponibilidade, maior o potencial. O cobre apresenta, em geral, disponibilidade limitada no meio ambiente. A extensão da bioacumulação é determinada pela espécie do metal em associação às diferenças na absorção e velocidade de excreção entre plantas e animais.^{41,42}

2.2.4. Absorção

Os alimentos contribuem muito mais com a quantidade de cobre consumida do que a água. Nos mamíferos, o cobre pode ser absorvido do estômago ao intestino delgado distal, mas somente uma pequena fração do cobre ingerido é solubilizada no estômago, o que dificulta a sua absorção neste local. Estudos realizados com roedores demonstraram que, durante o período de lactação e desmame, a absorção intestinal destes roedores ocorre em grande parte por difusão, e na maturidade, tanto ratos como camundongos apresentam um transporte ativo saturável para o metal.⁴³

2.2.5. Distribuição

O cobre absorvido pela mucosa intestinal é transportado para o fígado pelo sistema porta hepático, ligado principalmente à albumina.⁴⁴ Considera-se que a dose diária ingerida encontra-se entre 0,6 a 1,6 mg/dia, sendo cerca de 50% absorvidos. No entanto, esta absorção ocorre no contexto de reabsorção do metal, a partir de fluidos secretados no trato digestivo, de 3 a 5 vezes maior. Provavelmente mais de 4,5 mg de Cu são secretados no trato gastrointestinal todos os dias, sendo a maior parte reabsorvida. A tabela 1 apresenta a concentração média de cobre nos fluidos gastrintestinais.

Tabela 1 – Concentração média de cobre nos fluidos gastrintestinais e secreção diária no homem. ⁴⁴

Fluido	Concentração de Cu(mg L ⁻¹)	Volume(μl)	Total Cu (μg/dia)
Salivar	0,22±0,08	1.500	330
Gástrico	0,39±0,02	2.500	975
Biliar	4,0±1,90	625	2.500
Pancreático	0,34±0,9	1.500	500-1.300
Duodenal	0,17±0,05	1.500	250
Total			4.500-5.300

No fígado, o cobre é primariamente incorporado à fração solúvel, associando-se no citosol a:

- substâncias endógenas de alta massa molar não identificadas completamente,
- substâncias de massa molar intermediária (30 kDa), provavelmente superóxido dismutase,
- substâncias de baixo peso molar (10 kDa) compostas principalmente por metalotioneína.

Em galinhas e outros animais, o cobre hepático incorpora-se inicialmente a superóxido dismutase e a metalotioneína. A quantidade incorporada a cada um desses componentes varia com a quantidade de cobre absorvida e com a via de introdução. O transporte do fígado para os tecidos periféricos – um dos tópicos mais discutidos na biotransformação do cobre – parece envolver ceruloplasmina, albumina, transcuroína ou aminoácidos. Não se pode afirmar, entretanto, que o transporte de cobre exija obrigatoriamente uma dessas proteínas. Tecidos periféricos humanos com baixo ou nenhum teor de ceruloplasmina não são deficientes em cobre. ⁴¹

A ceruloplasmina é sintetizada no fígado e rins, apresentando de seis a oito átomos de Cu (II) fortemente ligados a ela. Além de transportar cobre, apresenta atividade ferro-oxidativa, facilitando a oxidação do Fe²⁺ a Fe³⁺. Acredita-se que a ceruloplasmina se ligue a receptores de membrana nas células de outros tecidos, os quais induzem uma alteração conformacional na proteína, promovendo a liberação dos átomos de cobre. Os níveis plasmáticos de ceruloplasmina são regulados pelo fígado. Em condições normais, as concentrações mais elevadas de cobre são encontradas na

bile, fígado, cérebro, coração e rins.⁴⁵ Do total de cobre absorvido, cerca de 20% encontra-se no fígado, único local de armazenamento de onde o cobre pode ser mobilizado no caso de deficiência, 40% está presente nos músculos e cerca de 20% no cérebro. Os tecidos conectivos, sangue e rins, apresentam cada um, 8% da dose interna do metal.⁴¹ Os teores de cobre em indivíduo adulto normal encontram-se entre 18 e 45 de Cu mg g⁻¹ de peso seco.⁴⁵

2.2.6. Essencialidade

Até 1928 sabia-se que o cobre era constituinte da hemocianina – pigmento responsável pelo transporte de oxigênio em invertebrados. Após essa data, foi reconhecido como elemento essencial para os vertebrados, quando se demonstrou que a anemia de ratos alimentados somente com leite podia ser corrigida pela adição de cinzas de origem animal e vegetal que continham sulfeto de cobre.²⁶ A essencialidade desse metal deve-se a sua incorporação a um grande número de enzimas e proteínas estruturais. O papel do cobre nas atividades enzimáticas de óxido/redução se deve à sua habilidade em funcionar como um elétron intermediário de transferência. Em alguns processos é requisitado como co-fator, em outros como componente alostérico, conferindo estrutura apropriada para a ação catalítica. É o principal componente do centro catalítico de diversas enzimas redox e sua presença é essencial para processos fisiológicos normais, como respiração celular, síntese de melanina, biossíntese de tecido conectivo, defesa contra radicais livres e metabolismo de ferro intracelular na tabela 2.

Tabela 2 – Principais cuproenzimas com atividade oxidativa e redutora no homem²⁶

Enzima	Função
Citocromo-c oxidase	Transporte de elétrons, oxidase terminal
Superóxido dismutase	Destruição do radical superóxido, dismutação
Catecol oxidase	Síntese de melanina
Lisil oxidase	Colágeno, elastina
Ceruplasmina	Transporte de cobre, oxidação (ferroxidase)
Amino oxidases	Desaminação de grupo aminas primárias
Dopamina-β-monoxígenas	Síntese de noropinefrina,
Peptidilglicina monoxígenas	α-amidação de neuropeptídeos
Cromoproteínas	Grupo prostético, hemoglobina, hemocianina e citocromos

A formação de hemoglobina requer a essencialidade do cobre para a utilização de ferro na maturação de neutrófilos.⁴¹

O excesso de cobre é sequestrado por moléculas de metalotioneínas ricas em cisteína, fitoquelatinas e sulfetos. O radical sulfidríla da cisteína nos peptídeos e proteínas funciona como um sítio de ligação para os íons metálicos. As cisteínas das metalotioneínas correspondem a 20-30% dos aminoácidos e estão arranjadas em seqüências repetitivas. A glutatona também apresenta cisteína em sua seqüência.⁴⁶

As metalotioneínas são encontradas em várias formas nas bactérias, fungos, plantas e animais. Nos mamíferos, a proteína apresenta 62 aminoácidos e se liga a átomos de Zn (II), Cd (II) e Cu (II). A síntese de metalotioneína é regulada transcricionalmente através dos cinco elementos de regulação de metais (MREs), que diferem com a espécie.⁴⁶

As bombas de ATPase, além de estarem envolvidas na movimentação e translocação de íons como H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{++} , também estão envolvidas com alguns íons metálicos, como o cobre. As bombas que translocam metais estão categorizadas como tipo fósforo na família das ATPases. Origina-se da fosforilação covalente do resíduo de ácido aspártico, que é parte do ciclo de reação. A Menkes translocase ATPase está intimamente envolvida com a transferência e metabolismo de íons cobre. Defeitos neste tipo de bomba (fósforo) levam a uma deficiência fatal de cobre chamada síndrome de Menkes. A composição e seqüência do ligante do metal na ATPase de Menkes difere da metalotioneína. Esta proteína, geralmente no estado inativo, na exposição ao cobre adota conformação quaternária, permitindo o acesso ao sítio de fosforilação e iniciando a translocação do metal.⁴⁶

O cobre, quando em excesso, promove as seguintes reações adversas:

- deslocamento do metal de seus sítios de ligação resultando em alterações nas membranas, como despolarização e dano dos receptores ou moléculas transportadoras;
- ligação do cobre a macromoléculas, como DNA ou enzimas contendo grupamentos sulfidrílas, carboxilas ou imidazólicos, resultando em dano protéico, alterações oxidativas do DNA e, conseqüentemente, alterações funcionais decorrentes do grande número de enzimas dependentes de cobre;
- dano celular devido à produção de oxirradicais pela reação de Fenton:



A produção excessiva de tais radicais iniciará a cascata de reações de oxirredução (estresse oxidativo) levando à perda da integridade celular. Este dano inclui aumento dos níveis de cálcio citosólico, depleção de ATP, oxidação do grupo tiol, lipoperoxidação, dano de DNA e de organelas críticas como mitocôndria e lisossomos.⁴¹

2.3. Proteínas e Complexos Protéicos

Proteínas constituem um dos tipos de macromoléculas biológicas mais abundantes, versáteis e complexas. Sua complexidade se deve ao fato de que podem ser constituídas por diferentes seqüências de aminoácidos que podem ou não estar modificados, além de apresentarem uma ampla faixa de tamanho (variando de alguns poucos kDa a alguns MDa) e estruturas. Em decorrência dessa diversidade, são atribuídas a essas macromoléculas as mais diversas funções, tais como catálise (enzimas em geral), transporte (desde moléculas simples como O₂ até outras proteínas), estrutura, defesa (anticorpos), entre outras.³⁸ Com o fim do seqüenciamento de genomas de inúmeros organismos ao longo das últimas duas décadas, foi possível a obtenção de seqüências de um grande número de proteínas, muitas das quais eram desconhecidas até o momento. A informação contida na seqüência desses genes é fundamental na caracterização evolucionária e funcional de genes correlatos assim como na identificação de produtos genéticos envolvidos em doenças. Por outro lado, o conhecimento somente da seqüência primária das proteínas não é suficiente.

Para a caracterização dos mecanismos bioquímicos fundamentais, são necessários estudos sobre as suas funções e como elas são exercidas.^{39,40} Assim, interpretações dos mecanismos de conhecimento da estrutura espacial dessas macromoléculas dependem de avanços na ação de novos fármacos^{41,42}

Uma das principais características das proteínas é que muitas de suas funções celulares tais como replicação de DNA, transcrição, tradução, remoção, secreção e controle de ciclo celular não são realizados individualmente, mas na forma de complexos protéicos, que podem variar desde pequenos oligômeros (dímeros, trímeros) a complexos formados por dezenas de cadeias polipeptídicas e com a presença de ácidos nucleicos e co-fatores.⁴³⁻⁵⁰ Isso pode ser resultado tanto de uma determinada mudança conformacional induzida pelo ligante quanto pelo fato de a proteína no estado ligado adquirir uma conformação adequada para realização de sua função.¹⁴ Desse modo, interações entre proteínas, a nível molecular da célula, são vitais para a manutenção de

qualquer processo biológico e, conseqüentemente, da vida de determinado organismo.⁴⁶ A determinação do modo de interação entre proteínas (composição, cinética, estequiometria, termodinâmica) pode trazer um grande número de informações que auxiliam na compreensão de inúmeros problemas biológicos. Um dos exemplos mais atraentes relacionados à interação entre proteínas pode ser visto na medicina, uma vez que o número de doenças humanas associadas a proteínas é superior ao número de genes no genoma. Isso significa que muitas doenças podem estar relacionadas à ausência das condições necessárias para a formação de complexos protéicos, fato que fez com que interações proteína-proteína tenham se tornado alvos de muitas drogas nos últimos anos.^{47,49} Além disso, a compreensão dessas interações pode elucidar algumas questões relacionadas aos projetos genoma, uma vez que o número de genes de um organismo tão complexo quanto o ser humano é próximo do número de genes de um dos eucariotos mais simples (*Caenorhabditis elegans*) e bem inferior a de alguns vegetais, como soja e arroz. O que indica que, em parte, a complexidade está relacionada ao modo como esses produtos gênicos interagem entre si para realizar suas funções biológicas.⁵⁰

Uma vez que a grande maioria dos processos biológicos é mediada por interações desse tipo, se a função de pelo menos um dos parceiros de interação é conhecida, o assinalamento da função da proteína de interesse pode ser facilitado.⁵¹⁻⁵³ O estudo das propriedades das proteínas, denominado proteômica, envolve níveis de expressão, modificações pós-translacionais e as interações em ampla escala, de modo a obter uma visão global dos processos celulares.

2.4. Proteoma

Proteoma indica as proteínas expressas em um genoma ou tecido, enquanto o genoma representa a soma de todos os genes de um indivíduo. O proteoma não é uma característica fixa de um organismo. Ele altera-se com o estado de desenvolvimento do tecido ou mesmo sob as condições nas quais o indivíduo se encontra, havendo, portanto, muito mais proteínas no Proteoma do que genes no genoma, especialmente em eucariotos. Isto porque há varias maneiras do gene ser expresso, o RNA, este então vai servir de molde para a tradução de uma proteína, a qual sofre modificação pós-traducional.⁵⁴

Investigar diretamente os produtos dos genes é uma forma de estudar doenças e qualquer problema biológico complexo. Por exemplo, para entender ao nível molecular como uma célula funciona em um indivíduo doente e um sadio.⁵⁵ Porém, não bastou identificar todos os genes presentes no nosso DNA isso não foi suficiente para compreender os mecanismos essenciais da vida. Para isso, é preciso investigar como as proteínas codificadas pelos genes e alteradas por múltiplas interações dentro das células promovem as atividades biológicas. Sendo assim, estudos específicos para identificar, quantificar e estudar as modificações pós-traducionais das proteínas em uma célula é de fundamental importância.⁵⁵ Análises do Proteoma beneficiaram enormemente os avanços em cromatografia e espectrometria de massa (MS), que juntos podem fornecer uma grande quantidade de dados a partir da presença de elementos presentes nas amostras. O grande desafio em proteômica é gerar informações úteis a partir desses dados quanto à presença e abundância, tanto em termos absolutos ou relativos, dos milhares de potencialmente proteínas encontradas em um sistema biológico.⁵⁴

A partir de estudos recentes, constatou-se que a proteômica é muito mais complicada do que aproximadamente 30.000 genes no genoma humano poderia prever, devido à multiplicidade de estruturas de proteínas provenientes de um único gene.⁵⁵

As modificação dos cátions podem ser combinatórios, como é freqüente no caso de glicosilação e fosforilação, o processamento amino-terminal de uma proteína e a acetilação produzem estruturas adicionais na variação do genoma previsto na sequência de proteína.¹¹⁻¹⁴ Cada uma destas modificações do gene pode trazer importantes implicações fisiológicas que resultam em alterações na atividade biológica, muitas vezes como consequência normal da fisiologia celular (mecanismos para regular a atividade, interações, transporte celular e da proteína lifetime).⁵⁵ Estudos Globais da proteômica são ainda mais complicados pelo grande alcance dinâmico das concentrações de proteína presentes em um sistema biológico, pois a síntese e as funções metabólicas dos genes e das proteínas não ocorrem sem a presença de íons metálicos ou metaloenzimas.

2.5. Metaloproteínas

A maioria das proteínas em fluidos biológicos e órgãos, quando ligadas a metais, são chamadas de metaloproteínas. Quando também atuam como catalisadores biológicos, regulando reações biológicas, funções fisiológicas das células e órgãos são

denominadas metaloenzimas. Algumas metaloproteínas e metaloenzimas típicas estão resumidas na Tabela 3. Como é demonstrado na mesma, as metaloenzimas podem conter um número específico de íons metálicos nos sítios ativos e funcionam como catalisadores biológicos específicos para reações enzimáticas, incluindo síntese genética (DNA, RNA), metabolismo antioxidante e assim por diante. Além disso, a biodisponibilidade e toxicidade dos elementos dependem igualmente da suas formas químicas.^{62,63}

Nos últimos anos, especiação química, ou especiação elementar, tem sido amplamente desenvolvida para elucidar a essencialidade biológica e toxicidade dos elementos na base molecular.^{3,5}

Tabela 3. Metaloenzimas típicas e suas funções biológicas³

Metaloenzima (M)	Nº de Átomos	Função Biológica
Transferrin (66-68)	2 Fe	transporte de ferro
Nitrogenase (200-220)	24 Fe 2 Mo	fixação de nitrogênio
Citrocromo P-450 (50)	1 Fe	metabolismo de esteróides e drogas
Anidrase carbônica (30)	1 Zn	catalisador de equilíbrio $\text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$
Plastocianina (134)	1 Cu	transferência de elétrons, transporte oxigênio reação redox e adição de O_2

A fim de se obter uma visão do campo científico da "Metalômica", um modelo esquemático do sistema biológico é ilustrado na Figura 1, onde os fluidos de uma célula biológica (por exemplo, o soro do sangue) são separados pela membrana celular. No lado esquerdo, em termos acadêmicos, como genômica, proteômica e metabolômicas, são mostrados juntamente com metalômica para indicar suas áreas de pesquisa no sistema biológico. Como é descrito, a genômica lida com os trabalhos científicos sobre a genética de informação sobre DNAs e RNAs codificados como seqüências de bases nucleicas. Esses DNAs e RNAs são geralmente chamados genomas em genômica, que desempenham papéis essenciais na síntese de proteína. As proteínas são distribuídas dentro e fora da célula, e funcionam como as enzimas para a síntese e metabolismo de várias substâncias biológicas dentro da célula.^{66,67,68}

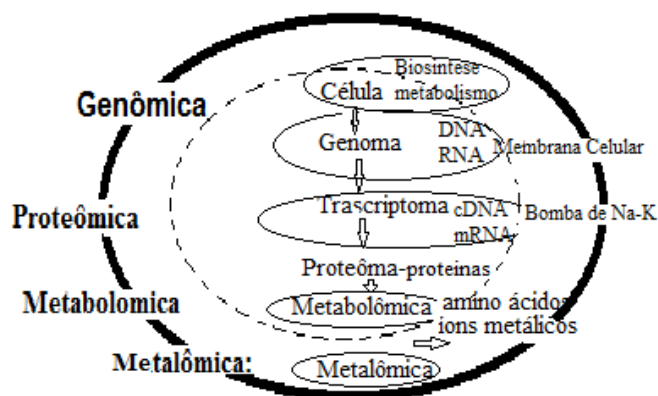


Figura 1. Modelo esquemático do sistema biológico, mostrando as relações entre genômica, proteômica, metabolômica e metalômica, com os íons metálicos em destaque.⁶⁸

Muitas substâncias biológicas, assim como os íons metálicos, são transportadas como matérias-primas dentro da célula através de membranas. Em geral, material de conversão está ocorrendo ativamente no interior da célula e muitas vezes também na membrana da célula. Tal conversão de material de transporte e os processos para fora da célula são chamados de metabolismo de substâncias biológicas, pequenas moléculas como aminoácidos, ácidos orgânicos e íons metálicos produzidos no metabolismo.⁶⁸

Elementos metálicos aplicados em biociências têm sido estudados de forma independente em muitos campos científicos, tais como bioquímica, química bioinorgânica, ciência da nutrição, farmácia, medicina, toxicologia, agricultura, ciências ambientais e assim por diante. Todos esses campos científicos têm uma inter-relação profunda comum com íons metálicos, do ponto de vista das ciências biológicas. Desse modo, é desejável que a ciência biometal seja promovida como campo interdisciplinar para integrar novos campos científicos. A elucidação dos papéis fisiológicos e funções de biomoléculas ligadas a íons metálicos nos sistemas biológicos apresentam grande importância para a pesquisa. Assim, a metalômica pode ser denominada, em outras palavras, “Bioquímica funcional assistida de metal”. Nos últimos anos, genômica e proteômica têm recebido grande atenção por contemplar vários sistemas biológicos a partir do ponto de vista da genética e das ciências da proteína.⁶⁸

Genômica e proteômica são de fundamental importância científica, já que os genes contêm as informações para sintetizar diferentes proteínas. No entanto, como pode ser visto na Tabela 3, as proteínas não podem ser sintetizadas sem a assistência de

metaloenzimas contendo Cu e outros metais. Neste sentido, a metalômica pode ficar na mesma posição em importância científica da genômica e proteômica. Íons metálicos, como os alcalinos, que existem principalmente como íons livres nos fluidos biológicos, deverão também ser incluídos na metalômica, já que desempenham papéis importantes nos sistemas biológicos.⁶⁸

2.6. Cobre-Proteína

As metaloproteínas que contêm cobre podem também ser divididas quanto ao tipo de esfera que possuem. Em sua maioria são proteínas com esferas mononucleares, em que se incluem proteínas de transferência eletrônica, como as da família da azurina, e enzimas como a superóxido dismutase. Esferas dinucleares de cobre foram encontradas em enzimas como a ceruloplasmina que é secretada no fígado e considerada a principal proteína carreadora de cobre no soro, e a citocromo-c oxidase, uma metaloenzima fundamental para a transferência de elétrons para o oxigênio, uma etapa muito importante na respiração celular.^{69,70}

O cobre induz a síntese da tioneína no fígado, cuja sequência de aminoácidos varia conforme a espécie. Ela pode se ligar ao íon cobre, formando a metalotioneína, que tem como uma de suas funções é diminuir a quantidade de íons Cu livre no fígado. Juntamente com o ferro, o cobre é importante também na formação da hemoglobina.^{69,70} Ele é transportado do fígado para os órgãos periféricos pela ceruloplasmina, que atua como armazenadora e transportadora a fim de se manter a homeostase desse elemento, já que o fígado é o local de maior concentração desse mineral no organismo. Aproximadamente 90% do cobre no plasma de mamíferos estão na forma de metaloproteínas, como a ceruloplasmina, que o carrega o cobre para tecidos específicos.⁶⁹

O metabolismo do cobre está relacionado com o do ferro através da atividade da ferroxidase da proteína ceruloplasmina. Como parte da proteína multimérica ceruloplasmina, o cobre está envolvido na oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} , tornando possível a transferência deste último para a proteína transferrina sérica. Mais de 65% do cobre sérico presente em vertebrados encontra-se associado ao complexo protéico da ceruloplasmina. Este complexo também tem um papel importante na defesa antioxidante, já que diminui o stress oxidativo induzido pelo Fe^{2+} .⁷⁰

Além das enzimas citadas anteriormente, a lisil oxidase, também ligada ao cobre, possui ação catalítica, servindo de entrecruzamento (cross linkage) entre as moléculas de colágeno e elastina, convertendo-as em tecido conectivo forte e flexível, condição essencial para tecidos como o coração e vasos sanguíneos. Ao nível de sistema nervoso central, outra cupro-enzima, a dopamina- β -monooxigenase catalisa a conversão da dopamina em nor-epinefrina, um neurotransmissor e hormônio. A tirosinase, outra cupro-enzima, transforma o aminoácido tirosina em melanina, pigmento escuro protetor dos cabelos, pele e olhos. O cobre, por fim, é necessário para assegurar as propriedades estruturais e catalíticas das cuproenzimas, atuando como cofator ou como componente alostérico. Sendo assim, são necessários estudos mais aprofundados aliados a técnicas analíticas, como a eletroforese bidimensional.^{69,70}

2.7. Eletroforese bidimensional em gel de Poliacrilamida

Uma das técnicas mais difundidas e empregadas na análise proteômica surgiu muito antes do advento dessa ciência. A eletroforese de duas dimensões em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) surgiu na década de 70 e foi desenvolvida visando a separação de proteínas utilizando gel de poliacrilamida. Apesar de a invenção da técnica ser de quase 40 anos, os métodos que possibilitaram a identificação das proteínas separadas em segunda dimensão de forma rápida e conclusiva são muito mais recentes, tendo sido desenvolvidos ao longo dos últimos 15 anos.^{71,72}

A eletroforese bidimensional é uma técnica muito abrangente e poderosa, pois tem a capacidade de separar misturas complexas de proteínas em um único gel, gerando informações relevantes como o ponto isoelétrico (pI) e a massa molar (MM) dessas proteínas. A união dessa técnica com a espectrometria de massa (MS) é uma abordagem muito versátil e robusta, já que, além do seu baixo custo, confiabilidade de resultados e reprodutibilidade razoável, apresenta uma total compatibilidade com a espectrômetro de massas.⁷³

A eletroforese bidimensional, como próprio nome diz, é constituída por duas fases distintas na separação de proteínas. A primeira, chamada de primeira dimensão, é a focalização isoelétrica (IEF). Nesta etapa, as proteínas são separadas em um gradiente de pH até atingirem o ponto estacionário, em que a soma total de suas cargas é zero, isto é, até alcançarem o seu ponto isoelétrico (pI). São adicionados à amostra: agentes

caotrópicos, como a uréia e a tiouréia, com a função de desnatura as proteínas em uma única conformação; detergente não iônico ou zwitterionico, que serve para aumentar a solubilidade das proteínas hidrofóbicas; um agente redutor para a prevenção de eventos oxidativos; e anfólitos carreadores que auxiliam na focalização das proteínas até os seus respectivos pIs.⁷³

A segunda etapa (segunda dimensão) consiste na separação das proteínas, já separadas pelo pI, por MM utilizando o método de eletroforese em gel de poliacrilamida com o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Assim, a eletroforese de duas dimensões possui a capacidade de evidenciar, com uma boa resolução, mais de 2.000 proteínas diferentes.^{73,74}

Após essas duas etapas, o gel mostra um perfil com inúmeros pontos, chamados de spots, como é mostrado na Figura 2, que correspondem uma proteína específica. Quanto maior o volume e a intensidade do spot, maior a concentração desta proteína na célula, ou seja, a abordagem 2D permite uma análise quantitativa das proteínas presentes na amostra estudada. Essa plataforma apresenta uma alta resolução devido à separação das proteínas por parâmetros diferentes e independentes (pI e MM).

Dessa forma, nota-se claramente a complexidade e utilidade desta plataforma, que, além de isolar as mais diversas proteínas, fornece, em um único gel, uma série de dados a respeito de diversas proteínas, como o pI, MM, abundância relativa, além de permitir a análise e identificação futura por MS. Dados adicionais ainda podem ser obtidos, como a visualização de modificações pós traducionais através da análise da corrida eletroforética da proteína em questão.⁷⁵

O mapa proteômico configura-se, então, da seguinte maneira: Da esquerda para a direita há um aumento de pI, ou seja, as proteínas com menor pI ficam à esquerda, e com maiores pI ficam à direita. De baixo para cima há um aumento de MM, isto é, as proteínas menores tendem a ficar em uma posição inferior no perfil, enquanto as proteínas maiores tendem a ficar na posição superior. Com isso, há a possibilidade da distinção das proteínas estudadas e, desse modo, classificá-las como ácidas, básicas, de alto ou baixa massa molar, como é mostrado na figura 2.

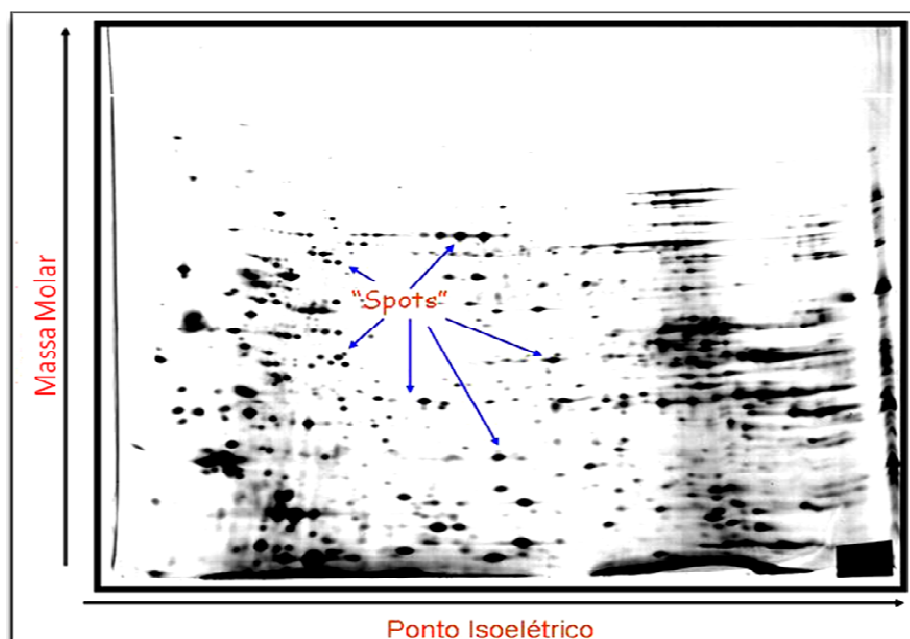


Figura 2. Mapa proteômico padrão. As setas apontam os “spots” no gel. Setas pretas indicam um aumento gradativo tanto do ponto isoelétrico (eixo X), quanto da Massa molar (eixo Y).

Todavia, esta técnica apresenta algumas deficiências importantes. Entre as principais estão o fato de se excluir proteínas de alto peso molecular (maiores que 120 kDa) e proteínas de 10 kDa, que co-migram com o de SDS durante a segunda dimensão, isto é, proteínas menores que 10 kDa apresentam baixa resolução ou nula por esta técnica. As proteínas extremamente ácidas e básicas, assim como muitas proteínas hidrofóbicas (geralmente proteínas de membrana) também são excluídas ao utilizar a técnica de 2D-PAGE.⁷⁶

Outra significativa deficiência é quanto às proteínas de baixa expressão, que são aquelas que apresentam baixa concentração de cópias por célula. Isto é, algumas proteínas, como as estruturais, podem atingir um patamar de 1.000.000 de cópias/célula, enquanto outras pouco expressas podem ter apenas 10 cópias/célula. Sendo assim, por muitas vezes elas não são detectadas nem pela impregnação por prata. O fato é que uma célula pode possuir entre 10.000-30.000 tipos diferentes de proteínas e no máximo 10.000 podem ser visualizadas na impregnação por prata.⁷⁴

Além disso, na tentativa de aplicar maiores quantidades de amostra a fim de se evidenciar essas proteínas menos expressas, pode acontecer a chamada sobreposição, que ocorre quando as proteínas muito expressas, por possuir um peso e pI semelhante a alguma outra proteína, podem se sobrepor à essas proteínas, impedindo que sejam visualizadas e estudadas pela técnica 2D-PAGE e Espectrometria de Massas.⁷⁴ Tais

proteínas de baixa expressão são muito importantes pois podem ser potenciais biomarcadores de doenças ou alvos para drogas e não são detectadas, seja pelo fato de estarem em uma baixa concentração, seja pela sobreposição de outras proteínas mais abundantes. Assim sendo, algumas estratégias começaram a surgir para superar as limitações, tais como a análise do sub-proteoma, que reduz a complexidade do estudo da célula pelo fato de se analisar separadamente o proteoma de cada organela por 2D-PAGE.⁷⁷

O presente trabalho adotou um caminho alternativo para superar as limitações da 2D-PAGE. Fez-se uso de diferentes tiras (IPG strips) com faixas de pH diversas e estreitas, para melhor reproduzir uma certa região de proteínas, seja a região ácida, básica ou central do gel. Com isso, pode-se visualizar melhor as proteínas, pois essa técnica evita a sobreposição e permite uma melhor dispersão dos spots na Figura 3.⁷⁶

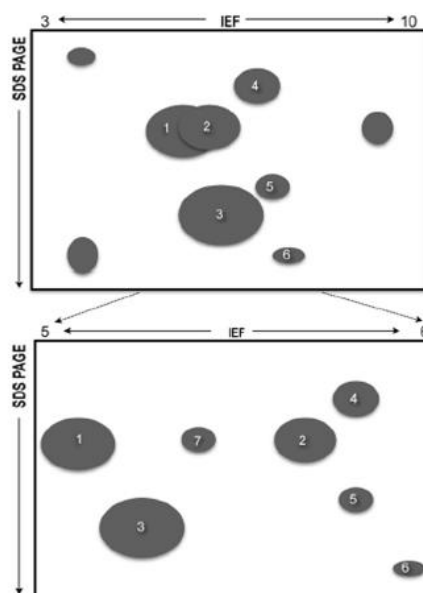


Figura 3: Representação de como a utilização de strips com uma faixa estreita de pH pode otimizar a visualização dos spots.

2.7.1. *Preparo das amostras*

Para aproveitar a alta resolução propiciada pela 2D-PAGE, as proteínas têm de ser desnaturadas, desagregadas, reduzidas e solubilizadas para alcançar ruptura completa das interações moleculares e para garantir que cada ponto represente um polipeptídeo individual. Os principais problemas relacionados à visualização de

proteínas da célula ou extratos protéicos encontram-se na dinâmica das proteínas e diversidade em relação ao ponto isoelétrico e solubilidade. Devido à complexidade dos procedimentos, não existe um método único de preparo que possa ser universalmente aplicado a todos os tipos de amostras analisadas por 2D-PAGE.⁷⁸ Embora um grande número de protocolos tenha sido publicado, eles têm de ser adaptados e otimizados para diferentes tipos de amostra (por exemplo, células microbianas ou de tecidos de mamíferos) a serem analisadas, bem como para as proteínas de interesse (por exemplo, as proteínas da membrana solúvel citosólica ou altamente insolúveis).⁷⁸

Algumas recomendações gerais, no entanto, podem ser feitas: a preparação da amostra deve ser tão simples quanto possível para aumentar a reprodutibilidade, e as modificações das proteínas durante a preparação da amostra devem ser minimizadas, já que podem resultar em manchas sobrepostas em géis 2D-PAGE. Em particular, as enzimas proteolíticas na amostra devem ser desativadas. Os três passos fundamentais na preparação da amostra são: rompimento celular, inativação ou remoção de substâncias interferentes e solubilização das proteínas.⁷⁹

O rompimento celular pode ser alcançado por lise osmótica, lise detergente, lise enzimática da parede da célula, sonicação, macerada com ou sem nitrogênio líquido, etc. Estes métodos podem ser usados individualmente ou em conjunto. Normalmente, a célula microbiana e tecidos biológicos (células vegetais), exigem condições bastante duras para a lise celular devido à solidez das paredes celulares, enquanto que métodos mais suaves podem ser aplicados para os tecidos de mamíferos.⁷⁹ Com relação às proteases, estas devem ser inativadas para impedir a degradação de proteínas. Caso contrário, pode-se resultar em manchas e perda de proteínas.

Os inibidores de protease são geralmente acrescentados, mas podem modificar as proteínas. Deve-se ter em mente, no entanto, que pode ser bastante difícil a inativação completa de todas as proteases. A precipitação com acetona é muito útil para minimizar a degradação protéica e remoção de compostos interferentes, tais como sais e polifenóis. Além disso, um diferente conjunto de proteínas pode ser obtido por extração com lise, dependendo se houve ou não um precedente na etapa de precipitação.⁸⁰

2.7.2. Solubilização das Proteínas

Após o rompimento celular e/ou remoção de compostos interferentes, os polipeptídeos individuais devem ser desnaturados e reduzidos, para interromper as interações intra e intermoleculares, e solubilizados, mantendo-se a integridade das propriedades de carga. A solubilização da amostra é geralmente realizada em um tampão contendo caotrópicos (por exemplo, uréia e ou tiouréia), detergente não-iônico ou detergentes anfóteros (por exemplo, Triton X-100 e CHAPS), agentes redutores e, dependendo do tipo de amostra, inibidores da protease. Infelizmente, lise pela uréia não é ideal para a solubilização de todas as classes de proteínas, em particular para as de membranas ou outras proteínas altamente hidrofóbicas. Sendo que o seu melhor aproveitamento é quando mistura a tiouréia, na solubilização das proteínas hidrofóbicas.

81

2.7.3. Utilização dos Detergentes Surfactantes

São utilizados para evitar interações hidrofóbicas entre os domínios de proteínas hidrofóbicas, evitando-se perda de proteínas devido à agregação e precipitação. O SDS, detergente aniônico, é um dos mais eficientes surfactantes. Os detergentes mais populares não-iônicos são o NP-40, Triton X-100 e maltoside docedil (n-Dodecyl- β -D-maltoside). Infelizmente, NP-40 e Triton X-100 não são muito eficazes na solubilização de proteínas de membrana muito hidrofóbicas. Em contraste, anfóteros, com detergentes, CHAPS e Sulfobetaínas (por exemplo, SB 3-10 ou ASB 14) apresentam melhor desempenho na solubilização em combinação com uréia e tiouréia para várias proteínas de membrana integrais, como mostrado na Figura 4. ⁸²

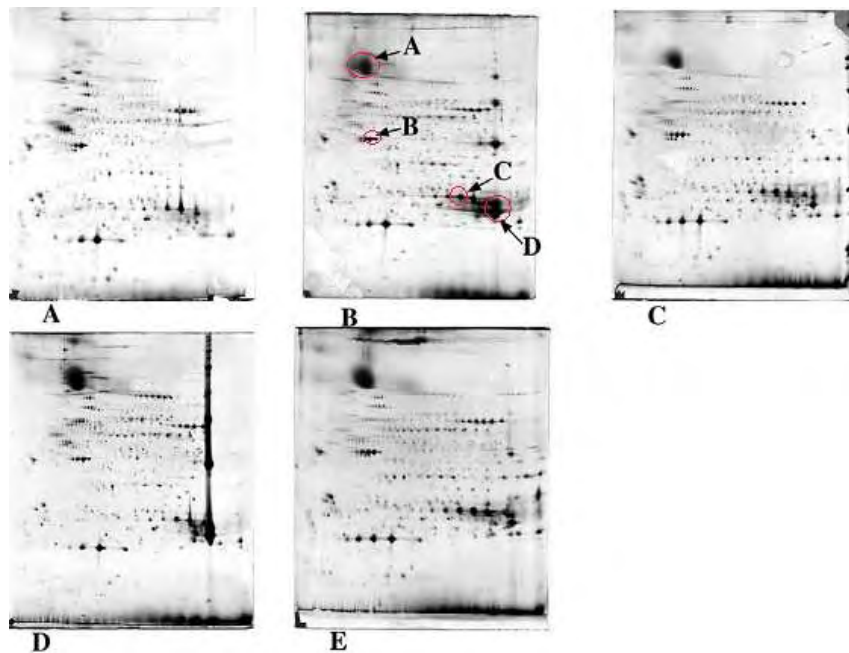


Figura 4. Separação eletroforética 2D de proteínas de membrana do plasma de células humanas, (150µg) aplicadas em gel poliacrilamida. A primeira dimensão é em gradiente de pH 4-8 linear e a segunda dimensão de um gel de acrilamida 10%. Algumas proteínas identificadas são indicadas. As proteínas são extraídas e focadas em uma solução contendo uréia 7M, tiouréia 2M, 20 mM DTT, 4% CHAPS, B: 2% Triton X-100, C: 2%, Brij56; D: 2% n-Dodecyl-β-D-maltoside; E: 2% ASB14.⁸²

A uréia é bastante eficiente em romper as ligações de hidrogênio, levando a proteína a desdobramento e desnaturação. Em contraste, a tiouréia é mais adequada para quebrar interações hidrofóbicas.⁸² A maioria das proteínas de membrana não podem ser solubilizadas adequadamente com um único detergente não-iônico, e, empiricamente, testar e otimizar a composição de tampão de solubilização de amostra, para melhorar a solubilidade de proteínas da membrana, continua a ser importante.⁸³

2.8. Detecção das Proteínas separadas por 2D-PAGE

Existem diversos métodos para se detectar as proteínas separadas por 2D-PAGE, sendo que os mais comuns são os colorimétricos, que são aplicados após a eletroforese, como o Azul de Comassie coloidal e o nitrato de prata (AgNO_3). Azul de comassie é o corante mais confiável para a quantificação dos spots, pois apresenta linearidade quantitativa.⁸⁴ A detecção é baseada na ligação das moléculas do corante com as proteínas por interação eletrostática, levando-se em consideração a baixa afinidade deste corante com o gel de poliacrilamida, o que permite a visualização dos spots. O limite de detecção de proteínas por este método é entre 10-100ng/spot.⁸⁵ Já a coloração por prata

é um método entre 5 e 50 vezes mais sensível que o Coomassie. É um excelente método para análises qualitativas, porém de pobre poder quantitativo, pois a intensidade de coloração dos spots depende do tempo de revelação e não é linear com a quantidade de proteínas. Dessa forma, a comparação entre dois géis torna-se difícil.⁸⁶

Embora o método utilizando Coomassie seja mais comumente utilizado, existem alternativas para a detecção de proteínas, como a detecção pré eletroforética pela utilização de fluoróforo ou detecção radioativa.⁸⁷

Posteriormente à detecção das imagens, os géis são digitalizados e uma análise quantitativa das proteínas deve ser realizada utilizando programas computacionais específicos. Esta análise visa a comparação quantitativa entre spots que representam a mesma proteína em duas classes distintas de géis (classe lesado e controle, por exemplo) para evidenciar alguma diferença estatisticamente relevante, demonstrando, assim, que a proteína está em condição de super-expressa ou sub-expressa.

Os programas frequentemente utilizados são o MELANIE (Genebio- Swiss-Prot) e Image Master 2D Platinum 7.0 (Ge Biosciences). Estes programas contêm algoritmos que detectam os spots, os quantificam, levando em consideração o seu volume relativo, e fazem a comparação (matching) entre as duas ou mais classes desejadas com a finalidade de encontrar os spots diferencialmente expressos e realizar os testes estatísticos necessários para a comprovação. Este processo de comparação levando em consideração o volume relativo é chamado de análise densitométrica.

Após a localização dos spots desejados, pode-se fazer a excisão destes spots e submetê-los, após um processamento especial, à Espectrometria de Massas para que sejam identificados.

2.8.1. Tratamento de imagens dos géis

A importância da eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) é destacada em sua resolução, pois permite realizar uma separação eficiente devido às características inerentes à técnica (obtenção de gel bidimensional). Há, portanto, a possibilidade de se realizar estudos comparativos que podem facilitar a identificação de candidatos a biomarcadores entre os spots dos géis. Nos estudos proteômicos, a identificação de diferenças quanto à expressão de proteínas e a verificação de spots novos ou ausentes, de possíveis biomarcadores, é uma das principais aplicações.

A alta variação que existe entre os géis é o principal problema destes estudos comparativos, decorrentes da variabilidade extrínseca de amostras biológicas e outros fatores, como, por exemplo, o método empregado para a marcação das proteínas no gel, o preparo de amostra, a quantidade de proteínas totais aplicada, e pode ser que um dos fatores mais relevantes seja a polimerização do gel. Nesse caso, inúmeros fatores podem influenciar como: a temperatura em que ocorre a polimerização, a pureza e a concentração dos reagentes, tempo de formação do polímero, entre outros. Portanto, o processo de comparação entre géis, que é realizada pela comparação de imagens dos géis obtidas por registradores de imagens específicos, é um processo árduo, que exige bastante atenção, paciência e, essencialmente, cuidado experimental. ^{89,90,94}

2.9. Fluorescência de Raio-X (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 semiquantitativa ou quantitativa. A análise multielementar instrumental por fluorescência de raios X é baseada na medida das intensidades dos raios X característicos emitidos pelos elementos químicos componentes da amostra, quando devidamente excitados. Até 1966, a XRF era realizada unicamente por espectrômetros por dispersão por comprimento de onda (WDXRF, abreviação de wave-length dispersive X-ray fluorescence), baseados na lei de Bragg, os quais necessitam de um movimento sincronizado e preciso entre o cristal difrator e o detector. ⁸⁹ Atualmente esta técnica vem sendo utilizada principalmente para amostras sólidas, permitindo a determinação simultânea ou sequencial da concentração de vários elementos, sem a necessidade de destruição da amostra, para amostras líquidas pode-se recorrer a uma pré-concentração, empregando-se troca iônica, precipitação, quelação, etc.

Apresenta uma alta frequência analítica para análise semiquantitativa de amostras de interesse agroindustrial, geológico e ambiental quando se utiliza tubos de raios X na excitação. Tem também utilizado fontes radioativas emissoras de raios X e/ou gama de baixa energia substituindo os tubos de raios X na excitação, tornando a análise ainda mais simples, barata e de maior facilidade de operação, mas com a desvantagem de perda de sensibilidade analítica. Mesmo assim, a EDXRF com excitação por fontes radioativas tem encontrado inúmeras aplicações, principalmente na

área onde não há necessidade de uma alta sensibilidade analítica.⁹⁰

Uma variante da fluorescência de raios X por dispersão de energia, denominada de Reflexão Total (TXRF), vem sendo bastante desenvolvida nos últimos anos e tem sido aplicada principalmente na análise de elementos traços (na faixa de ppb) em amostras líquidas (da ordem de microlitros), em pesquisas ligadas ao Monitoramento Ambiental, Oceanografia, Biologia, Medicina, Indústria, Mineralogia, , fluídos biológicos e controle de qualidade de produtos de alta pureza.

Com o surgimento da espectroscopia de fluorescência de raios X, a mesma não pôde ser amplamente aplicada em nível microscópico como as técnicas de microsonda de elétrons ou prótons. Isto foi devido às dificuldades ópticas de focalizar o feixe de raios X comparado com feixe de partículas carregadas. A solução surgiu com o aparecimento da teoria de reflexão total na faixa de raios X, possibilitando a construção de dispositivos concentradores de radiação eletromagnética, (os capilares), e o desenvolvimento da tecnologia de tubos de raios X com alta intensidade, relatando várias aplicações para análise de amostras biológicas e inorgânicas, e nos últimos anos tem sido aplicada na ciência forense.^{91,92}

Outra variante é a microfluorescência de raios X, esta apresenta vantagens do seu uso para análises químicas, sistema utiliza um capilar de vidro, demonstrando algumas vantagens da fluorescência de raios X comparada com a excitação por prótons ou elétrons: (1) baixa dissipação de energia, praticamente não ocasionando danos térmicos na amostra a ser analisada; (2) as amostras podem ser analisadas no ar, assim elementos voláteis são observados; (3) as amostras podem ser não condutoras; e (4) boa razão sinal-ruído, resultando nos limites de detecção.⁹²

Entre as vantagens da fluorescência de raios X para a análise química de elementos pode-se citar: (a) adaptabilidade para automação, (b) análise rápida multielementar, muito importante devido a interdependência entre os micronutrientes nos sistemas biológicos, (c) preparação simplificada da amostra e (d) limite de detecção dentro do exigido por muitas amostras biológicas.⁹²

2.9.1. Fundamento da fluorescência de raios x

A análise por fluorescência de raios X é um método quali-quantitativo baseado na medida das intensidades (número de raios X detectados por unidade de tempo) dos raios X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra. Os raios X

emitidos por tubos , fonte radioativa, que excitam os elementos constituintes, os quais, por sua vez, emitem linhas espectrais com energias características do elemento e cujas intensidades estão relacionadas com a concentração do elemento na amostra.^{93,94}

Quando um elemento de uma amostra é excitado, este tende a ejetar os elétrons do interior dos níveis dos átomos, e como consequência disto, elétrons dos níveis mais afastados realizam um salto quântico para preencher a vacância. Cada transição eletrônica constitui uma perda de energia para o elétron, e esta energia é emitida na forma de um fóton de raio X, de energia característica e bem definida para cada elemento. Assim, de modo resumido, a análise por fluorescência de raios X consiste de três fases: excitação dos elementos que constituem a amostra, dispersão dos raios X característicos emitidos pela amostra e detecção desses raios X.⁹⁰

2.9.2. Excitação dos elementos

Para provocar a emissão dos raios X característico dos elementos que constituem a amostra, a excitação pode ser feita de várias maneiras: excitação por partículas aceleradas como elétrons, prótons ou íons; excitação por raios X, partículas alfa, partículas beta negativas ou raios gama emitidos por radionuclídeos, além do processo mais utilizado até recentemente, que é através raios X gerados em tubos.

Nos processos onde se utilizam elétrons, prótons ou íons, e também máquinas geradoras de raios X, há necessidade de se ter instrumentação eletro-eletrônica capaz de produzir altas diferenças de potencial elétrico (alta tensão), extremamente estáveis, e portanto são sofisticadas e caras. Quando se emprega fontes radioativas, emissoras de partículas alfa, beta negativas, raios X ou gama de baixa energia, mostrada na Figura 5. As transições obedecem critérios de seleção de acordo com a teoria quântica.⁹⁰

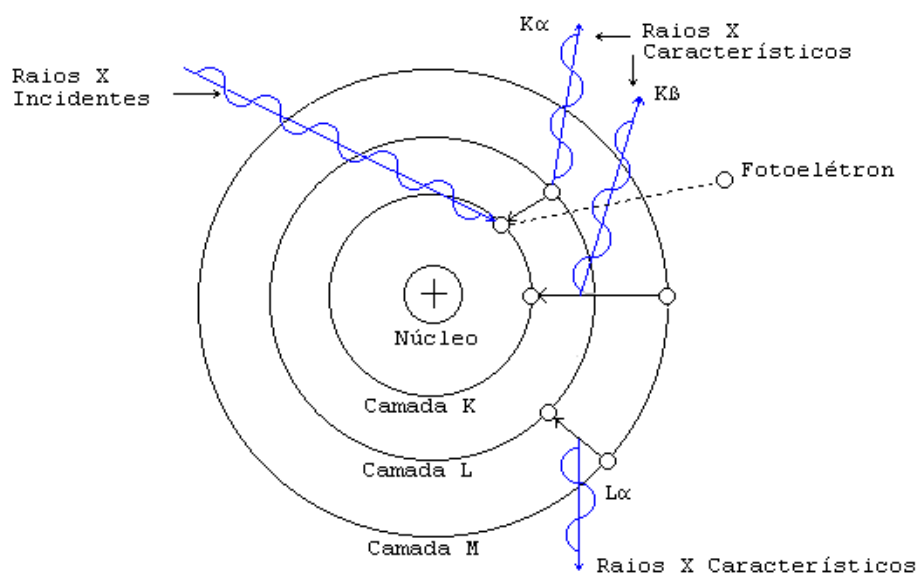


Figura 5. Produção das radiações características.⁹⁰

2.9.3. Espalhamento Compton

Em 1923, Arthur Holly Compton mostrou que quando um feixe de radiação monocromática interage com a matéria, uma parte deste feixe era espalhada, sendo uma com a mesma energia do feixe incidente e outra com energia ligeiramente menor. O espalhamento Compton é caracterizado pelo espalhamento de fótons por elétrons mais externos ao átomo, este é um processo duplo, no qual os elétrons absorvem a energia da onda eletromagnética e emite novamente como radiação espalhada, arrancando um elétron do átomo. Uma onda eletromagnética transporta energia e quantidade de movimento e sempre que, de alguma forma, quando alguma energia for retirada da onda, uma quantidade de movimento correspondente também será retirada.⁹⁵

Para uma identificação dos elementos nos spots protéicos, é necessária a utilização de Fluorescência de Radiação Síncroton, para uma boa resolução e sensibilidade.

2.9.4. Fluorescência de Radiação Síncroton (SRXRF)

É uma técnica sensível em que se determina vários elementos em baixa concentração, como íons metálicos, que representam um papel importante na atividade biológica. A investigação dessas espécies químicas em diversos tipos de tecido vegetal, animal e humano, permite uma melhor compreensão de suas funções.

A radiação Síncroton é formada a partir da radiação eletromagnética emitida por elétrons altamente energéticos, que circulam, e um acelerador ou anel de armazenamento. Segundo Souza, a radiação Síncroton é uma fonte de raios-X que possui elevada intensidade (10^3 a 10^6 vezes mais forte que a fonte de raios-X convencional), abrangendo uma ampla faixa do espectro eletromagnético (desde o infravermelho até os raios-X). Sempre que uma carga elétrica é acelerada, da mesma forma que os elétrons oscilando numa antena, ela emite radiação eletromagnética. Uma partícula que é acelerada de forma harmônica gera um campo elétrico senoidal em função do tempo, e este oscila de acordo com a frequência do seu movimento. Se a velocidade da partícula for bem inferior à da luz, essa emissão tem o valor máximo para ângulos perpendiculares à direção de aceleração. Por outro lado, nas proximidades da velocidade da luz ocorrem mudanças interessantes na emissão de radiação, relacionadas com as frequências emitidas e a forma (direção) de como a partícula emite. Alterações mais profundas ocorreram a velocidades relativísticas no movimento circular em que o espectro de emissão de radiação torna-se quase contínuo, esta radiação é conhecida como luz síncroton.^{96,102}

A radiação ou luz síncroton é produzida por aceleradores angulares nos quais circula uma corrente pulsada de elétrons de alta energia ($E \gg m_0 c^2$) com velocidade praticamente igual a velocidade da luz. A radiação síncroton é produzida pelo movimento circular destes elétrons em velocidades relativísticas nas tangentes curvaturas de sua trajetória.

O processo de radiação se inicia por um canhão de elétrons de um acelerador, sendo que são aceleradores de partículas carregadas, como elétrons, prótons ou íons pesados. As partículas carregadas entram em um tubo onde existem campos elétricos alternados, sendo que estas partículas são aceleradas primeiramente por um campo elétrico e entram em um tubo de corrente “drift tube” onde são protegidas do campo elétrico e o atravessam com a velocidade constante até a próxima abertura. Neste ponto as partículas são novamente aceleradas e a cada abertura entre os tubos “drifts” as partículas recebem mais energia. Com isso este processo é capaz de acelerar as partículas carregadas com energias muito grandes.^{96,97,98}

2.10. Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)

Após quase meio século da proposta inicial de Alan Walsh, a espectrometria de absorção atômica (AAS) é, hoje em dia, uma técnica analítica bem estabelecida e largamente utilizada nos laboratórios de pesquisa, de aplicações e de controle de qualidade para a determinação de elementos metálicos, semimetálicos e não metálicos em diversos tipos de amostras. ¹⁰⁴⁻¹⁰⁸

Ao longo desses anos, tanto a espectrometria de absorção atômica com atomização por chama (FAAS) como atomização eletrotérmica (AAS) sofreram diversos avanços instrumentais, tornando os equipamentos mais robustos. Comparativamente, a AAS sofreu os maiores aprimoramentos desde a sua proposta inicial. ¹⁰⁹ Os tubos de grafite revestidos piroliticamente com plataforma e aquecimento transversal, a correção de fundo baseada no efeito Zeeman e os detectores com resposta rápida para registro dos sinais transientes foram algumas das importantes contribuições ocorridas ao longo do processo de desenvolvimento dessa técnica. Essas inovações instrumentais e outras experimentais foram consolidadas por Walter Slavin, resultando no conceito das condições STPF (Stabilized Temperature Platform Furnace). As condições STPF são um conjunto de requisitos instrumentais e operacionais sendo mostrado na Figura 4, que asseguram uma condição analítica adequada, permitindo obter métodos mais sensíveis e com mínima interferência utilizando a AAS. ¹¹⁰⁻¹¹¹

Tabela 4. Requisitos instrumentais e operacionais necessários para atender as condições STPF e os resultados obtidos. ¹¹²

Condições STPF	Resultado obtido
Tubo de grafite com plataforma L'vov	Estabelecimento de um ambiente quase isotérmico durante a atomização
Sinais de absorbância registrados em área	Minimização dos efeitos das variações cinéticas do processo de atomização
Atomizador construído em grafite pirolítico	Redução de perdas por difusão através da parede do atomizador
Aquecimento transversal do tubo de grafite	Estabelecimento de um ambiente espacialmente isotérmico
Correção da radiação de fundo por efeito Zeeman	Correção das interferências espectrais
Utilização de modificador químico	Aumento da eficiência do tratamento térmico durante a pirólise
Interrupção do fluxo de gás durante a atomização	Aumento do tempo de residência da nuvem atômica na zona de observação
Elevada taxa de aquecimento do tubo de grafite	Redução de interferência na fase e formação de uma densa nuvem atômica
Eletrônica adequada para permitir a integração do sinal transiente	Obtenção do registro dos sinais de absorbância em tempo real

Entre as técnicas espectroanalíticas, a AAS ocupa uma posição de destaque devido à elevada sensibilidade, seletividade, à pequena quantidade de amostra necessária para realizar a análise e à possibilidade de tratamento térmico da amostra durante o programa de aquecimento, tornando possível introduzir amostras na forma sólida ou de suspensões. ¹¹³⁻¹¹⁴ A grande quantidade de métodos analíticos bem estabelecidos, a facilidade de operação do equipamento e o alto grau de automação dos espectrômetros modernos também contribuíram para a aceitação da técnica. ¹¹⁵

Esta técnica aplica-se a determinação de um grande número de metais, e é indicada, quando se deseja quantificar baixíssimas concentrações (inferiores a 100 µg L⁻¹). Apesar de oferecer limites de detecção muito baixos, sofre interferência de matriz, que pode ser minimizada, com o ajuste das temperaturas e modificadores químicos. É baseada no mesmo princípio que o FAAS, mas a atomização se faz por aquecimento eletrotérmico, no lugar de atomização por chama. Um discreto volume da amostra pré-digerida é transportado, por meio de um amostrador, para dentro do tubo de

grafite e a atomização ocorre com o aquecimento elétrico do tubo, em 3 estágios, desolvatação (secagem da amostra entre 90-120°C), pirólise (decomposição da matéria orgânica e moléculas inorgânicas - temperaturas superiores a 500 °C) e atomização (os átomos metálicos são excitados a 2400 °C).

O vapor atômico resultante da atomização absorve a radiação monocromática, fornecida por uma lâmpada do metal. O detetor fotoelétrico mede a intensidade da radiação transmitida. O inverso da transmitância é convertido logaritmicamente para absorbância, que é diretamente proporcional à densidade numérica de átomos no vapor, até uma faixa de concentração limite. A quantificação do metal se dá, com a comparação do sinal analítico obtido na leitura da amostra, com uma curva analítica.

O gás de purga utilizado é o argônio, que além de servir como gás de arraste, mantém a atmosfera interna inerte, evitando a oxidação do forno.¹¹⁶ Por outro lado, os longos programas de aquecimento do tubo de grafite (1 a 3 minutos) e a característica monoelementar da AAS podem se tornar uma desvantagem quando a frequência analítica é um parâmetro a ser considerado.¹¹⁷ O alto custo dos materiais de consumo, como os tubos de grafite e os reagentes de alta pureza também podem, em alguns casos, inviabilizar o uso dessa técnica. Adicionalmente, o crescente interesse por métodos analíticos que possibilitem determinações multielementares de elementos-traço e ultra-traço em diversos tipos de amostras, implicando em maior frequência analítica e redução de custos, incentivou as pesquisas no sentido de tornar a espectrometria de absorção atômica capaz de realizar determinações multielementares sequenciais ou simultâneas. Um dos métodos que apresenta boa resolução de extração do analito de interesse, para ser analisada por AAS é a extração por ultra-som

2.11. Extração dos íons metálicos por ultra-som

Os estudos pioneiros na caracterização dos efeitos químicos provocados por ondas ultra-sônicas implicando na transformação de espécies químicas foram realizados por Miller em 1950. Tais estudos comprovaram a cisão das ligações H-O em moléculas de água e a produção de peróxido de hidrogênio no meio irradiado. O fenômeno envolvido na cisão hemolítica de ligações foi denominado de sonólise da água, o qual leva a produção direta dos radicais livres H e HO* no meio. A elevada reatividade dos radicais livres favorece a rápida interação destas espécies com íons, moléculas, ou

ainda, a combinação entre radicais, com a conseqüente produção de novas espécies molecular (H_2O_2), ou ainda, nova radical livre (O_2H).

Os efeitos das ondas ultra-sônicas foram constatados em diferentes estudos submetendo água pura aos ultra-sons de baixa frequência; entre estes efeitos, estão: a oxidação de íons Fe^{2+} em meio aquoso, a degradação de polímeros e a formação de peróxido de hidrogênio.

Em investigações recentes também pôde ser constatada a diminuição significativa da taxa de formação de peróxido de hidrogênio sob sonicação com o aumento da concentração de NaCl presente na solução submetida a sonicação. Contudo, esses efeitos provocados pelo ultra-som não são habitualmente aplicados no desenvolvimento de métodos e procedimentos de análise química.

Em meio líquido, as ondas ultra-sônicas de alta potência produzem intensas e sucessivas ondas de compressão e rarefação, no qual, dependendo da viscosidade, pode ocorrer o surgimento de cavidades de dimensões microscópicas durante uma fase de rarefação. A ocorrência de gases e vapores no meio irradiado faz com que moléculas dos gases e vapores migrem para o interior das cavidades. Nos sucessivos ciclos de compressão e rarefação, as dimensões da cavidade vão aumentando, até que seja atingido um diâmetro crítico, quando esta finalmente sofre colapso. Ondas ultra-sônicas de frequência de 20 kHz e intensidade de 1 Watts cm^{-2} , ao se propagarem pela água (velocidade do som de aproximadamente 1500 m.s^{-1} e densidade $= 1 \text{ g cm}^{-3}$), levam um corpúsculo a deslocamentos de aproximadamente 0,93 mm em torno de um ponto central, com velocidade máxima de $11,7 \text{ m.s}^{-1}$. A aceleração máxima que este corpúsculo estaria submetido aproximadamente 16 km s^{-2} , ou seja, 1600 vezes maior que a aceleração da gravidade. Adicionalmente, a variação de pressão calculada para a situação apresentada seria de 1,7 MPa. Porém, este exemplo trata do efeito da propagação de onda ultra-sônica de 1 Watts cm^{-2} , e processadores ultra-sônicos superiores a 100 Watts são facilmente encontrados. Portanto, as velocidades máximas, pressões e acelerações serão tão mais intensas quanto maior a potência do gerador de ultra-sons. ¹¹⁸⁻¹²⁵

Os resultados obtidos em diferentes ensaios realizados com sistemas heterogêneos (líquido-sólido) sob sonicação indicaram que os efeitos dessas ondas acústicas não deveriam ser considerados como mero e eficaz sistema de agitação. Estes estão, relacionados aos jatos de alta velocidade produzidos pela cavitação acústica nas

proximidades das superfícies dos metais já que essas ondas mecânicas, ao interagirem com a superfície de sólidos, levam a alterações significativas em sua morfologia superficial. Caso os ultra-sons sejam aplicados em líquidos contendo material particulado em suspensão, as cavidades deixam de ser simétricas de forma que, quando de seu colapso, os microjatos são direcionados para o sólido. Porém, a energia resultante da ação direta dos ultra-sons não seria capaz de provocar efeitos como aqueles observados durante a sonicação, como o rompimento de ligações inter e intramoleculares. Estudos realizados com líquidos puros e soluções aquosas demonstraram outras potencialidades da aplicação da energia acústica, ao mesmo tempo em que induziram a uma reflexão sobre o emprego de ultra-som no preparo de amostras.

118-125

3. Referências Bibliográficas

1. ARANA L.V. Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável. **Editora UFSC.**, 310p, 1999.
2. AYRONA. L.M.S.(**tese**) Doutorado. Criação de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, em tanque-rede, na usina hidroelétrica de chavantes, rio paranapanema, SP/PR, 2009
3. FIRETTI, R. GARCIA, S. M. SALES, D., **Desenvolvimento de Sistema Informatizado para Gestão do Processo de Produção de Peixes** –Grupo de 2007.
4. SUSSULINE, A., Avaliação das Alterações Proteicos e Metaloproteínas em soja após o processo de modificação genética. **Dissertação**, M. Sc. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, São Paulo, 2007.
5. SANTOS, F. A., Determinação de Manganês e Zinco em spots proteicos de plasma de tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*) por SR-XRF e GFAAS após separação por 2D-Page. **Dissertação**, M. Sc., Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2010.

6. BORGHETTI, N. R. B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R. Aquicultura – Uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. Curitiba: **Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais**, 128p, 2003.
7. IBAMA., RQMA . Relatório da Qualidade do Meio Ambiente., **MMA**, 2007.
8. CAMPO, L.F.C. LA TILAPIA ROJA: una **Evolucion de 26 años, de la incertidumbre al exito**. México, 2008. 147p.
9. PROENÇA, C.E.M.; BITTENCOURT, P.R.L. **Manual de Piscicultura Tropical**. Brasília: IBAMA, 196p, 1994.
10. GONZÁLEZ, C.E.; QUEVEDO, E.T. Cultivo de las tilápias roja (*Oreochromis spp.*) y plateada (*Oreochromis niloticus*), cap.XIII. p. 283-299. GOMEZ, H.R.; DAZA, P.V.; AVILA, M.C.C. Fundamentos de Acuicultura Continental. Bogotá: **Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura**, 423p. 2001.
11. FURLANETO, F. P. B.; AYROZA, D. M. M. R.; AYROZA, L. M. S. Custo e rentabilidade da produção de tilápia (*Oreochromis sp.*) em tanque-rede no médio Paranapanema, estado de São Paulo, safra 2004/05. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.36, n.3, p.63-69, 2006.
12. BEVERIDGE, M.C.M. Cage Culture. 1^a ed. England: **Fishing News Books Ltd**, Surrey, England, 351p, 1987.
13. COLT, J.; MONTGOMERY, J.M. Aquaculture production systems. **Journal of Animal Science**, EUA, v. 69, p. 4183- 4192, 1991.
14. CARDOSO, E.L.; FERREIRA, R.M.A.; PEREIRA, T.A.; CARDOSO, M.M.F. Cultivo de peixes em tanques-rede: EPAMIG/IEF. In: CARDOSO, E. L e FERREIRA, R.M.A (Editores). Cultivo de peixes em tanques-rede: desafios e oportunidades para o desenvolvimento sustentável. **EPAMIG**, Minas Gerais. p.9-22, 2007.

15. PEZZATO, L. E. Alimentação de peixes - Relação custo e benefício. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36, Porto Alegre. **Anais... Porto Alegre: SBZ**, p.109-118, 1999.
16. PROENÇA, C.E.M.; BITTENCOURT, P.R.L. Manual de Piscicultura Tropical. Brasília: **IBAMA**, 1994.196p.
17. CASTAGNOLLI, N. Criação de peixes de água doce. Jaboticabal: **FUNEP**. 1992.189p.
18. ONO, E. A.; KUBITZA, F. Cultivo de peixes em tanques-rede. 3ªed. Jundiaí: **Eduardo A. Ono**, 112p. 2003.
19. CYRINO, J.E.; CONTE, L.; Tilapicultura em Gaiolas: produção e economia. In: José Eurico Possebon Cyrino e Elisabeth Criscuolo Urbinati (Eds.). AquaCiência 2004: Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura. Jaboticabal: **Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática**, cap.12, p.151-171, 2006.
20. HUGHES, S.G. All-vegetable protein feeds. **Feed International**, v.14, p.55-60, 1993.
21. KUBARIK, J. Tilapia on highly flexible diets. **Feed International**, v.6, p.16-18, 1997.
22. NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL) Nutrient requirements of fish. Washington: **National Academy Press**. 124p. 1993
23. GATLIN, D.M.; WILSON, R.P. Characterization of iron deficiency and the dietary iron requirement of fingerling channel catfish. **Aquaculture**, Amsterdam, v.52, p.191-198, 1986.

24. SATOH, S., et al., Effects on growth and mineral composition of rainbow trout of deletion of trace elements or magnesium from fish meal diet. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.**, 49:425-9, 1983a.
25. [ATSDR] AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Toxicological profile for copper. Syracuse: **US Department of Commerce**, 1990
26. UAUY, R.; OLIVARES, M.; GONZALEZ, M. Essentiality of copper in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 67S, p. 952S-959S, 1998.
27. MENEZES, A.C.L. Toxicidade de Cobre sobre Tambaqui *colossoma macromum* (Curier, 1998) em pH 4 e pH 8. **Dissertação M. Sc.** Universidade Federal da Amazônia. (UFAM), Instituto de Pesquisa da Amazonia (INPA), 2005.
28. PANGENKOP, G.K.. Gill surface interaction modol for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness. **Environ. Sci. Technol.**, 17: 342-347,1983.
29. GROSSELL, M.; Wood, C.M.. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. **J. Exp. Biol.**, 205: 1179-1188. 2002
30. HEALTH, A.G. Water Pollution and Fish Physiology. **C.R.C. Press Inc.**, Boca Raton, FL. 245p. 1995.
31. TAO, S.; LONG, A.; XU, F.; Dawson, W.. Copper speciation in the gill microenvironment of carp (*Cyprinus carpio*) at various levels of pH. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 52: 221-226, 2002.
32. CERQUEIRA, C.C.C.; FERNANDES, M.N.. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish. *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 52: 83-91, 2002.
33. HOWARTH, R.S.; SPRAGUE, J.B.. Copper lethality to rainbow trout in waters of various hardness and pH. **Wat. Res.**, 12: 455-462, 1978.

34. LI, J.; LOCK, R.A.C.; KLAREN, P.H.M.; SWARTS, H.G.P.; Schuurmans STEKHOFEN, F.M.A.H.; WENDELAAR, B S.E.; Flik, G.. Kinetics of Cu^{++} inhibition of Na^+/K^+ -ATPase. **Toxicol. Lett.**, 87: 31-38, 1996.
35. WILSON, R.W.; TAYLOR, E.W. The physiological responses of freshwater rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during acutely lethal copper exposure. **J. Comp. Physiol. B**, 163: 38-47, 1993.
36. MAZON, A.F. 1997. Efeitos do íon cobre sobre o curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de São Carlos , São Carlos, São Paulo. 160p.
37. KARAN, V.; VITORIVIC, S.; TUTUNDZIC, V.; POLEKSC, V. 1998. Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 40: 49-55.
38. ROMÉO, M.; BENNANINI, N.; GNASSIA-BARELLI, M.; LAFAURIE, M.; GIRARD, J.P.. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Aquat. Toxicol.**, 48: 185-194, 2000.
39. PEDROZO, M.F.M, Ecotoxicologia do Cobre e seus Componentes. **Caderno Referência Ambiental**. v 2, 77-99, 2001.
40. [WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Copper. Geneva: **WHO. Environmental Health Criteria 200**), 1998.
41. LAURÉN, D.J., MCDONALD, D.G. 1987. Acclimation to copper by rainbow trout, *Salmo gairdineri*: Physiology. **Can. J. Fish. Aquat. Scien.**, 44: 99-104.
42. [OHM/TADS] OIL AND HAZARDOUS MATERIALS/TECHNICAL ASSISTANCE DATA SYSTEM. Copper. Englewood: **Micromedex**, 2000. CD-ROM.

43. WAPNIR, R. A. Copper absorption and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 67S, p. 1054S-1073S, 1998.
44. LINDE, A.R.; SANCHES-GALLAN, S.; KLEIN, D.; GARCIA-VASQUEZ, E.; SUMMER, F.. Metallothionein and heavy metal in brown trout (*Salmo trutta*) and european eel (*Anguilla anguilla*): a comparative study. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v44, 168-173, 1999.
45. BARCELOUX, D. G. Copper. **Clin. Toxicol.**, v. 37, n. 2, p. 217-230, 1999.
46. DAMERON, C. T.; HARRISON, M. D. Mechanisms for protection against copper toxicity. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 67S, p. 1091S-1097S, 1998.
47. NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry, **Fourth Edition. Cambridge**, W. H. Freeman, 2004.
48. MONTELLIONE, G. T.; ANDERSON, S. Structural genomics: Keystone for a Human Proteome Project. **Nature Struct. Biol.**, 6, 11-12, 1999.
49. ADAMS, M.A., SUITS, M.D.L., ZHENG, J., JIA, Z. Piecing together the structure-function puzzle: Experiences in structure-based functional annotation of hypothetical proteins. **Proteomics**. v 7, p 2920-2932, 2007.
50. LESK, A. M., Introduction to Protein Architecture. New **York, Oxford University Press**, 2001.
51. FERSHT, A. Structure and Mechanism in Protein Science. **Cambridge**, W. H. Freeman, 1999.
52. JONES, S., THORNTON, J. M. Principles of protein-protein interactions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93, 13-20, 1996.
53. ALBERTS, B. The Cell as a Collection of Protein Machines: Preparing the Next Generation of Molecular Biologists. **Cell**. v 92, p 291-294, 1998.

54. KRAUSER, F. Detection and analysis of protein–protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes. **Electrophoresis**, v 27, p 2759-2781, 2006.
55. ROBINSON, C. V., SALI, A., BAUMEISTER, W., The molecular sociology of the cell. **Nature**, v 450, p 973-982, 2007.
56. KESKIN, O., GURSOY, A. Ma. B., NUSSIONOV,. What are the preferred ways for proteins to interact, **R. Chem. Rev.**, 108, 1225-1244, 2008.
57. BOEHR, D. D., WRIGHT, P. E. How Do Proteins Interact? **Science**, v 320, p 1429-1430, 2008.
58. ARCHAKOV, A. I., GOVORUN, V. M., DUBANOV, A. V., IVANOV, Y. D., VESELOVSKY, A. V., LEWI, P., Janssen P. Protein-protein interactions as target for drugs in proteomics. **Proteomics**, v 3, p.380-391, 2003.
59. GAVIN, A. C., BOSCHE, M., KRAUSE, R., GRANDI, P., MARZIOCH, M., BAUER, A., SCHULTZ, J., RICK, J. M., MICHON, A. M., CRUCIAT, C. M., REMOR, M., HOFERT, C., SHELDER, M., BRAJENOVIC, M., RUFFNER, H.; MERINO, A., KLEIN, K., HUDAK, M., DICKSON DICKSON D.; RUDI T.; GNAU V.; BAUCH, A.; BASTUCK, S.; HUHSE, B.; LEUTWEIN, C.; HEURTIER, M. A.; COPLEY, R. R.; EDELMANN, A.; QUERFURTH, E.; RYBIN, V.; DREWES, G.; RAIADA, M.; BOUWMEESTER, T.; BORK, P.; SERAPHIN, B.; KUSTER, B.; NEUBAUER, G.; FURGA, G. S. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexe. **Nature**, v. 415, p. 141-147, 2002.
60. VAZQUEZ, A., FLAMMINI, A., MARITAN, A., VESPIGNANI, A. N., Global protein function prediction from protein-protein interaction networks. **Nature Biotech.**, v.21, p. 697-700, 2003.

61. ZHANG, S., JIN, G., ZHANG, X. S., CHEN, L. Discovering functions and revealing mechanisms at molecular level from biological networks. **Proteomics**, v 7, p 2856-2869, 2007.
62. DROIT, A., POIRIER, G. G., HUNTER, J. M., Experimental and bioinformatic approaches for interrogating protein-protein interactions to determine protein function. **J. Mol. Endocrinol.**, v 34, p 263-280, 2005.
63. CIERO, L. Di., BELLATO, C. M., Proteoma. **Biotecnologia Ciência e desenvolvimento.**, 29 , 158-161, 2009.
64. ROBERTS, G.C., SMITH, C.W., Alternative splicing: Combinatorial output from the genome, **Curr. Opin. Chem. Biol.**, 6, 375–383, 2002.
65. LIPPARD, S. J., and BERG, J. M., Principles of Bioinorganic Chemistry, **University Science Book.**, Princeton, NJ, USA, 1994.
66. FAIBANE, A. M., WILLIAMS, D. R., The Principle of Bio-inorganic Chemistry Chemical Society Monographs for Teachers, , **The Chemical Society**, London, UK. v.31, 1981
67. HARAGUCH, H., BULL, I. Modern Methods for Trace Element Determination **Chem. Soc. Jpn.**, v.72, p.1163–1186, 1999.
68. KUNULL, I. S., Trace Metal Analysis and Speciation, **Elsevier**, Amsterdam, 1991.
69. LEHNINGER, A.L. et al. Princípios de bioquímicas. São Paulo: **SARVER.** p 839. 2000.
70. KOH, T.S., PENG, R.K., KLASING, K.C. Dietary cooper level affects copper metabolism during lipopolysaccharide-induced immunological stress in chicks. **Poultry Science**, v.75, p.867-872, 1996.

71. GYGI SP, CORTHALS GL, ZHANG Y, ROCHON Y, AEBERSOLD R. Evaluation of twodimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v 17, p 9390-5, 2000.
72. MANN, M., PANDEY A. Use of mass spectrometry-derived data to annotate nucleotide and protein sequence databases. **Trends. Biochem. Sci,** v 26, p. 54-61, 2001.
73. AEBERSOLD, R., GOODLETT, D. Mass spectrometry in Proteomics. **Chem. Rev.,** v 101, p 269-295. 2001.
74. DIAS, E C. Proteoma comparativo de medula espinhal lombar de ratos submetidos a lesão nervosa periférica durante o período pós-natal. Instituto de Biologia.. **Dissertação (Mestrado).** Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. p96, 2009.
75. LÓPEZ, J. L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.,** v 849. p 190-202, 2007.
76. MARTINS-DE-SOUZA D, GATTAZ WF, SCHMITT A, MACCARRONE G, HUNYADI-GULYÁS E, EBERLIN MN, SOUZA GH, MARANGONI S, NOVELLO JC, TURCK CW, DIAS-NETO E. Proteomic analysis of dorsolateral prefrontal cortex indicates the involvement of cytoskeleton, oligodendrocyte, energy metabolism and new potential markers in schizophrenia. **J Psychiatr Res.** V.23. 2008
77. BADOCK V, STEINHUSEN U, BOMMERT K, et al.. Prefractionation of protein samples for proteome analysis using reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Electrophoresis.** Review., v.22. pg.2856-64.. 2001
78. DUNN, M. J.,GORG, A. Weiss, M. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Gel Electrophoresis: Proteins, **BIOS, Oxford, England,** pp. 41–127, 1993.

79. GYGI, S.P., COTHALS, G. L., ZHANG, Y., ROCHAN, T., AEBERSOLD, R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 15;97(17):9390-5, 2000.
80. DUNN, M. J., GORG, A., PENNINGTON, S. R., DUNN, M. J. (Eds.), Proteomics – from protein sequence to function, **BIOS, Oxford, England**, , p. 43–63, 2001.
81. CASTELLANOS-SERRA, L., PAZ-LAGO, D., Detergents and chaotropes for protein solubilization before two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, 23, 1745–1753, 2002.
82. RABILLOUD, T. Silver staining of 2-D electrophoresis gels. **Methods Mol. Biol.** 1999, 112, 297-305.
83. SANTONI, V., RABILLOUD, T., DOUMAS, P., ROUQUI, D. et al., Two-Dimensional Electrophoresis: An Overview. **Electrophoresis**, v.20, pg.705–711. 1999.
84. LUCHE, S., SANTONI, V., RABILLOUD, T., Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. **Proteomics**, v.14. pg.249-253, 2003.
85. FAZEKAS DE ST, GROTH, S. WEBSTER, R. G., DATYNER, A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. **Biochim. Biophys. Acta** v. 71. Pg. 377–391, 1963.
86. POLAND J, RABILLOUD T, SINHA P. IN: WALKER, J.M. (Ed.), The Proteomics Handbook, **Humana Press**, Totowa 2005.
87. BINZ P. A., MÜLLER M., WALTHER, D., BIENVENUT, W. V., GRAS, R., HOOGLAND, C., BOUCHET, G., GASTEIGER, E., FABBRETTI, R., GAY, S., PALAGI, P., WILKINS, M. R., ROUGE, V., TONELLA, L., PAESANO, S., ROSSELLAT, G., KARMIME, A., BAIROCH, A., SANCHEZ, J. C., APPEL, R. D., HOCHSTRASSER D. F. A molecular scanner to automate proteomic research and to display proteome images. **Anal Chem Acta**,. v.21.pg.4981-8, 1999.

88. SITEK B, SCHEIBE B, JUNG K, SCHRAMM A, STUEHLER K. Difference Gel Electrophoresis (DIGE): the Next Generation of Two-Dimensional Gel Electrophoresis for Clinical Research. In: Marcus K, Stuehler K, van Hall A, Hamacher M et al. (Eds.), **Proteomics in Drug Research**, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 33–55, 2006.
89. BERTH, M.; MOSER, F.M.; KOLBE, M.; BERNHARDT, J., The state of the air in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 76, p. 1223-1243, 2007.
90. ERAVCI, M.; FUXIUS, S.; BROEDEL, O. WEIST, S.E.; MANSMANN, U.; SCHLUTER, H.; TIEMANN, J.; BAUMGARTNER, A. Improved comparative proteome analysis based on two-dimensional gel electrophoresis, **Proteomics.** v. 7, p. 513-523, 2007.
91. CHOE, L.H; LEE, K.H. Quantitative and qualitative of infralaboratory two-dimensional protein gel reproducibility and the effects of sample preparation, sample load, and image analysis, **Electrophoreses.** v. 24, p. 3500-3507, 2003.
92. KATSANOS, A. A. - X-Ray Methods. In: IAEA, ed. - Elemental Analysis of Biological Materials. Viena, IAEA, **Technical Reports** series no. 197, 1980 p. 231.
93. Filho V. F. N. Técnicas Analíticas Nucleares de Fluorêscencia de Raio X. Depto de Ciências Exatas/ESALQ Lab. de Instrumentação **Nuclear/CENA**. Junho 2000.
94. FLYNN, J.; STOILOVIC, M.; LENNARD, C.; PRIOR, L.; KOBUS, H. Evaluation of X-ray microfluorescence spectrometry for the elemental analysis of firearm discharge residues. **Forensic Science International**, v.97, p.21-36, 1998.
95. JANSSENS, K.; VITTIGLIO, G.; DERAEDT, I.; AERTS, A.; VEKEMANS, B.; VINCZE, L.; WEI, F.; DERYCK, I.; SCHALM, O.; ADAMS, F.; RINDBY, A.; KNOCHER, A.; SIMIONOVICI, A.; SNIGIREV, A. Use of microscopic XRF for non-destructive analysis in Art and Archaeometry. **X-Ray Spectrometry**, v.29, p.73-91, 2000.

96. BOUMANS, P., e R. KLOCKENKÄMPER, eds. - Total reflection X-ray fluorescence spectrometry. Proc. of the Second Workshop on TXRF, Dortmund, 26-27 May, 1988. **Spectrochim. Acta**, **44B**: 433, 1989.
97. IAEA - Radioisotope X-ray fluorescence Spectrometry. Viena, Internacional Atomic Energy Agency, **Technical Reports** series no.115, 102 pag. 1970
98. Eisberg, R. Resnick, R. “Física Quântica” New York, Jhon Wiley & Sons Inc., 1994)
99. Castilho, R. B. Fotoionização de produtos naturais Voláteis luz Sincrotrone e técnica de vó, Tese de D. Sc.COOPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 2006.
100. Margaritondo, G. A primer in Synchrotron Radiation:Everything you Wanted to Know About Sex. Journal of Synchrotron Radiation, v 2, p 148-157. 1995.
101. Nogueira, L. P. Quantificação Histomorfométrica Óssea a partir Microtomografia 3D por Contraste de Fases e Transmissão de Raios X Utilizando Luz Sínicroton. **Dissertação** de M. Sc.COOPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 2008.
102. SUSSULINE, A., Avaliação das Alterações Proteicos e Metaloproteínas em soja após o processo de modificação genética. **Dissertação**, M. Sc. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, São Paulo, 2007.
103. SANTOS, F. A., Determinação de Manganês e Zinco em spots proteicos de plasma de tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*) por SR-XRF e GFAAS após separação por 2D-Page. **Dissertação**, M. Sc., Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2010.
104. Welz B, Sperling M. Atomic Absorption Spectrometry, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Alemanha, 1999.

105. JACKSON KW., Electrothermal Atomization for Analytical Atomic Spectrometry, **John Wiley & Sons Ltda**, Chichester, England, 1999.
106. KOMAROMY-HILLER G. Flame, flameless, and plasma spectroscopy, **Anal. Chem.** v. 71 p.338R-342R, 1999.
107. JANUSA MA, BECK JN. Recent applications of flame atomic absorption spectrometry to environmental measurements, **Appl. Spectros. Rev.** v. 37 p.137-186, 2002.
108. LAGALANTE, A.F. Atomic absorption spectroscopy: A tutorial review, **Appl. Spectros. Rev.** v. 34 p.173-189, 1999.
109. L'VOV, B.V. Twenty-five years of furnace atomic absorption spectrometry, **Spectrochim. Acta** . v.39B p.149–157, 1984.
110. SLAVIN W, MANNING DC, CARNICK, G.R. The stabilized temperature platform furnace, **At. Spectros.** v. 2 p.137-145, 1981.
111. KOIRTYOHANN SR, KAISER, M.L. Furnace atomic absorption – a method approaching maturity, **Anal. Chem.** v. 54 p. 1515A-1524, 1982.
112. SLAVIN W, MANNING DC, CARNICK GR. The stabilized temperature platform furnace, **At. Spectros.** v.2 pg.137-145. 1981.
113. CAL-PRIETO MJ, FELIPE-SOTELO M, CARLOSENA A, ANDRADE JM, LÓPEZ-MAHÍA P, MUNIATEGUI S, PRADA D. Slurry sampling for direct analysis of solid materials by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS), A literature review from 1990 to 2000, **Talanta**. v.56 p. 1-51. 2002
114. KURFÜST U. Solid sampling analysis, Direct and Slurry sampling using GF-AAS and ETV-ICP. **Springer-Verlag**, Berlin, Alemanha, 1998.

115. ERICKSON, B.E., Graphite furnace AAS, **Anal. Chem.** v. 72 p. 543A-546A, 2000.
116. BEATY, R. D. ; KERBER, J. D. – Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry – **Perkin Elmer**, USA, 1993
117. HALL, D.J. Analytical minimalism applied to the determination of trace elements by J. Anal. At. **Spectrom.** v. 10 p. 169-175, 1995.
118. KORN, M.; PEREIRA, M. G.; BORGES, S. S., Algumas aplicações analíticas dos ultra-sons. **Boletim Técnico**, Universidade do Estado da Bahia, p. 51-55, 2001.
119. MASON, T. J.; LORIMER, J. P., **Sonochemistry**: Theory, applications and uses of ultrasound in Chemistry, New York: Ellis Horwood, p. 252, 1989.
120. KRUG, F. J. “Methods of Sample Decomposition”, In: **IV Workshop on Sample Preparation, Salvador-Brazil**, 2003.
121. VALCÁRCEL, M., “Principles of Analytical Chemistry”. Ed. **Springer-Verlag**, Berlin Heidelberg, p. 534. 43, 2000.
122. TIEHM, A., MASON, T. J., Advances in Sonochemistry – Ultrasound in Environmental Protection – New York: **Elsevier Science B.** v 6, p. 273, 2001.
123. FIGUEIRAS, A. V., CAPELO, J. L., LAVILLA, I., BENDICHO, C., 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**, v 53, p. 433-441, 2000.
124. ELIK, A. Ultrasound assisted pseud-digestion of street dust samples prior to determination by atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v 66(4), p 882-888, 2005.
125. ELIK, A.,. Ultrasound assisted leaching of trace metals from sediments as a function of pH. **Talanta**, v 71(2), p 790-794, 2007.

CAPÍTULO II

Com base na revisão bibliográfica apresentada, objetivou-se, com o presente trabalho

“Concentração de cobre em amostras de filé de tilápia do Nilo comercializados no Brasil”

- a) O presente trabalho foi determinar a concentração de cobre em amostras de filé da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) coletadas no comércio da cidade de Botucatu-Estado de São Paulo-Brasil e amostras fornecidas pelo Laboratório de Nutrição Organismos Aquáticos/FMVZ-UNEST/Botucatu-SP/Brasil, por GFAAS, e avaliar se as concentrações estão de acordo com a legislação brasileira.
- b) Desenvolvimentos de Metodologias Analíticas

O Capítulo II apresenta o trabalho que foi redigido conforme as normas do periódico.

Food Chemistry

Concentração de cobre em amostras de filé de tilápia do Nilo comercializados no Brasil

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi determinar a concentração de cobre em amostras de filé da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) coletadas no comércio da cidade de Botucatu-SP-Brasil e amostras fornecidas pelo Laboratório de Nutrição Organismos Aquáticos/FMVZ-UNEST/Botucatu-SP/Brasil. Na etapa de preparação, as amostras de filé foram liofilizadas e moídas criogenicamente até obtenção de partículas menores que 60 µm e a extração do cobre foi feita por ultra-som utilizando-se HCl 0,10 mol L⁻¹ como solução extratora. As determinações de cobre foram feitas por espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS) utilizando temperaturas de secagem de 100 °C - 250°C, temperatura de pirólise de 1400 °C, temperatura de atomização de 2400 °C e temperatura de limpeza de 2800 °C. Foi utilizado como modificador químico nitrato de paládio injetado junto com as amostras e tungstênio como modificador permanente. Entre as seis amostras de filé de tilápia coletadas foram encontradas concentrações de cobre da ordem de 0,70 a 1,60 mg kg⁻¹, valores estes considerados de acordo com a legislação brasileira, (concentrações de cobre em amostras de pescados de até 30,00 mg kg⁻¹). A exatidão e precisão das concentrações de cobre determinadas neste estudo foram avaliadas utilizando-se padrão certificado Lake Michigan Fish Tissue – NIST SRM 1947.

Palavras-chave: Nutrição de peixes; cobre em peixes; essencialidade de cobre; tilápia do Nilo; GFAAS;

Abstract

The aim of this work was to determine the copper concentrations in filet samples of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) collected in the Botucatu City - Brazil. In the samples preparation step, the samples were lyophilised and the steak was cryogenically to produce particles smaller than 60 mm and the copper extractant was carried out by ultrasound using HCl 0.10 mol L⁻¹ as extracting solution. The copper determination were carried out by GFAAS, whit a drying temperature of 100°C - 250°C, pyrolysis temperature of 1400°C, atomization temperature of 2400°C, and cleaning temperature of 2800°C. Palladium nitrate was used as a chemical modifier coinjected with the samples, and tungsten was use permanent modifier. Among the six fillet samples of Nile tilapia collected were found copper concentrations of 0.70 to 1.60 mg kg⁻¹, these values are in agreement with Brazilian law, (copper concentrations in fish samples up to 30.00 mg kg⁻¹). The accuracy and precision of the copper concentrations determined in this study were evaluated using certified standard Lake Michigan Fish Tissue - NIST SRM 1947.

Keywords: Fish nutrition; copper in fish; essentiality of copper; Nile tilapia; GFAAS

1. Introdução

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie de peixe bastante versátil na piscicultura, pois se adapta tanto ao cultivo extensivo sem qualquer tecnologia empregada, quanto ao sistema de criação em tanques-rede com rações completas com alta tecnologia de produção. Além do que é bastante apreciada pela indústria de filetagem, graças às qualidades organolépticas e à inexistência de espinhos em “Y” no seu filé [1]. Devido a seu potencial para a aquicultura, as tilápias tiveram sua distribuição expandida nos últimos 50 anos. Pelo fato de ser uma espécie apropriada para a piscicultura de subsistência, nos países em desenvolvimento, e devido à sua importância na aquicultura, muitos aspectos da nutrição desta espécie são estudados [2]. 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 de peixe [3-5].

É consenso na comunidade científica a fundamental importância dos íons metálicos para os organismos, 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 [6-8]. Por apresentarem proporções e quantidades variáveis no tecido corporal dos animais, os íons metálicos são classificados como macroelementos (elementos que o organismo necessita em grandes quantidades) e microelementos (elementos que o organismo necessita em menores quantidades). 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 [9, 10].

O cobre é um microelemento essencial na produção de hemoglobina, no funcionamento de sistemas enzimáticos, como componente de vários pigmentos do organismo, está envolvido no sistema nervoso central, no metabolismo do osso e em funções do coração. Entretanto, em concentrações elevadas esse íon metálico pode ser tóxico para o organismo [11]. Os peixes podem acumular cobre em diversos órgãos e tecidos de forma direta, a partir da água, e indireta por meio de alimentos. O acúmulo desse íon metálico pode resultar em alterações nos processos fisiológicos e bioquímicos do organismo dos peixes [12]. A taxa de acumulação de cobre pelos diferentes tecidos dos peixes (rins, fígado, baço ou músculo), depende do tempo de exposição ao ambiente contaminado e principalmente da quantidade de cobre na dieta do animal. A taxa de cobre acumulada no tecido muscular é mais preocupante porque é a principal via de contaminação da população que se alimenta da carne de peixes, o que torna fundamental o monitoramento de cobre em tecidos das espécies de peixes mais consumidas pelas populações [13, 14].

Com base no exposto, o presente trabalho apresenta os resultados obtidos na determinação de cobre em amostras de filés de tilápia do Nilo, espécie de peixe muito consumida no Brasil, produzidas em diferentes pisciculturas e coletadas em supermercados da cidade de Botucatu-SP/Brasil. E o método de extração do cobre foi determinado após a extração por ultra-som e comparado com uma ração certificada (Lake Michigan Fish Tissue-NIST SEM 1947).

2. Material e métodos

2.1. Reagentes e soluções

Água ultrapura ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida pelo sistema Elga modelo PURELAB Ultra Ionic, soluções extratoras de ácido clorídrico suprapuro Merck foram utilizados em todo o trabalho. As soluções estoque de cobre e dos modificadores químicos (paládio e tungstênio) foram preparadas por diluições de padrões titrisol 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 banho de ácido nítrico suprapuro Merck a 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

Cinco amostras de filé de tilápia do Nilo foram coletadas em supermercados da cidade de Botucatu-SP/Brasil. Uma sexta amostra foi fornecida pelo Laboratório de Nutrição Organismos Aquáticos/FMVZ-UNESP/Botucatu-SP/Brasil. Esta quinta amostra foi composta de cinco porções de filé obtidos de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com ração isenta de cobre e rações contendo 4,00, 80,00, 160,00 e 320,00 mg kg^{-1} de cobre durante 120 dias. No final desse período, os peixes alimentados de cada um dos tratamentos foram eutanaziados para retirada das amostras de filé e do fígado. As amostras de filé de tilápia obtidas comercialmente e as amostras de filé e fígado dos alevinos de tilápia alimentadas em laboratório foram transferidas para frascos de polipropileno de 50 mL e armazenadas a -20°C . Todas as amostras foram

preparadas para a etapa de extração do cobre procedendo-se inicialmente a desidratação pelo liofilizador por 48 horas e posteriormente a moagem por maceração em Grau de Porcelana na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de partículas com auxílio de uma peneira, obtivemos granulometria menor que 60 μm [14,15].

2.3. Extração do cobre

Após a etapa de secagem e moagem, aproximadamente 100 mg de amostra e 10 mL de solução 0,10 mol L⁻¹ 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 cobre, utilizando-se diferentes tempos e potência de sonicação. Os extratos ácidos obtidos foram separados da fase sólida remanescente por centrifugação (10.000 rpm, 5 minutos) e a determinação das concentrações de cobre foi feita por GFAAS. Para efeito de comparação foi feita também a extração do cobre utilizando-se a mineralização das amostras por digestão ácida (HNO₃ e HClO₄/ T° 60-80°C) [14].

2.4. Equipamentos

Para a desidratação das amostras foi utilizado liofilizador modelo CHIST-ALPHA -2-4 LD PLUS (Sistema freezer dryer), utilizando três etapas: 1° etapa: congelamento da amostra a -60°C (Freezing); 2° etapa: secagem principal -30°C/0.370 mbar (main drying); 3° etapa: secagem final -50°C/0.040 mbar, com o tempo decorrido de 48 horas.

Para determinação de cobre 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 cobre SHIMADZU, operada com 10 mA de corrente. O comprimento de onda utilizado foi de 324,7 nm e a resolução espectral foi de 0,2 nm. Argônio foi utilizado como gás inerte, mantendo-se um fluxo constante de 1 L min⁻¹ 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 cobre.

2.5. Determinação da concentração de cobre por GFAAS

2.5.1. Preparo do tubo de grafite recoberto internamente com carbeto de tungstênio

Os tubos de grafite pirolíticos com plataforma integrada utilizados nas determinações de cobre tiveram suas paredes internas recobertas com tungstênio. Para isso, alíquotas de 25 µL de solução contendo 1000 mg L⁻¹ do modificador tungstato de sódio foram injetadas dentro do atomizador, o qual em seguida foi submetido ao seguinte programa de aquecimento: 1 – Secagem: 110°C por 10 s (Rampa) e 25 s (Aquecimento), 150°C por 10 s (Rampa) e 25 s (Aquecimento); Redução: 600°C por 10 s (Rampa) e 20 s (Aquecimento), 1600°C por 10 s (Rampa) e 20 s (Aquecimento); Atomização 2400 °C por 1s (Rampa) e 5s (aquecimento); Limpeza: 2600°C por 5 s (Aquecimento). Em todas as etapas foi utilizado argônio como gás de limpeza com fluxo de 1 L min⁻¹. Esse procedimento foi repetido 20 vezes e permitiu obter uma camada de carbeto de tungstênio sobre a plataforma do tubo de grafite, que atua como modificador químico. A massa de tungstênio depositado na plataforma do tubo de grafite foi de 500 µg [14, 16-19].

2.5.2. Preparo da curva analítica

Curva analítica foi preparada utilizando-se solução padrão estoque de cobre (Merck). Para isso, volumes de 8, 16, 24, 32 e 40 μL de solução padrão de cobre contendo $250 \mu\text{g L}^{-1}$, 5 μL de ácido clorídrico suprapuro 12 mol L^{-1} , 50 μL de Triton X-100 a 1% (v/v), 100 μL de solução 1000 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 padrão ficasse igual 1000 μL e as concentrações de cobre na faixa de 2,00 a 10,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ [3].

2.5.3. Preparo dos extratos ácidos para injeção no tubo de grafite

Após o processo de extração por ultra-som, 500 μL dos extratos ácidos obtidos foram transferidos diretamente para os copos do autoamostrador do espectrômetro de absorção atômica e em seguida foram adicionados 50 μL de Triton X-100 a 1% v/v, 100 μL de solução 1000 mg L^{-1} de Pd(II) e 350 μL de água ultrapura.

2.5.4. 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 μL 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 cobre foi o seguinte: 1 – Secagem: 90°C por 10 s (Rampa), 150°C por

10 s (Rampa) e 5 s (Aquecimento), 250°C por 10 s (Rampa) e 5 s (Aquecimento); Pirólise 1400°C por 5 s (Rampa) e 10 s (Aquecimento); Atomização: 2400°C por 2 s (Rampa) e 5 s (Aquecimento); Limpeza: 2800°C por 5 s (Aquecimento). Em todas as etapas, com exceção da etapa de atomização, argônio com fluxo de 1 L min⁻¹ foi como gás de limpeza.

3. Resultados e discussão

3.1. Otimização do tempo e da potência de sonicação na extração do cobre

Diversos estudos demonstraram que as ondas ultra-sônicas promovem a extração dos analitos de uma matriz sólida devido à atuação destas sobre as moléculas orgânicas presentes na amostra, destruindo-as e provocando a quebra da ligação do metal com essas moléculas. Dessa forma, a eficiência da extração de analitos metálicos por ultra-som depende do tempo e da potência de sonicação [20 - 25]. No presente estudo foi avaliado o tempo de sonicação, aplicando uma potência constante de 170 W por 5 ciclos de 10, 20, 40 e 60 s. Observou-se que a partir de cinco ciclos de 30 s os sinais de absorbância medidos por GFAAS nas amostras permaneceram praticamente constantes. Esse tempo foi considerado suficiente para que ocorresse o fenômeno da cavitação acústica, ou o ciclo de formação, crescimento e colapso das microbolhas formadas pela propagação das ondas, responsáveis pela liberação de grande quantidade de energia na microrregião próxima da superfície da fase sólida, provocando a extração do íon metálico do material sólido [20-22].

A influência da amplitude do ultra-som foi avaliada utilizando-se 5 ciclos de 40 s de aplicação do ultra-som e variando-se a potência de sonicação em 34, 68, 102, 136, 170 e 204 W. Os resultados obtidos indicaram que a eficiência máxima do processo de

extração foi conseguida na escala de amplitude 136-240 W de potência. Optou-se então por utilizar a amplitude de 136 W de potência porque essa potência provocou um menor aumento de temperatura da solução extratora, 58°C, contra 74°C e 82°C para as amplitudes de 170 W e 202 W.

3.2. Otimização das condições experimentais para determinação de cobre por GFAAS

Curvas de pirólise e de atomização foram feitas para se determinar às temperaturas ótimas de pirólise e atomização do cobre nas soluções padrão e nos extratos ácidos das amostras de file e tecido hepático de tilápia do Nilo, utilizando-se tubo de grafite recoberto internamente com carbeto de tungstênio. A influência das temperaturas de pirólise e atomização sobre sinal de absorbância obtido para o cobre em padrão contendo 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e nos extratos ácidos das amostras de materiais biológicos, são mostradas nas Figuras 1 e 2.

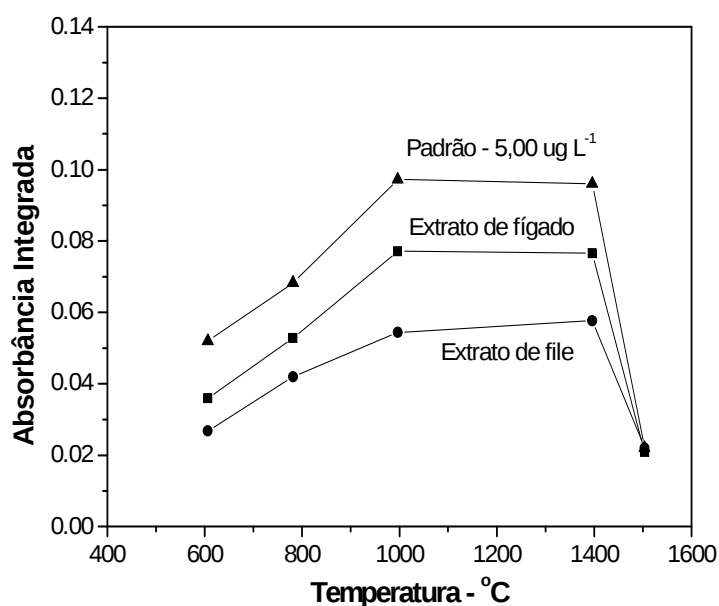


Figura 1. Curvas de temperatura de pirólise dos extratos ácidos das amostras de filé e tecido hepático de tilápia do Nilo e do padrão contendo 5,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre.

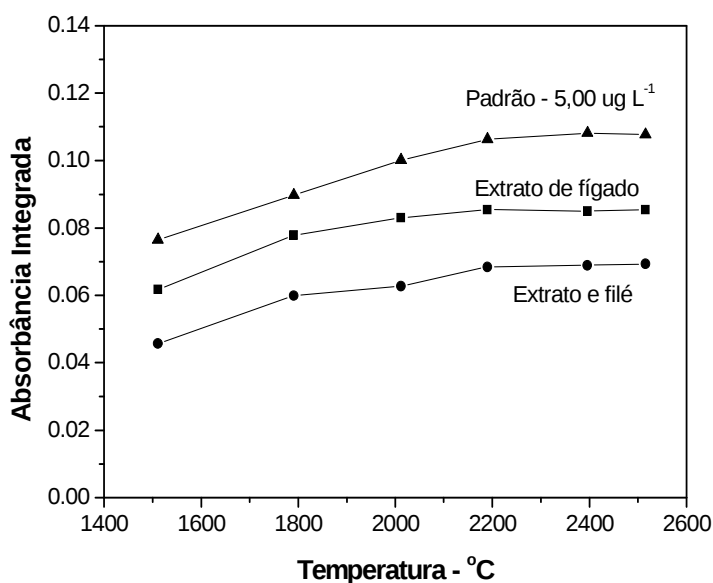


Figura 2. Curvas de temperatura de atomização dos extratos ácidos das amostras de tecido muscular e hepático de tilápia do Nilo e do padrão contendo 5,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre.

A temperatura de pirólise de 1400 °C foi escolhida, porque conforme mostra a Figura 1 os sinais de absorbância obtidos para o cobre permanecem constantes a partir de 1000 °C, sofrendo um rápido decréscimo a partir de 1400 °C, demonstrando que até esse valor de temperatura o cobre apresentou-se termicamente estável. Em relação à temperatura de atomização ilustrado na Figura 2, observa-se que os sinais de absorbância obtidos para o cobre são constantes a partir de 2200°C. Considerando esse comportamento e também porque nessa temperatura houve melhor reprodutibilidade e repetibilidade de leituras, conforme resultados obtidos em outros trabalhos, a temperatura de atomização de 2400°C foi escolhida. A boa estabilidade térmica do cobre obtida nesses experimentos demonstra a eficiência do modificador químico Pd(II) injetado junto com a amostra e do carbeto de tungstênio que atuou como modificador permanente [14,18].

3.3. Obtenção da curva analítica

Considerando-se os parâmetros físico-químicos otimizados (temperatura de pirólise e atomização), que permitiu elaborar o programa de aquecimento mostrado no item 2.5.4, foi preparada curva analítica de cobre na faixa de concentração de 2,00 – 10,00 $\mu\text{g L}^{-1}$. A Figura 3 mostra a curva analítica obtida com a sua respectiva equação da reta.

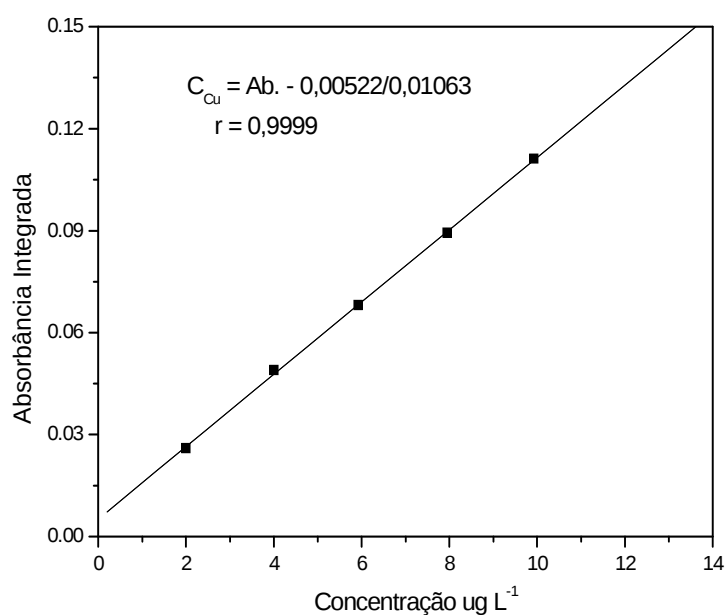


Figura 3. Curva analítica obtida a partir de soluções padrão contendo 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 e 10,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre.

Os valores obtidos nas leituras de absorvância dos padrões de cobre ($n=3$) apresentaram boa repetibilidade e reprodutibilidade (desvios padrão relativo menores que 1%), o que reforça a eficiência dos modificadores químicos, Pd(II) e carbeto de tungstênio, na estabilização térmica do cobre durante a etapa de pirólise e atomização.

programa de aquecimento utilizado. As massas características calculadas em relação ao padrão de $5,00 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre foi de 42 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 0,22 e $0,63 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre. O tempo de vida útil do tubo de grafite foi equivalente a 843 queimas, que para o método proposto é aceitável quando comparada com outros métodos descritos na literatura, considerando-se a complexidade das matrizes biológicas [26-32].

3.3. Concentração de cobre nas amostras de tecidos de tilápia do Nilo

Após a otimização do processo de extração por ultra-som e do programa de aquecimento para determinação de cobre por GFAAS, o método otimizado foi aplicado na determinação do analito em amostras de tecido filé e tecido hepático de tilápia do Nilo, adquiridas no comércio da cidade de Botucatu-SP/Brasil e fornecidas pelo Laboratório de Nutrição Organismos Aquáticos/FMVZ-UNESP/Botucatu-SP/Brasil. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos utilizando-se a mineralização ácida das amostras. A precisão e exatidão do método foram avaliadas por determinação de cobre em padrão certificado Lake Michigan Fish Tissue – NIST SRM 1947. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 1. Analisando-se os resultados da Tabela 1 observa-se que em relação às amostras de filé comerciais as concentrações apresentaram valores entre 0,700 e $1,00 \text{ mg kg}^{-1}$, valores estes bem abaixo de $30,00 \text{ mg kg}^{-1}$, valor máximo permitido pela legislação brasileira[14]. Em relação às amostras obtidas de alevinos de tilápia do Nilo alimentadas com rações suplementadas com cobre é possível observar que ocorre um aumento da concentração de cobre, 0,742 a $1,603 \text{ mg kg}^{-1}$, com o aumento da suplementação de cobre na ração, no entanto, esse aumento não

é proporcional. Por exemplo, comparando-se o valor determinado para o tratamento 1 (ração não suplementada com cobre) com o tratamento 5 (ração suplementada com 320 mg kg⁻¹ de cobre), observa-se um aumento de 2,20 vezes na concentração de cobre na amostra de filé. Este valor ainda é muito inferior ao máximo permitido pela legislação brasileira e, deve-se considerar ainda que o suplemento de cobre utilizado nesse tratamento é muito superior aos utilizadas normalmente nas pisciculturas brasileiras, que em média utilizam uma suplementação de 6,00 mg kg⁻¹ de cobre.

Tabela 1. Resultados (n=3) obtidos nas determinações de cobre em amostras de filé e tecido hepático de tilápia do Nilo e em padrão certificado Lake Michigan Fish Tissue – NIST SRM 1947.

Amostras	Extração por ultra-som (mg kg ⁻¹)	Mineralização ácida (mg kg ⁻¹)
Filé – 1*	0,821±0,027	0,806±0,022
Filé – 2*	0,942±0,031	0,940±0,028
Filé – 3*	0,778±0,017	0,773±0,016
Filé – 4*	0,923±0,043	0,920±0,037
Filé – 5*	0,703±0,019	0,706±0,015
Filé T-1**	0,742±0,021	0,739±0,019
Filé T-2**	0,992±0,030	0,987±0,028
Filé T-3**	1,435±0,045	1,432±0,041
Filé T-4**	1,593±0,051	1,589±0,046
Filé T-5**	1,603±0,053	1,600±0,048
Fígado T-1**	2,225±0,068	2,221±0,063
Fígado T-2**	3,982±0,077	3,978±0,074
Fígado T-3**	6,298±0,093	6,293±0,096
Fígado T-4**	9,774±0,112	9,771±0,116
Fígado T-5**	10,794±0,115	10,789±0,117
Padrão certificado [#]	0,410±0,012	0,412±0,013

*Amostras comerciais; **Amostras fornecidas pelo Laboratório de Nutrição Organismos Aquáticos/FMVZ - UNESP/Botucatu-SP/Brasil (T – 1: suplementado com 0,00 mg kg⁻¹ de cobre, T – 2: suplementado com 4,00 mg kg⁻¹ de cobre, T – 3: suplementado com 80,00 mg kg⁻¹ de cobre, T – 4: suplementado com 160,00 mg kg⁻¹ de cobre, T – 5: suplementado com 320,00 mg kg⁻¹ de cobre); # NIST SRM 1947 - 0.411±0.09 mg kg⁻¹.

Deve-se destacar ainda, que ocorre um aumento mais significativo da concentração de cobre com o aumento da suplementação desse mineral nas rações em relação as amostras de fígado. Por exemplo, comparando-se os valores do tratamento 1 (ração não suplementada com cobre) com o tratamento 5 (ração suplementada com 320 mg kg⁻¹ de cobre), observa-se em relação a amostra de fígado T-4 um aumento de aproximadamente cinco vezes em relação a amostra de fígado T-5. Esses resultados

estão de acordo com outros trabalhos da literatura, que indicam o fígado como o principal órgão armazenador de cobre e, que destacam também, que a concentração desse mineral pode variar de acordo com a espécie e da sua concentração na ração [33-36].

Em relação aos resultados obtidos utilizando-se os dois métodos de extração do cobre, também apresentados na Tabela 1, observa-se que estes são concordantes. Os desvios-padrão relativos calculados apresentaram-se na faixa de 1,10 a 3,50 %, mostrando que ambos os métodos apresenta boa precisão. Em relação aos resultados determinados para padrão certificado, observa-se que os valores apresentaram desvios-padrão relativos de aproximadamente 3,00%, o que caracteriza uma boa repetibilidade entre as medidas. Os valores determinados também estão bem próximos do valor certificado, comprovando assim, que ambos os métodos apresentam boa exatidão.

4. Conclusões

Com base nesses resultados pode-se concluir que as amostras comerciais de filé de tilápia do Nilo, não apresentam concentrações de cobre que possam comprometer a saúde da população consumidora do produto. Observou-se também que a ausência e utilização de superdosagem de cobre em rações para tilápia do Nilo não caracterizam aumento significativo da concentração do cobre nas amostras de filé de tilápia do nilo. No entanto, pode-se verificar que a concentração de cobre no fígado responde de forma positiva á quantidade desse mineral suplementado na ração.

Em relação ao método proposto para extração de cobre utilizando-se ultra-som, os resultados obtidos na determinação de cobre nas amostras, mostraram-se equivalentes obtidos pelo método utilizando-se a mineralização ácida das amostras. No

entanto, deve-se destacar esta metodologia diminui consideravelmente o tempo de análise, o que favorece a frequência analítica. Além disso, os resíduos químicos gerados nos extratos ácidos após a mineralização das amostras no bloco digestor, não ocorrem no processo de extração por ultra-som.

5. Referências

1. Meurer F., Hayashi C., Boscolo W. R., Soares C. M. Lipídeos na Alimentação de Alevinos Revertidos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). R. Bras. Zootec., v. 31, n.2, 566-573, 2002.
2. Wilson Rogério Boscolo W. R., Hayashi C., Fábio Meurer F. Digestibilidade Aparente da Energia e Nutrientes de Alimentos Convencionais e Alternativos para a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). R. Bras. Zootec., v.31, n.2, 539-545, 2002.
3. Sá M.V.C., Pezzato L. E., Barros M. M., Padilha P. M. Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles diets. Aquaculture 238, 385-401, 2004.
4. Sá M.V.C., Pezzato L. E., Barros M. M., Padilha P. M., Apparent absorption of zinc from supplemental inorganic and organic sources to Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles, J. World Aquacult. Soc. 36, 380-388, 2005.
5. Sá 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* fingerlings, Aquacult. Nutr. 11, 273-285, 2005.
6. Garcia J.S.; Magalhães C.S.; Arruda M.A.Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. Talanta 69, 1-15, 2006.
7. Spunar, J. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v.378, p.54-56, 2004.

8. Haraguchi, H. Metallomics as integrated biometal science. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v.19, p.5-14, 2004.
9. Hilton J. W. The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish. *Aquaculture* 79, 223-244, 1987.
10. Watanabe T., V. Kiron, S. Satoh, Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture* 151 185–207, 1997.
11. Murai T., Andrews, J. W., Smith, R. G. Effects of dietary copper on channel catfish. *Aquaculture* 22, 353-357, 1981.
12. Ogino C.; Yang, G. Y. Requirement for carp and rainbow trout for dietary manganese and copper. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 46, 455-458, 1980.
13. Knox D., Cowey, C. B., Adron, J. W. Effects of dietary copper and copper:zinc ratio on rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 27, 111-119, 1982.
14. Neves R. C. F., Moraes P. M., Silva F. A., Loureiro, V. R., Saleh M. A. D., Padilha C. C. F., Barros, M. M., Padilha P. M. Determination of copper in fish feed by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry using slurry sampling.. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety* 2, 274-279, 2008.
15. 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* 113, 679-683, 2009.
16. Moraes, P. M.; Milantonio, R. B; Cagnani, G. S.; Santos, F. A.; Padilha, C. C. F.; Lima, P. M.; Padilha P. M. Analytical procedure based on slurry sampling for determining selenium in organic vegetable samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *European Food Research and Technology* 229, 409-414, 2009.

17. Silva, F. A.; Neves, R. C. F.; Quintero-Pinto, L. G.; Padilha, C. C. F.; Jorge, S. O. 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* 68, 1542-1547, 2007.
18. Loureiro, V. R.; Saleh, M. A. D.; Moraes, P. M.; Neves, R. C. F.; Padilha, C. C. F.; Padilha P. M. Manganese Determination by GFAAS in Feces and Fish Feed Slurries. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18, 1235-1241, 2007.
19. Silva, F. A.; Padilha, C. C. F.; Pezzato, L. E.; Barros, M. M.; Padilha P. M. Determination of chromium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the apparent digestibility of nutrients in feed used in pisciculture. *Talanta* 69, 1025-1030, 2006.
20. A. Francony A., C. Pétrier C. Sonochemical degradation of carbon tetrachloride in aqueous solution at two frequencies: 20 kHz and 500 kHz. *Ultrason. Sonochem.* 3, 77-82, 1996.
21. Filgueiras A. V., Capelo J. L., Lavilla I., Bendicho C. 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, 433-441, 2000.
22. Nascentes C. C., Korn M., Arruda A. A. Z. A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables. *Microchem. J.* 69, 37-43, 2001.
23. Ruiz- Jiménez J., Luque-Garcia J. L., Luque de Castro M. D. Dynamic ultrasound-assisted extraction of cadmium and lead from plants prior to electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 480, 231-237, 2003.
24. A. Elik A. Ultrasound assisted pseudo-digestion of street dust samples prior to determination by atomic absorption spectrometry. *Talanta* 66, 882-888, 2005.

25. Elik A., Ultrasonic-assisted leaching of trace metals from sediments as a function of pH, *Talanta* 71, 790-794, 2007.
26. Rosa C. R., Moraes M., Neto J. A. G., Nóbrega J. A., Nogueira A. R. A. Effect of modifiers on thermal behaviour of Se in acid digestates and slurries of vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Food Chem.* 79, 517-523, 2002.
27. Fischer J. L., Rademeyer C. J. Kinetics selenium atomization in electrothermal atomization atomic absorption spectrometry (ETAAAS). Part 2: selenium with palladium modifiers. *Spectrochim. Acta, Part B* 53, 549-567, 1998.
28. Aleixo P. C., Nóbrega J. A., Santos D. J., 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, *Quim. Nova* 23, 310-312, 2000.
29. Minami H., Yada M., Yoshida T., Zhang Q., Inoue S., Atsuya I. Simultaneous direct determination of aluminum, calcium and iron in silicon carbide and silicon nitride powders by slurry-sampling graphite furnace AAS. *Anal. Sci.* 20, 455-459, 2004.
30. Millerihli N. I. Advances in ultrasonic slurry graphite furnace absorption atomic spectrometry. *Fresen. J. Anal. Chem.* 345, 482-489, 1993.
31. Bendicho C., Loos-Vollebregt M. T. C. Solid sampling in electrothermal atomic absorption using commercial atomize. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 6, 353-374, 1991.
32. 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. *Anal. Sci.* 12, 629-633, 1996.
33. Gatlin, D.M. et al. Effects of various levels of dietary copper and zinc of channel catfish. *Aquaculture*, 76, 127-134, 1989.
34. Knox, D. et al. Effects of dietary copper and copper and zinc ratio on rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 27, p.111-119, 1982.

35. Lanno, R.P. et al. Maximum tolerable and toxicity levels of dietary copper in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Richardson. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 49, p.257-268, 1985.
36. Murai, T. et al. Effects of dietary copper on channel catfish. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 22, p.353-357, 1981.

CAPÍTULO III

Com base na revisão literária apresentada, objetivou-se, com o presente trabalho **“Fracionamento de cobre em proteínas utilizando amostras de plasma, músculo e tecido hepático de tilápia do Nilo”**

- a) O objetivo do presente trabalho foi otimizar o fracionamento de proteínas utilizando eletroforese em amostras de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), amostras fornecidas pelo Laboratório de Nutrição Organismos Aquáticos/FMVZ-UNEST/Botucatu-SP/Brasil

- b) Mapear por (SRXRF) e quantificar (GFAAS) o cobre em spots protéicos

O Capítulo III, apresenta o trabalho que foi redigido conforme as normas do periódico. Journal of Biological Inorganic Chemistry

Fracionamento de cobre em proteínas utilizando amostras de plasma, músculo e tecido hepático de tilápia do Nilo

Resumo

No presente trabalho teve como objetivo investigar cobre em spots protéicos de amostras de plasma, tecido muscular e hepático 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 e quantitativa utilizando fluorescência de raios-X com radiação síncrotron (SRXRF) e espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS). As análises dos espectros de fluorescência indicaram a presença de cobre em três e dois spots protéicos de plasma, músculo e fígado, respectivamente. Observou-se que os íons cobre estão distribuídos em sua maioria em proteínas com massa molar menor que 54 kDa e maior que 13 kDa com pI na faixa de 5,3 a 9,3. A concentração de cobre ligado a essas proteínas foi determinada por GFAAS após a mineralização ácida dos spots protéicos, encontrando-se concentrações na faixa de 1,20 a 4,82 mg g⁻¹, respectivamente.

Palavras-chave: Metaloproteínas, 2D PAGE, SRXRF, GFAAS, tilápia do Nilo.

ABSTRACT

An investigation was made into copper in protein spots in samples of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) plasma, muscle and liver tissue obtained after protein separation by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) and subsequent qualitative and quantitative evaluation by synchrotron radiation X-ray fluorescence (SRXRF) and graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). An analysis of the fluorescence spectra indicated the presence of copper in three and two plasma, muscle and liver protein spots, respectively. The copper ions found were distributed mainly in proteins with a molar mass of less than 54 kDa and more than 13 kDa with pI in the range of 5.3 to 9.30. The copper concentration bounded to these proteins was determined by GFAAS after acid digestion of protein spots, finding concentrations ranging from 1.20 to 4.82 mg g⁻¹, respectively.

Keywords: Metalloproteins, 2D PAGE, SRXRF, GFAAS, Nile tilapia.

1. Introdução

Na nutrição de peixes, como os outros minerais, o cobre é elemento dietético essencial. Tanto a deficiência quanto o excesso desse mineral podem causar alterações nas funções fisiológicas e na resposta imunológica, aumentando a susceptibilidade do animal a infecções [1,2]. Esse mineral possui importantes funções no organismo dos peixes, sendo necessário no metabolismo de vários nutrientes e como constituinte de diversas enzimas. Destaca-se como referência de sua importância à participação como cofator, dentre outras, da enzima ALA-desidrogenase, a qual participa na síntese do complexo heme em sua incorporação no pigmento hemoglobina. Além disso, é indiretamente responsável também pela formação do colágeno e da elastina, pela conversão da tirosina em melanina em destruição de ânions superóxido que são espécies reativas do oxigênio, potencialmente destrutivos para as células [1-4].

Considerando importância dos minerais como componentes estruturais e funcionais dos organismos vivos e que uma grande parte das proteínas e enzimas requerem a presença de um íon metálico para realizarem alguma atividade biológica, levaram os pesquisadores que trabalham com aquicultura a desenvolverem trabalhos relacionados com a influência das metaloproteínas na fisiologia, genética e nutrição de peixes [4-9].

Nesse contexto, atualmente, o desenvolvimento de metodologias analíticas que permitam uma avaliação segura das metaloproteínas e/ou proteínas ligadas a metais presentes no sangue e em tecidos de animais tornou-se fundamental. Principalmente, em relação aos chamados microminerais, como o cobre, os quais apresentam faixa de essencialidade e toxicidade muito próximas e que são transportados em nível celular por diferentes proteínas. Considerando a importância que essas biomoléculas exercem sobre as atividades biológicas dos seres vivos, uma nova área científica, denominada

metalômica, foi proposta recentemente e permitiu a integração de estudos tradicionalmente analíticos com estudos inorgânicos e bioquímicos. O estudo da metalômica das diferentes espécies de peixes poderá fornecer informações valiosas sobre como um íon metálico está distribuído e coordenado às proteínas, como também da concentração individual da espécie metálica, contribuindo assim na elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais dessas biomoléculas [10-13].

Com base no exposto, o presente trabalho teve como primeiro objetivo fracionar proteínas de amostras de plasma, tecido muscular e hepático da espécie de peixe tilápia do Nilo obtidos após separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida em segunda dimensão (2D-PAGE). Como segundo objetivo foi feito a determinação qualitativa e quantitativa de cobre nos spots protéicos por fluorescência de raios-X com radiação Síncrotron e espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. Os dados obtidos no presente estudo fazem parte do estudo inicial da metalômica da tilápia do Nilo.

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: Espectrofotômetro UV/Visível, marca ThermoSpectronic, modelo Genesys 6, (Rochester, EUA), 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), 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. Ácido 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 das soluções utilizadas nas separações 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 nas determinações de proteína total foram preparadas com reagentes de pureza analítica de procedência Amersham Biosciences. 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 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 obtidos 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^{-1}) 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®, o qual continha K₂EDTA (3,0%) que foi utilizado como anticoagulante. O sangue foi então centrifugado a 13.000 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 eutanasiados 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 -80°C.

2.4. Preparação das amostras para eletroforese

As amostras de plasma sanguíneo, após procedimento de separação do sangue, 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 13.000 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.

Os extratos protéicos das amostras: plasma e tecido hepático, 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 o procedimento de remoção de albumina, os extratos contendo

as amostras plasma e tecido hepático, juntamente com o extrato protéico das amostras de tecido muscular, foram tratados com solução gelada de acetona 80% (v/v) na proporção 1:4 (amostra: acetona) para precipitação das proteínas. Essa precipitação foi conduzida durante três horas a -20°C , garantindo que a precipitação ocorresse de maneira quantitativa. Em seguida, os precipitados protéicos foram centrifugado a 10000 rpm em ultracentrífuga refrigerada (BioAgency) por 10 minutos e o sobrenadante foi retirado. Os precipitados protéicos foram lavados duas vezes com a solução de acetona gelada utilizada para a precipitação. Após estes procedimentos parte dos precipitados foi ressolubilizada em solução de NaOH a $0,50\text{ mol L}^{-1}$, para quantificação do teor total de proteínas, e outra parte foi ressolubilizada em tampão contendo uréia a 7 mol L^{-1} , tiouréia a 2 mol L^{-1} , CHAPS a 2% (m/v), anfólitos de pH 3 a 10 a 0,5% (v/v), azul de bromofenol a 0,002% e 2,8 mg de DTT, para ser utilizada nas separações eletroforéticas [16].

2.5. Determinação da concentração das proteínas totais

A concentração de proteínas totais nos extratos protéicos foi determinada de acordo com o método de Bradford [17]. Curvas analíticas de calibração foram feitas na faixa de 25 a $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ a partir de solução padrão estoque de $500\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de Albumina de Soro Bovino. O procedimento experimental conduzido em cubetas de vidro contendo $200\text{ }\mu\text{L}$ de padrão e/ou 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.

2.6. Separações eletroforéticas

Antes do início das separações eletroforéticas volumes 250 μL dos extratos protéicos (contendo 1 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de proteína total) 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 permaneceram por 12 h, a temperatura ambiente, para serem reidratadas com o extrato protéico. Além do extrato protéico foram adicionados também cerca de 900 μL de óleo mineral sobre essas fitas. Após este período, a fita reidratada foi levada ao sistema para focalização isoeletrica para corrida em primeira dimensão da eletroforese bi-dimensional, utilizando a seguinte programação de tensão [15]: Etapa 1 = 500 V, com acúmulo de 500 Vh; Etapa 2 = 1000 V, com acúmulo de 800 Vh; Etapa 3 = 10000 V, com acúmulo de 11300 Vh; Etapa 4 = 10000 V, com acúmulo de 3000 Vh.

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^{-1} , SDS 2 % (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mmol L^{-1} , 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 feita sob leve agitação em mesa agitadora [14-16].

Após a etapa de equilíbrio das fitas foi feita 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. Os 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 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, utilizando a seguinte programação [14-16]: Tensão (V) – Etapa 1 = 90, Etapa 2 = 250; Corrente elétrica (mA) – Etapa 1 = 25, Etapa 2 = 25; Potência (W) – Etapa 1 = 100, etapa 2 = 100; Tempo (h) – Etapa 1 = 0,5, Etapa 2 = 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 [18]. Os géis obtidos, feitos em triplicatas para os três tipos de amostra, foram escaneados em Scanner GE Healthcare. As imagens escaneadas foram analisadas utilizando o programa ImageMaster platinum 6.0 para se obter a correlação

entre as repetições de géis, a contagem de spots em cada réplica de gel e a estimativa da massa de proteína presente nos spots.

2.7. Determinação qualitativa de cobre por SRXRF nos spots protéicos

As determinações qualitativas de cobre nos spots protéicos das amostras de plasma 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 Cobre 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 [19].

2.8. Determinação quantitativa de cobre por GFAAS nos spots protéicos

A quantificação de cobre nos spots protéicos foi feita por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite após a separação dos spots do gel com o auxílio de uma ponteira de pipeta e posterior mineralização por digestão ácida. Nessas determinações 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 cobre SHIMADZU, operada com 10 mA de corrente. O comprimento de onda utilizado foi de 324,7 nm, com resolução espectral de 0,2 nm. Argônio foi utilizado como gás inerte, mantendo-se um fluxo constante de 1 L min⁻¹ 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 [3,4,20].

3. Resultados e discussão

3.1. Determinação da concentração de proteínas totais nas amostras

As determinações do teor total de proteína nos extratos protéicos das amostras foram feitas para se obter a melhor massa protéica a ser aplicada nos géis das corridas eletroforéticas por 2D-PAGE, levando-se em consideração a concentração do gel. Os resultados dessas determinações indicaram que os extratos protéicos das amostras de plasma, músculo e fígado continham 25,70±0,27; 25,10±0,17; 24,80±0,19 mg mL⁻¹ respectivamente.

Com base nesses resultados volumes de 10 µL dos extratos das amostras foram diluídos com água ultrapura para um volume de 250 µL e aplicados nas tiras contendo géis pré-fabricados para a etapa de IEF, o que corresponde a uma massa de aproximadamente 250 µg de proteína.

3.2. Otimização das separações eletroforéticas

Na eletroforese 2D-PAGE cada mancha no gel, ou mais comumente denominado “spot” representa uma única proteína [21]. Todas as corridas eletroforéticas dos extratos das amostras foram feitas em triplicata. Análises de correlações e a contagem do número de spots também foram feitas entre as repetições dos géis. As Figuras 1-3 mostram os géis obtidos dos extratos protéicos das amostras plasma, músculo e fígado, com os spots protéicos nos quais foram detectados cobre por SRXRF destacados com um círculo.

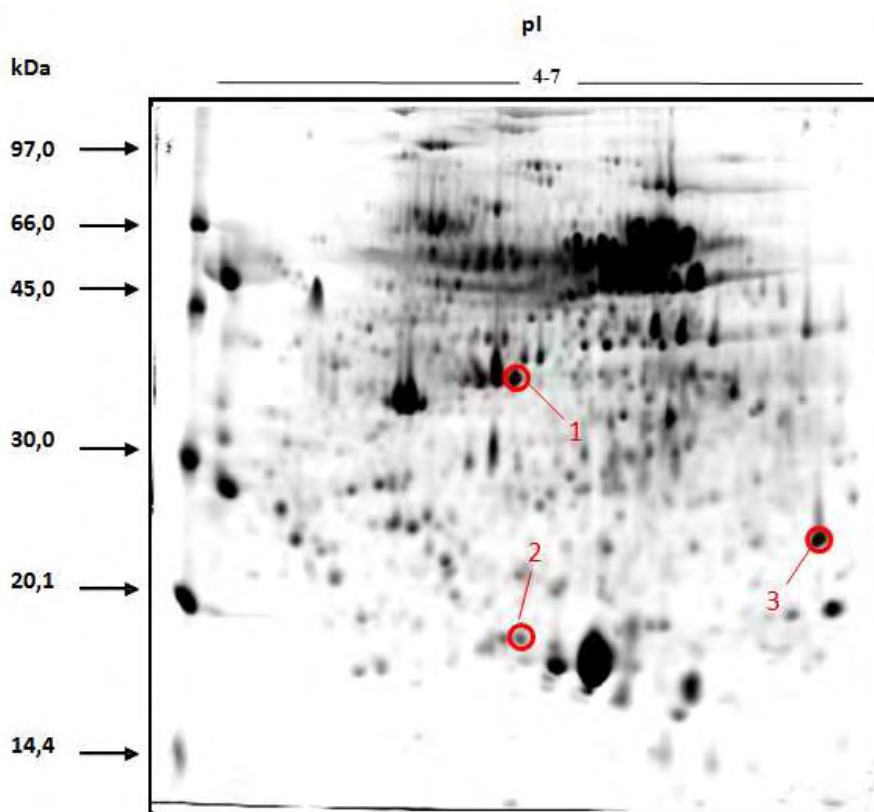


Figura 1: Gel de poliacrilamida 10% (m/v) de plasma de tilápia do Nilo com pI situado na faixa de 3 a 10 e massa molar de proteína na faixa de 20,1 a 97,0 kDa, detectados cobre por SRXRF.

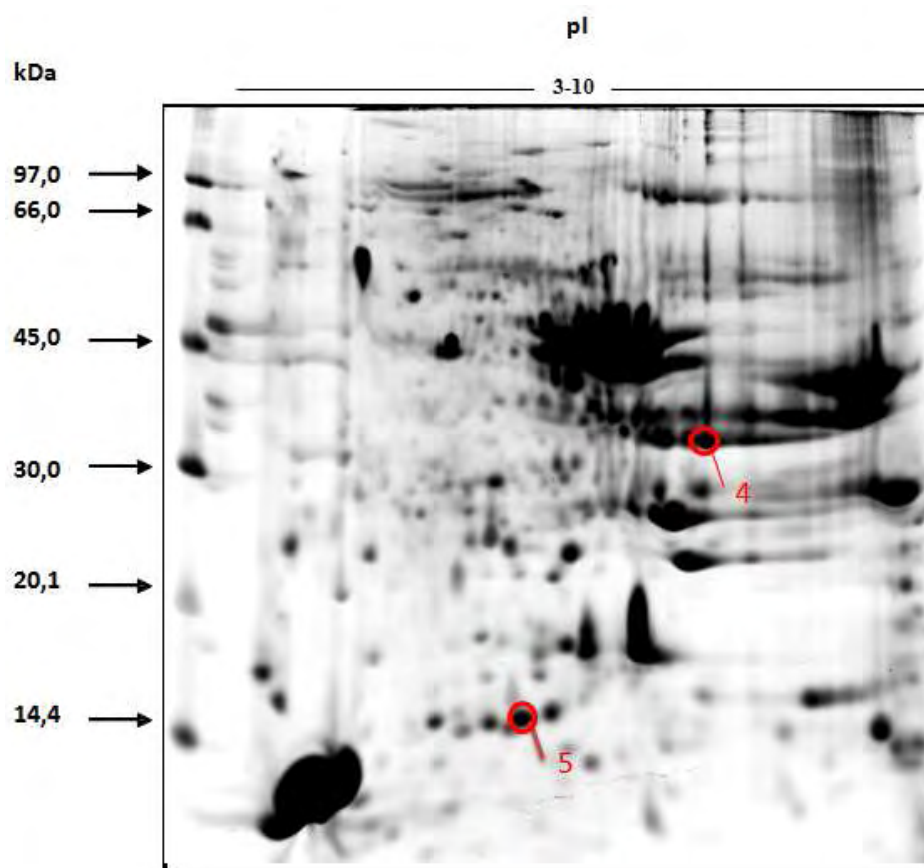


Figura 2: Gel de poliacrilamida 12% (m/v) de músculo de tilápia do Nilo com pI situado na faixa de 3 a 10 e massa molar de proteína na faixa de 14,4 a 97,0 kDa, detectados cobre por SRXRF.

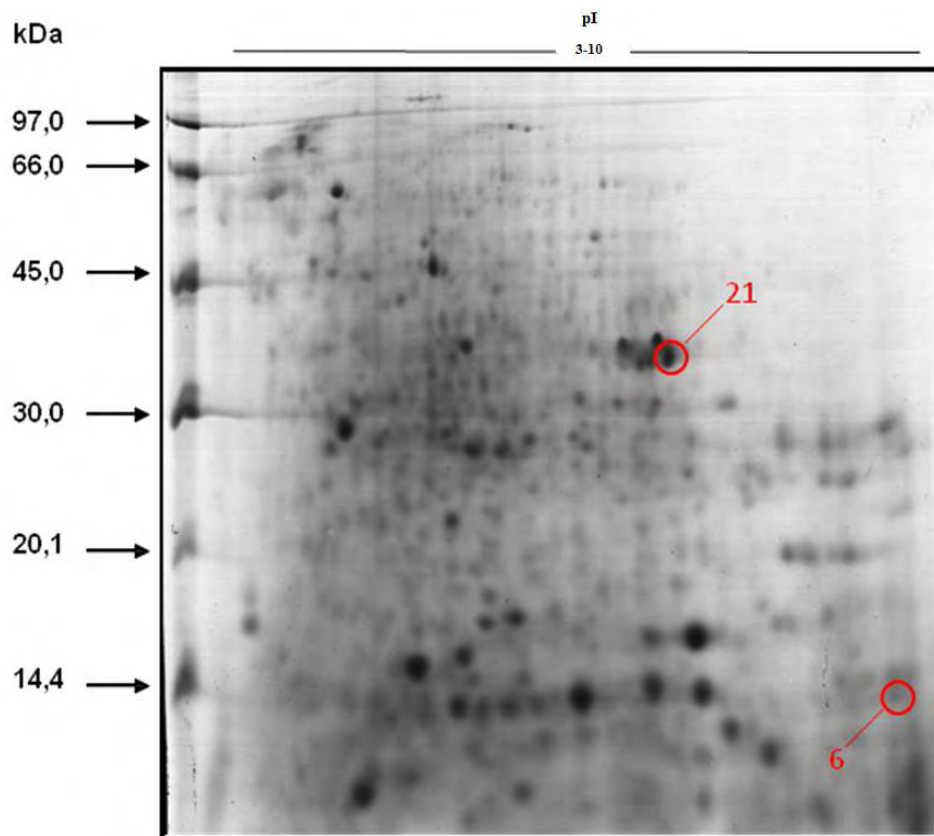


Figura 3: Gel de poliacrilamida 12% (m/v) de fígado de tilápia do Nilo com pI situado na faixa de 3 a 10 e massa molar de proteína na faixa de 14,4 a 97,0 kDa, detectados cobre por SRXRF.

Conforme mostram as Figuras 1-3, os géis dos extratos das amostras de plasma, músculo e fígado, apresentam boa resolução, o que demonstra que as separações das proteínas ocorreram de forma eficiente. Observa-se, nos três géis uma grande diversidade de spots protéicos, alguns mais intensos com pI e massa molar, entre 3,0 - 9,5 e 20,0 - 70,0 kDa; 3,5 - 9,0 e 10,0 - 70,0 kDa; 4,0 - 8,0 e 10,0 - 70,0 kDa, para os géis de plasma, músculo e fígado, respectivamente. As análises das imagens das repetições dos géis das amostras de plasma, músculo e fígado, apresentaram correlações de 89,5%, 71,7% e 66,45% com número médio de spots de 575 ± 13 , 480 ± 16 e 505 ± 12 , respectivamente.

3.3. Avaliação qualitativa de cobre por SRXRF nos spots protéicos

A avaliação qualitativa de cobre ligado às proteínas dos spots protéicos foi feita por SRXRF, considerando-se a sensibilidade dessa técnica e que possivelmente as concentrações de cobre nos diversos spots estariam na faixa de ppb e/ou ppm [22]. As Figuras 4-6 apresentam os gráficos dos espectros de fluorescência obtidos nas análises por SRXRF dos spots protéicos das amostras de plasma, músculo e fígado de tilápia do Nilo. De uma forma geral, todos os espectros obtidos nas análises por SRXRF apresentaram 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 [22,23]. Dessa forma, utilizando os valores das áreas dos picos normalizados (após desconto do branco analítico) dos espectros de SRXRF, foi possível identificar o cobre ($k_{\alpha} = 8,047$, $K_{\beta} = 8,904$) ligados às proteínas dos spots destacados com um círculo, apresentados nas Figuras 1-3.

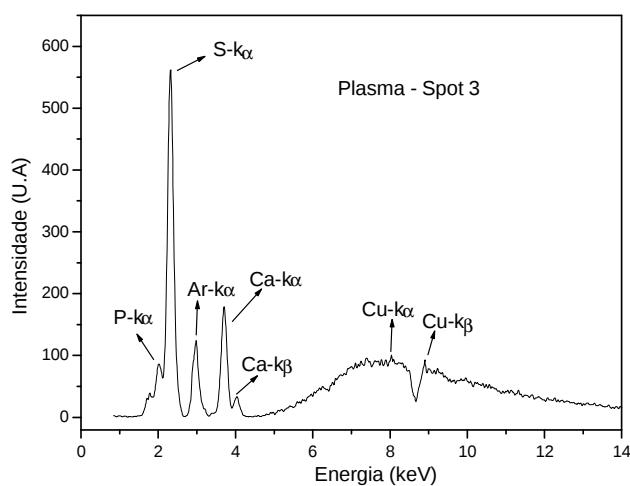
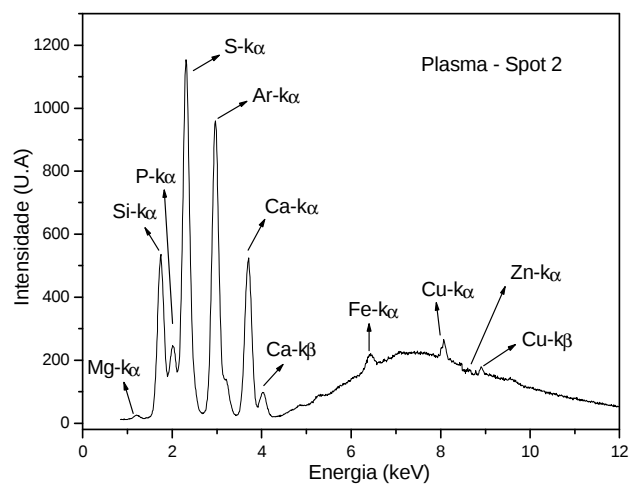
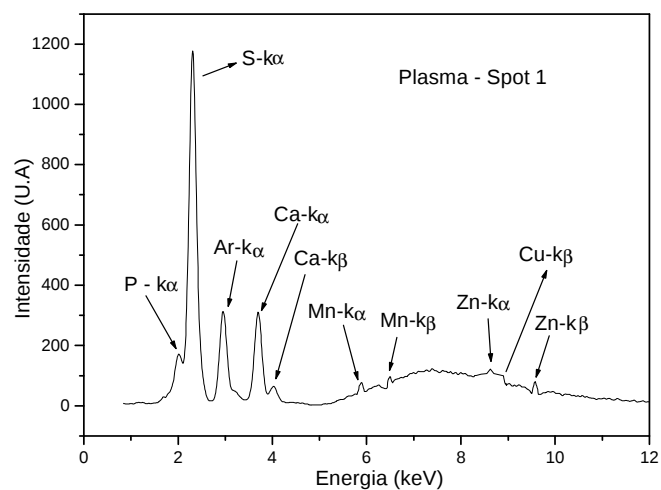


Figura 4: Espectros de fluorescência de raios-X com radiação Síncrotron obtidos para os spots protéicos 1, 2 e 3 de plasma de tilápia do Nilo.

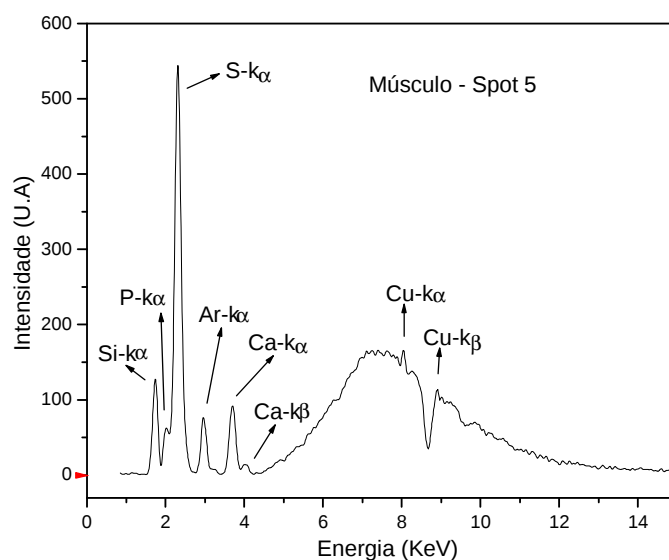
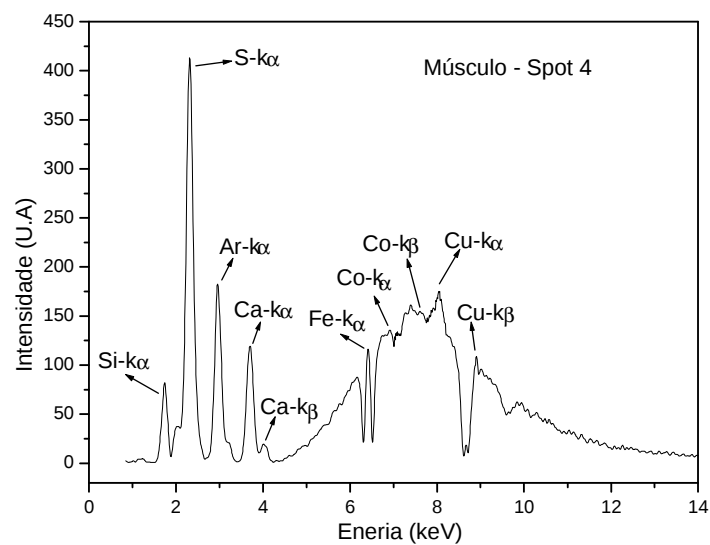


Figura 5: Espectros de fluorescência de raios-X com radiação Síncrotron obtidos para os spots protéicos 4 e 13 de músculo de tilápia do Nilo.

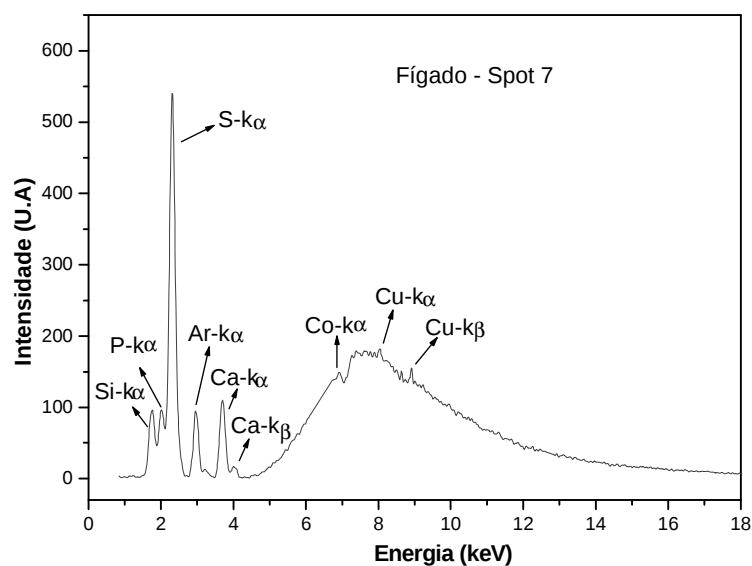
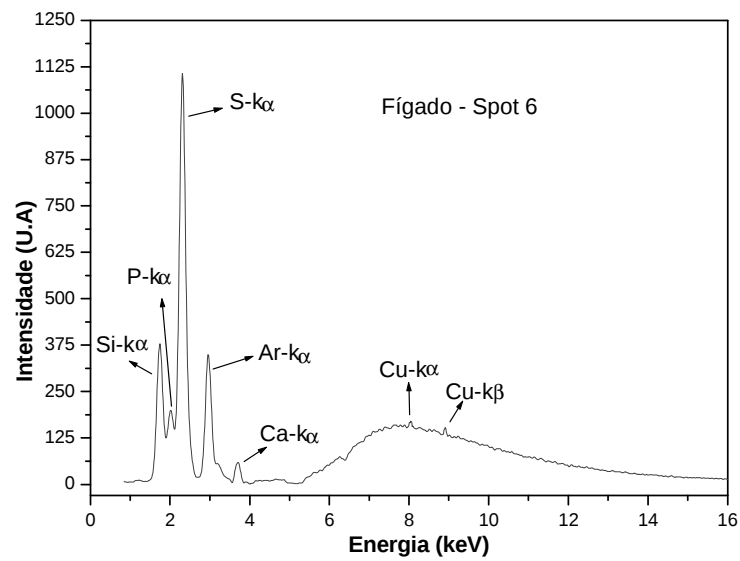


Figura 6: Espectros de fluorescência de raios-X com radiação Síncrotron obtidos para os spots protéicos 6 e 7 de fígado de tilápia do Nilo.

Como pode ser visto nos espectros das Figuras 4-6, além do cobre foi detectada a presença de enxofre e fósforo, não-metais que podem estar presentes na estrutura da proteína do spot analisado. Outros íons metálicos detectados foram o cálcio, cobalto, ferro, magnésio e zinco. A presença de mais de um íon metálico/metalóide em spots de proteínas são aceitáveis, já que uma única metaloproteína ou proteína metal ligante pode

ter vários sítios ativos formados por átomos de íons de diferentes elementos [22]. Os picos de grande intensidade relativos ao argônio ($k\alpha = 2,957$) e ao silício ($k\alpha = 1,740$), que aparecem em todos os espectros, são esperados, pois neste caso, o silício está presente na fita em que é fixados a amostra do spot protéico e o argônio está presente no ar ambiente a uma taxa constante de 0,934% v/v [23,24]. Na Tabela 1 são apresentados os spots nos quais foi identificada a presença de cobre.

Tabela 1. Massa molar (M) e ponto isoelétrico (pI) de proteínas do pool de amostras de plasma de tilápia do Nilo separadas por 2D PAGE que apresentaram cobre ligados em suas estruturas.

Amostra								
Plasma			Músculo			Fígado		
Spot	M kDa	pI	Spot	M kDa	pI	Spot	M kDa	pI
1	53,8	5,3	4	35,1	7,7	6	13,6	9,3
2	27,2	5,4	5	14,8	6,1	7	37,7	7,4
3	37,1	6,8	-	-	-	-	-	-

Com base nos resultados apresentados na Tabela 1 pode-se sugerir a presença de cobre em três spots protéicos de plasma e em dois spots protéicos de músculo e fígado. Sendo que de uma forma geral, os íons cobre identificados por SRXRF estão ligados a proteínas com uma massa molar na faixa de 54,0 a 13,0 kDa e com pI na faixa de 5,3 a 9,3.

3.4. Avaliação quantitativa de cobre nos spots protéicos das amostras

Após a identificação da presença de cobre por SRXRF nos spots protéicos das amostras por 2D PAGE, foi feita a quantificação desse elemento por GFAAS após a mineralização ácida dos spots protéicos. As concentrações de cobre nos spots protéicos foi feita considerando a estimativa da massa de proteína obtida por densidade óptica

utilizando-se o programa ImageMaster 2D Platinum versão 6.0. Na Tabela 2 são apresentadas as concentrações de cobre determinadas nos spots protéicos.

Tabela 2: Concentração de cobre e estimativa das massas de proteínas determinadas nos spots protéicos das amostras de plasma, nos quais foi detectada a presença desse elemento por SRXRF.

Amostra								
Plasma			Músculo			Fígado		
Spot	Cobre mg g ⁻¹	Proteína m*(µg)	spot	Cobre mg g ⁻¹	Proteína m*(µg)	spot	Cobre mg g ⁻¹	Proteína m*(µg)
1	1,20	2,20	4	3,50	3,10	6	4,82	1,60
2	4,52	3,40	5	4,43	1,90	7	1,80	1,40
3	3,60	2,80	-	-	-	-	-	-

*m = massa de proteína

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 2, observa-se que as concentrações de cobre determinada nos spots protéicos das amostras apresentam valores na faixa de 1,20 a 4,82 mg g⁻¹. No entanto, os resultados apresentados na Tabela 2 não fornecem muita informação porque não se sabe de quais proteínas se tratam. Dessa forma, foi feita a conversão da estimativa das massas de proteínas e das massas de cobre para quantidades de moléculas proteína e de átomos de cobre, considerando as massas molares das proteínas e do cobre e que 1 Da= 1,661.10⁻²⁴ g. Esses cálculos possibilitaram a estimativa de quantos átomos de cobre estariam presentes por moléculas de proteína [8,23]. Os resultados obtidos nesses cálculos são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Estimativa do número de moléculas de proteínas contendo cobre ligado e do número de átomos de cobre por spot protéico.

Amostra								
Plasma			Músculo			Fígado		
Spot	Número de Moléculas de Proteína (10^{13})	Número de átomos de Cu (10^{14})	Spot	Número de Moléculas de Proteína (10^{13})	Número de átomos de Cu (10^{14})	Spot	Número de Moléculas de Proteína (10^{13})	Número de átomos de Cu (10^{14})
1	2,50	0,23	4	5,30	1,03	6	7,00	0,73
2	7,50	1,50	5	7,70	0,78	7	2,20	0,24
3	4,50	0,96	-	-	-	-	-	-

Com base nos resultados apresentados na Tabela 3 foi possível estimar a proporção de cobre por molécula de proteína. Dessa forma pode-se inferir que no spot 2 da amostra de plasma cada molécula de proteína contém aproximadamente dois átomos de cobre ligados em sua estrutura. Utilizando-se esse raciocínio, pode-se inferir que em relação aos demais spots das amostras de plasma, músculo e fígado, cada molécula de proteína contém aproximadamente de um a dois átomos de cobre.

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 cobre nos spots protéicos por SRXRF e posterior quantificação desse elemento por GFAAS. A quantificação do cobre nos spots protéicos permitiu fazer uma estimativa do número de átomos desse elemento por molécula de proteína, verificando-se que todas as proteínas dos spots protéicos estudados apresentam proporções de um a dois átomos de cobre por molécula de proteína, indicando assim, que pode tratar de metaloproteínas.

5. Referências

- [1] KNOX D., COWEY, C. B., ADRON, J. W. Effects of dietary copper and copper:zinc ratio on rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 27, 111-119, 1982.
- [2] GATLIN D.M., WILSON P.W. Characterization of iron deficiency and the dietary iron requirement of fingerling channel catfish. *Aquaculture* 52, 191-198, 1986.
- [3] NEVES R. C. F., MORAES P. M., SILVA F. A., LOUREIRO, V. R., SALEH M. A. D., PADILHA C. C. F., BARROS, M. M., PADILHA P. M. Determination of copper in fish feed by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry using slurry sampling.. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety* 2, 274-279, 2008.
- [4] 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* 113, 679-683, 2009.
- [5] SA, M. V. C., PEZZATO, L. E., BARROS, M. M., PADILHA P. M. Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles diets. *Aquaculture* 238, n.1-4, 385-401, 2004.

- [6] 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* fingerlings. *Aquaculture Nutrition*, Oslo-Noruega, v. 11, n. 4, p. 273-285, 2005.
- [7] 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* 68, 1542-1547, 2007.
- [8] LOUREIRO, V. R.; SALEH, M. A. D.; MORAES, P. M.; NEVES, R. C. F.; PADILHA, C. C. F.; PADILHA P. M. Manganese Determination by GFAAS in Feces and Fish Feed Slurries. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18, 1235-1241, 2007.
- [9] SILVA, F. A.; PADILHA, C. C. F.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; PADILHA P. M. Determination of chromium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the apparent digestibility of nutrients in feed used in pisciculture. *Talanta* 69, 1025-1030, 2006.
- [10] HARAGUCHI, H. Metallomics as integrated biometal science, *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 5-14, 2004.
- [11] SZPUNAR, P. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry, *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 54-56, 2004.
- [12] GÓMEZ-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, *Anal. Chim. Acta.* 524, 15-22, 2004.
- [13] GARCIA J. S., MAGALHÃES C. S., ARRUDA M.A.Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis, *Talanta* v. 69, p. 1-15, 2006.

- [14] HAMES, B. D.; RICKWOOD, D. Gel Electrophoresis of proteins: A practical approach. 2^a ed., New York: IRL Press, 1990. 383p.
- [15] BERKELMAN, T.; STENSTEDT, T.; 2-D Electrophoresis: Principles and Methods. Uppsala: Amersham Biosciences, 1998. 101p.
- [16]. 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.
- [17]. BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*. v.72, p.248-254, 1976.
- [18]. CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, v.25, p.1327-1333, 2004.
- [19]. WESELOH, G., KUHBAKER, M., BERTELSMANN, H., OZASLAN, M., KYRIAKOPOULOS, A., KNOCH, A., BEHNE, D. Analysis of metal-containing proteins by gel electrophoresis and synchrotron radiation X-ray fluorescence. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 259, 473, 2004.
- [20]. SALEH, M. A. D.; NEVES, R. C. F.; SILVA, F. A.; MORAES, P. M.; LOUREIRO, V. R.; ROLDAN, P. S.; PADILHA, P.D. GFAAS Determination of Zinc in Fish Feed and Feces Using Slurry Sampling .. *Food Analytical Methods*, 2, 162-168, 2009.
- [21]. GARCIA, J. S., SOUSA, G. H. M. F., EBERLIN, M. N., ARRUDA, M. A. Z. Evaluation of metal-ion stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves through proteomic changes. *Metallomics*, 1, p. 107-113, 2009.

- [22]. VERBI, F. M., ARRUDA, S. C. C., RODRÍGUEZ, A. P. M., PÉREZ, C. A., ARRUDA, M. A. M. Metal-binding proteins scanning and determination by combing gel electrophoresis, synchrotron radiation X-ray fluorescence and atomic spectrometry. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, v. 62, p. 97-109, 2005.
- [23]. SUSSULINI, A. ; GARCIA, J. S. ; MESKO, M. F. ; MORAES, D. P. ; FLORES, É. M. ; PEREZ, C. A. ; ARRUDA, M. A. Z. . Evaluation of soybean seed protein extraction focusing on metalloprotein analysis. *Mikrochimica Acta*, 158, p. 173-180, 2007.
- [24]. WIND, M., LEHAMANN, W. D. Element and molecular mass spectrometry – an emerging analytical team in the life sciences. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19, p. 20-25, 2004.

Capítulo IV

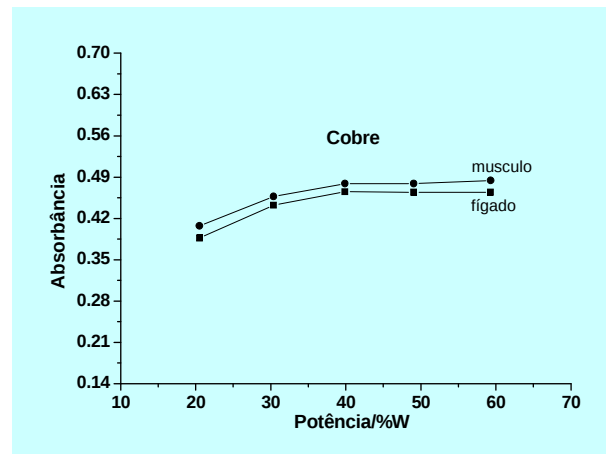
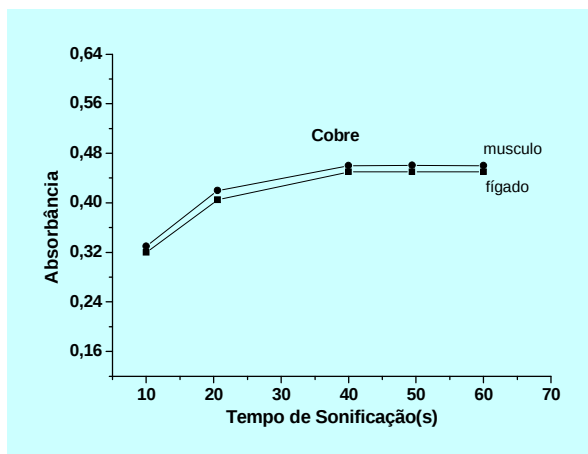
1. Implicações

Tem sido realizado um grande esforço para compreender as metaloproteínas e as proteínas ligadas a metal. Os principais objetivos consistem em identificar o ligante e determinar a estequiometria do mesmo na proteína. Incluem-se, ainda, informações a respeito das suas estruturas, sobre as funções dos sítios metálicos. Destacam-se, especialmente, a tentativa de se entender as implicações biológicas destas interações. Neste contexto, o presente trabalho mostra-se como pioneiro nos estudos metaloproteômicos em animais, mais especificamente os peixes. Assim, foi possível mapear por SRXRF cobre em spots de um pool de amostras de plasma, músculo e fígado, quantificarem esses elementos nos spots protéicos por GFAAS. Os dados quantitativos obtidos permitiram estimar o número de átomos de cobre ligados às estruturas das proteínas fracionadas por 2D PAGE.

O presente trabalho servirá de alicerce para caracterização de proteínas em animais, mais especificamente Tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*), com a possibilidade de descobrimento de novas proteínas e possíveis descobertas de função das mesmas, trazendo contribuições significativas aos estudos relacionados à fisiologia de peixe.

Anexo I

1. Otimização do tempo e da potencia de sonicação na extração do cobre em amostras de músculo e fígado, demonstrado na figura 1-2.



Anexo II

Tabela 1. Estimativa de números de átomos de cobre ligado molécula de proteína x10¹⁴

Spots	Número de Molécula de Proteína x 10 ¹³	Número de Átomos de Proteína x 10 ¹⁴	Numero de Átomos de Cu/Molécula de Proteína x 10 ¹⁴
1(plasma)	7,50	1,50	2,00
2(plasma)	4,50	1,50	3,00
3(plasma)	2,50	0,23	1,00
4(músculo)	5,30	1,03	2,00
5(músculo)	7,70	0,78	1,00
6(fígado)	7,00	0,73	1,00
7(fígado)	2,20	0,24	1,00

Anexo III

Exemplo do cálculo para a estimativa do número de mols de íons de Cu por números de mols de moléculas de proteínas para “spot” 4 músculo.

1) Determinação da massa da molécula de proteína:

$$1\text{Da} - 1,661 \times 10^{-24}\text{g}$$

$$31500\text{ Da} - X\text{ g}$$

$$X = 5,83 \times 10^{-20}\text{g}$$

2) Determinação do número de moléculas de proteína no “spot”

$$1\text{ molécula} - 5,83 \times 10^{-20}\text{g}$$

$$X\text{ moléculas} - 3,10 \times 10^{-6}\text{g}$$

$$X = 5,32 \times 10^{13}\text{ moléculas}$$

3) Determinação do número de átomos da espécie metálica (Cu)

$$3500\text{ }\mu\text{g} - 1 \times 10^6\text{ }\mu\text{g}$$

$$X - 3,1\text{ }\mu\text{g}$$

$$X = 1,09 \times 10^{-8}$$

$$63,54\text{ g} - 6,022 \times 10^{23}\text{ átomos}$$

$$1,10 \times 10^{-8} - X$$

$$X = 1,03 \times 10^{14}\text{ átomos de Cu}$$

4) Relação de números de átomos por moléculas de proteínas

$$\frac{1,03 \times 10^{14}}{5,32 \times 10^{13}} = 1,94\text{ átomos de Cu por molécula de proteína}$$

$$5,32 \times 10^{13}$$