

FRACIONAMENTO DE MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE TECIDO
MUSCULAR DE PEIXES COLETADOS NA ÁREA DE
INFLUÊNCIA DO “AHE JIRAU” – BACIA DO RIO MADEIRA
UTILIZANDO ESTRATÉGIAS METALOPROTEÔMICAS

PAULA MARTIN DE MORAES

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração Biomoléculas: estrutura e função.

Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

FRACIONAMENTO DE MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE TECIDO
MUSCULAR DE PEIXES COLETADOS NA ÁREA DE
INFLUÊNCIA DO “AHE JIRAU” – BACIA DO RIO MADEIRA
UTILIZANDO ESTRATÉGIAS METALOPROTEÔMICAS

PAULA MARTIN DE MORAES

Bióloga

PROF. DR. PEDRO DE MAGALHÃES PADILHA

Químico

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração Biomoléculas: estrutura e função.

**BOTUCATU – SP
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU – UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Moraes, Paula Martin de.

Fracionamento de mercúrio em amostras de tecido muscular de peixes coletados na área de influência do AHE Jirau – Bacia do rio Madeira utilizando estratégias metaloproteômicas / Paula Martin de Moraes. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Pedro de Magalhães Padilha

Capes: 20801009

1. Peixe - Efeito da poluição da água. 2. Eletroforese bidimensional. 3. Metaloproteínas. 4. Indicadores (Biologia). 5. Madeira, Rio (RO e AM).

Palavras-chave: Biomarcador de mercúrio; ESI MS MS; Eletroforese bidimensional; GFAAS; Metaloproteínas.

Tese elaborada sob as normas ABNT NBR 14724:2011

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE PAULA MARTIN DE MORAES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL E APLICADA, DO(A) INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU.

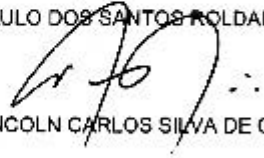
Aos 28 dias do mês de fevereiro do ano de 2014, às 08:30 horas, no(a) Sala de Defesa da Pós-Graduação, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. PEDRO DE MAGALHAES PADILHA do(a) Departamento de Química e Bioquímica / Instituto de Bociências de Botucatu, Profa. Dra. CLELIA AKIKO HIRUMA LIMA do(a) Departamento de Fisiologia / Instituto de Bociências de Botucatu, Profa. Dra. MARÍLIA AFONSO RABELO BUZALAF do(a) Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Odontologia de Bauru - Usp, Prof. Dr. PAULO DOS SANTOS ROLDAN do(a) Instituto de Química e Biotecnologia / Universidade Federal do Alagoas, Prof. Dr. LINCOLN CARLOS SILVA DE OLIVEIRA do(a) Instituto de Química / Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de PAULA MARTIN DE MORAES, intitulada "FRACIONAMENTO DE MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE TECIDO MUSCULAR DE PEIXES COLETADOS NA ÁREA DE INFLUÊNCIA DO "AHE JIRAU" - BACIA DO RIO MADEIRA UTILIZANDO ESTRATÉGIAS METALOPROTEÔMICAS". Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: **APROVADA**. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. PEDRO DE MAGALHAES PADILHA


Profa. Dra. CLELIA AKIKO HIRUMA LIMA


Profa. Dra. MARÍLIA AFONSO RABELO BUZALAF


Prof. Dr. PAULO DOS SANTOS ROLDAN


Prof. Dr. LINCOLN CARLOS SILVA DE OLIVEIRA

AUXÍLIOS FINANCEIROS

Projeto regulamentado pela Agência Nacional de Energia Elétrica - ANEEL e desenvolvido no âmbito do Programa P&D da Energia Sustentável do Brasil S.A.

P&D: 6631-0001/2012
Contrato Jirau 004/13



FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Processos: 2009/54856-8 (DD) e 2010/51332-5



CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Processo: FCT 270/11



CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Processo: 472388/2011-8



FUNDIBIO – Fundação do Instituto de Biociências



PROPG – Pró-Reitoria de Pós-Graduação



DEDICATÓRIA

Aos meus pais Carlos Alberto e Maria da Graça,
aos meus irmãos José Murilo e Denise, e meu filhote Eros,
à minha família de sangue e àquela outra que adquiri ao longo da vida.

FRASES

“Para acumular conhecimento, acrescente uma coisa nova todos os dias. Para acumular sabedoria, descarte algo todos os dias.”

Lao-Tsé

“Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou TV. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar o calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser; que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver.”

Amyr Klink

“Só é digno da liberdade, como da vida, aquele que se empenha em conquistá-la.”

Johann Wolfgang von Goethe

AGRADECIMENTOS

São tantos a quem devo grande reconhecimento e o meu “muito obrigada”, que talvez seja impossível citar um por um! Mas essencialmente, devo agradecer a Deus pelo dom da vida, pelas graças alcançadas, por me guiar nesta longa caminhada, por me amparar toda vez que precisei e por ter me dado oportunidades que me moldaram e que hoje fazem de mim a pessoa que me tornei.

Agradeço imensamente aos meus pais, meus irmãos, meus tios e tias, minha avó, e toda a família, pelo carinho constante, por sempre me apoiar em minhas escolhas e por acreditar que nada é em vão! Minha família me ensinou diversos valores que levo comigo onde quer que eu vá!

Agradeço aos meus amigos, de Jundiaí, de Botucatu, de Lisboa, e de todos os cantos que eu já passei... por conviverem e caminharem comigo, de perto ou de longe, pelas conversas e pela motivação que tanto me incentivou a continuar caminhando e lutando pelos meus ideais. Obrigada pelos vários momentos de alegria em cada pequeno reencontro, pois sem amigos o fardo fica pesado demais para carregar!

Agradeço a cada um do laboratório de Bioanalítica, que além da ajuda e dos esforços sempre somados, a convivência diária tornou possível criarmos vínculos que ultrapassam qualquer resultado de pesquisa. Afinal, não são só as contribuições científicas que foram aproveitadas em todo esse tempo.

Agradeço ao meu orientador, pois sem ele nada disso teria se concretizado. Além da convivência, trabalho e amizade, estes oito anos ao teu lado foram de grandes aprendizagens... Não é fácil expressar o quanto foi gratificante ter sido sua aluna desde a iniciação científica até a pós-graduação; ter passado por inúmeras fases de desenvolvimento; e principalmente por ter atingido esta meta proposta, já que algumas vezes a dúvida se fez presente. Entre diversas lições, artigos, relatórios e prestações de contas, estivemos sempre tocando em frente. Obrigada pela confiança e pelos desafios!

Agradeço a colaboração de cada docente, desta e de outras instituições, que permitiu a realização de todas as etapas que englobaram esta pesquisa, além da oportunidade de participar de outros projetos até no exterior.

Agradeço à UNESP, principalmente ao Instituto de Biociências de Botucatu, por ter me acolhido como aluna desde os passos iniciais na academia até a conclusão deste doutorado; e à cada um dos professores que contribuíram para minha formação como bióloga.

Agradeço às agências de fomento que proporcionaram auxílio financeiro para a execução total deste projeto de pesquisa; em especial, agradeço à FAPESP pelos recursos aprovados que possibilitaram meu crescimento científico e profissional ao longo de todo o doutorado; à FUNDIBIO pelo suporte financeiro para participações em congressos e realizações de experimentos em outros laboratórios; e à CAPES pelo financiamento do estágio de doutorado em Portugal.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Paula Martin de Moraes

Data de nascimento: 06 de maio de 1983

Naturalidade: Morungaba/SP

E-mail: paulamartin.bio@gmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2010 – 2014 Doutorado em Biologia Geral e Aplicada
UNESP – Instituto de Biociências de Botucatu

2010 – 2010 Bacharelado em Ciências Biológicas
UNESP – Instituto de Biociências de Botucatu

2005 – 2009 Licenciatura em Ciências Biológicas
UNESP – Instituto de Biociências de Botucatu

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigos Publicados

1. **MORAES, P. M.**; SANTOS, F. A.; CAVECCI, B.; PADILHA, C. C. F.; VIEIRA, J. C. S.; ROLDAN, P. S.; PADILHA, P. M. GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon, Brazil. *Food Chemistry*, v. 141, p. 2614-2617, 2013.
2. SILVA, F. A.; CAVECCI, B.; BALDASSINI, W. A.; LIMA, P. M.; **MORAES, P. M.**; ROLDAN, P. S.; PADILHA, C. C. F.; PADILHA, P. M. Selenium fractionation from plasma, muscle and liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Food Measurement and Characterization*, v. 7, p. 158-165, 2013.
3. **MORAES, P. M.**; SANTOS, F. A.; PADILHA, C. C. F.; VIEIRA, J. C. S.; ZARA, L. F.; PADILHA P. M. A preliminary and qualitative metallomics study of mercury in the muscle of fish from Amazonas, Brazil. *Biological Trace Element Research*, v. 150, p. 195-199, 2012.
4. NEVES, R. C. F.; LIMA, P. M.; BALDASSINI, W. A.; SANTOS, F. A.; **MORAES, P. M.**; CASTRO, G. R.; PADILHA, P. M. Fracionamento de cobre em proteínas do plasma, músculo e fígado de tilápia do Nilo. *Química Nova*, v. 35, p. 493-498, 2012.

5. SANTOS, F. A.; LIMA, P. M.; NEVES, R. C. F.; **MORAES, P. M.**; PÉREZ, C. A.; SILVA, M. A. O.; ARRUDA, M. A. Z.; CASTRO, G. R.; PADILHA, P. M. Metallomic study of plasma samples from Nile tilapia using SR-XRF and GFAAS after separation by 2D PAGE: Initial results. *Microchimica Acta*, v. 173, p. 43-49, 2011.
6. PADILHA, C. C. F.; **MORAES, P. M.**; GARCIA, L. A.; POZZI, C. M. C.; LIMA, G. P. P.; VALENTE, J. P. S.; JORGE, S. M. A.; PADILHA, P. M. Evaluation of Cu, Mn and Se in vegetables using ultrasonic extraction and GFAAS quantification. *Food Analytical Methods*, v. 4, p. 319-325, 2011.
7. SILVA, F. A.; PADILHA, C. C. F.; CASTRO, G. R.; ROLDAN, P. S.; NOGUEIRA, A. R. A.; **MORAES, P. M.**; PADILHA, P. M. Selenium determination on tissue samples of Nile tilapia using ultrasound-assisted extraction. *Central European Journal of Chemistry*, v. 9, p. 119-125, 2011.
8. NEVES, R. C. F.; **MORAES, P. M.**; FERRARI, J. E. M.; LIMA, P. M.; SANTOS, F. A.; CASTRO, G. R.; BARROS, M. M.; PADILHA, P. M. Levels of cooper in Nile tilapia from Brazil. *Food Addiction Contaminants B*, v. 4, p. 238-243, 2011.
9. SANTOS, F. A.; NEVES, R. C. F.; LIMA, P. M.; **MORAES, P. M.**; PÉREZ, C. A.; CASTRO, G. R.; PADILHA, P. M. Metalloproteomic study of manganese and zinc in plasma sample of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using 2D PAGE and SR XRF. *Activity Report (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron)*, v. 1, p. 4-7, 2010.
10. SALEH, M. A. D.; NEVES, R. C. F.; **MORAES, P. M.**; LIMA, P. M.; SANTOS, F. A.; SILVA, F. A.; PADILHA, P. M. Iron determination by FAAS in fish feed and feces after ultrasound-assisted extraction. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, v. 3, p. 108-113, 2009.
11. NEVES, R. C. F.; **MORAES, P. M.**; SALEH, M. A. D.; LOUREIRO, V. R.; SILVA, F. A.; BARROS, M. M.; PADILHA, C. C. F.; JORGE, S. M. A.; PADILHA, P. M. FAAS determination of metal nutrients in fish feed after ultrasound extraction. *Food Chemistry*, v. 113, p. 679-683, 2009.
12. SALEH, M. A. D.; NEVES, R. C. F.; SILVA, F. A.; **MORAES, P. M.**; LOUREIRO, V. R., ROLDAN, P. S.; PADILHA, P. M. GFAAS determination of zinc in fish feed and feces using slurry sampling. *Food Analytical Methods*, v. 2, p. 162-168, 2009.

13. **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 & Technology*, v. 229, p. 409-414, 2009.
14. **MORAES, P. M.**; LOUREIRO, V. R.; PADILHA, P. M.; NEVES, R. C. F.; SALEH, M. A. D.; SANTOS, F. A.; SILVA, F. A. Determinação de fósforo biodisponível em rações de peixes utilizando extração assistida por ultra-som e espectrofotometria no visível. *Química Nova*, v. 32, p. 923-927, 2009.
15. LIMA, P. M.; NEVES, R. C. F.; PÉREZ, C. A.; ARRUDA, M. A. Z.; **MORAES, P. M.**; BARBOSA, H. B.; SANTOS, F. A.; PADILHA, P. M. Mapping of calcium, iron and zinc in protein spots in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver tissue by SR XRF. *Activity Report (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron)*, v. 1, p. 1-2, 2009.
16. 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*, v. 2, p. 274-279, 2008.
17. LOUREIRO, V. R.; SALEH, M. A. D.; **MORAES, P. M.**; NEVES, R. C. F.; SILVA, F. A.; PADILHA, C. C. F.; PADILHA, P. M. Manganese determination by GFAAS in feces and fish feed slurries. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, p. 1235-1241, 2007.

Indicadores Quantitativos

Publicações em periódicos: 17

Trabalhos apresentados em Congressos: 50

Participações em Congressos: 18

Outras informações relevantes

- Somatório de índices de impacto das revistas com trabalhos publicados nos últimos 8 anos: 21,689.

- Número total de citações nos últimos 8 anos: na *Web of Science*: 42 (Índice h=4); no *Scopus*: 66 (Índice h=5); no *Google Scholar*: 94 (Índice h=6).

RESUMO

FRACIONAMENTO DE MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE TECIDO MUSCULAR DE PEIXES COLETADOS NA ÁREA DE INFLUÊNCIA DO AHE JIRAU – BACIA DO RIO MADEIRA UTILIZANDO ESTRATÉGIAS METALOPROTEÔMICAS

Autor: Paula Martin de Moraes

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

Inserido na realidade de contaminação dos rios amazônicos pelo mercúrio, este trabalho busca, por meio do estudo metaloproteômico, a identificação e a caracterização de proteínas do tecido muscular de três espécies diferentes de peixes do rio Madeira que possam atuar como possíveis biomarcadores da toxicidade deste elemento na região de influência do Aproveitamento Hidrelétrico de Jirau (AHE JIRAU). As estratégias para este estudo foram separadas em três componentes distintos: de seletividade, de sensibilidade e estrutural. Ao longo desta pesquisa, diferentes metodologias foram empregadas nessas etapas para o estudo metaloproteômico: componente de seletividade – 2D PAGE no fracionamento bidimensional das proteínas; componentes de sensibilidade – SR XRF e GFAAS para identificação e quantificação do mercúrio nos spots proteicos, respectivamente; componente estrutural – ESI MS MS na caracterização das proteínas identificadas com mercúrio em sua estrutura. As espécies de peixes estudadas foram: dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*), pacu (*Mylossoma* sp., *Myleus* sp.) e jaraqui (*Semaprochilodus* sp.). Entre os resultados obtidos, a 2D PAGE se mostrou eficiente no fracionamento proteico do tecido muscular de peixes. Utilizando análises qualitativas por SR XRF foi possível identificar a presença de mercúrio no spot 68 da dourada (massa molar 20,8 kDa e pI 5,6) e no spot 72 do pacu (massa molar 19,8 kDa e pI 7,5). Determinações por GFAAS permitiram a quantificação do mercúrio no tecido muscular e em 28 spots, que apresentaram concentrações de 11,3 a 41,2 mg g⁻¹ de mercúrio em sua composição; esses resultados possibilitaram o cálculo da estimativa do número de átomos de mercúrio por molécula de proteína entre os spots estudados. Após análise por ESI MS MS, foi possível caracterizar oito proteínas com diferentes isoformas em 21 spots que apresentaram pI de 3,5 a 9,8 e massa molar entre 9,9 e 18,1 kDa, indicando que estas proteínas podem ser possíveis candidatas a biomarcador de mercúrio em amostras de peixes da região amazônica.

ABSTRACT

MERCURY FRACTIONATION IN MUSCLE TISSUE FROM FISHES COLLECTED IN THE AREA OF INFLUENCE OF “JIRAU POWER PLANT” – BASIN MADEIRA RIVER USING METALOPROTEOMICS STRATEGIES

Author: Paula Martin de Moraes

Adviser: Dr. Pedro de Magalhães Padilha

Inserted in the context of mercury contamination of Amazonian rivers, this work pursues through metaloproteomic study the identification and characterization of proteins from muscle tissue of three different species of fish from Madeira River that may act as potential biomarkers of toxicity of this element in the region of influence of “Jirau Power Plant”. The strategies for this study were separated into three distinct components: selectivity, sensitivity and structural. Throughout this research, different methodologies were used in these steps for metaloproteomic study: component of selectivity – 2D PAGE in two-dimensional proteins fractionation; components of sensitivity – SR XRF and GFAAS for mercury identification and quantification in protein spots, respectively; structural component – ESI MS MS in the characterization of proteins identified with mercury in its structure. The species studied were: “dourada” (*Brachyplatystoma rousseauxii*), “pacu” (*Mylossoma* sp., *Myleus* sp.) and “jaraqui” (*Semaprochilodus* sp.). Among the results, the 2D PAGE proved efficient in protein fractionation of fish muscle tissue. Using qualitative analysis by SR XRF was possible to identify the presence of mercury in the spot 68 of “dourada” (molar mass of 20.8 kDa and pI 5.6) and spot 72 of “pacu” (molar mass of 19.8 kDa and pI 7.5). Determinations by GFAAS allowed the mercury quantification in muscle tissue and in 28 spots that showed concentrations from 11.3 to 41.2 mg g⁻¹ of mercury in its composition; these results enabled an estimative calculation of the number of mercury atoms per protein molecule between the spots studied. After analysis by ESI MS MS it was possible to characterize eight proteins with different isoforms in 21 spots that showed pI 3.5 to 9.8 and molar mass between 9.9 and 18.1 kDa, indicating that these proteins may be potential candidates for mercury biomarkers in fish samples from Amazon region.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xvi
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE FIGURAS	xx
 INTRODUÇÃO	 1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
 CAPÍTULO 1 - ABORDAGEM METALOPROTEÔMICA QUALITATIVA DO MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE TECIDO MUSCULAR DE PEIXES DO RIO MADEIRA – RO	 9
1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Pesca nos Rios Amazônicos	10
1.2. Contaminação das águas por mercúrio	11
1.3. Biomagnificação do Hg na cadeia alimentar	11
1.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida – 2D PAGE	13
1.4.1. Separação de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida	14
1.4.2. Tratamento de imagens	15
1.5. Fluorescência de raios-X com radiação Síncrotron	16
2. PARTE EXPERIMENTAL	18
2.1. Equipamentos e Acessórios	18
2.2. Reagentes e Soluções	18
2.3. Trabalho de Campo	20
2.3.1. Coleta e preparo das amostras	20
2.4. Preparação das Amostras para Eletroforese	21
2.4.1. Extração das Proteínas	21
2.4.2. Precipitação e Ressolubilização das Proteínas	21
2.4.3. Quantificação de Proteínas Totais	21
2.5. Separações Eletroforéticas	22
2.6. Tratamento de imagens dos géis – ImageMaster 2D Platinum 7.0	23
2.7. Investigação qualitativa de mercúrio nos spots proteicos por SR XRF	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
3.1. Determinação da concentração das proteínas totais nas amostras	24
3.2. Otimização das Separações Eletroforéticas	25
3.3. Detecção e Seleção dos Spots	27
3.4. Identificação de mercúrio nos spots proteicos por SR XRF	29
4. CONCLUSÕES	31
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

CAPÍTULO 2 – DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO TOTAL EM AMOSTRAS DE TECIDO MUSCULAR DE PEIXES DO RIO MADEIRA - RO E DE SPOTS PROTEICOS POR GFAAS UTILIZANDO MINERALIZAÇÃO ÁCIDA ASSISTIDA POR BANHO DE ULTRASSOM 35

1. INTRODUÇÃO	36
1.1. Metodologias utilizadas na determinação de mercúrio	37
1.2. Princípios e fundamentos da espectrometria atômica	39
1.2.1. Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite	42
2. PARTE EXPERIMENTAL	45
2.1. Reagentes e Soluções	45
2.2. Equipamentos e Acessórios	45
2.3. Mineralização das amostras	45
2.4. Determinação do mercúrio por GFAAS	46
2.4.1. Preparo da curva analítica	46
2.4.2. Procedimentos analíticos na amostra	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1. Determinação da concentração de mercúrio total nas amostras	47
3.2. Otimização das condições instrumentais para determinação de mercúrio por GFAAS	48
3.3. Obtenção da curva analítica	49
3.4. Figura de mérito do método proposto para determinação de mercúrio	51
4. CONCLUSÕES	52
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

CAPÍTULO 3 – ESTUDO METALOPROTEÔMICO QUANTITATIVO DO MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE TECIDO MUSCULAR DE PEIXES DO RIO MADEIRA – RO 56

1. INTRODUÇÃO	57
1.1. Proteínas: Aspectos Gerais	57
1.1.1. Organização Estrutural das Proteínas	58
1.2. Procedimentos de Extração e Precipitação de Proteínas	64
1.2.1. Aspectos Gerais	64
1.2.2. Extração de Proteínas	65
1.2.3. Estratégias utilizadas na precipitação de proteínas	66
1.3. Metalômica: aspectos gerais e estratégias de estudo	69
1.3.1. Proteômica	71
1.3.2. Metalômica	72
1.3.3. Componente estrutural dos estudos proteômicos e metalômicos	73
1.3.3.1. Digestão trípica	73
1.3.3.2. Espectrometria de massas	74
1.3.3.2.1. MALDI-TOF MS	74
1.3.3.2.2. ESI MS MS	76

2. PARTE EXPERIMENTAL	77
2.1. Equipamentos e Acessórios	77
2.2. Reagentes e Soluções	77
2.3. Preparação das Amostras para Eletroforese 2D PAGE	78
2.3.1. Extração das proteínas	78
2.3.2. Precipitação Fracionada e Ressolubilização das Proteínas	79
2.3.3. Determinação de proteína total	79
2.4. Corridas Eletroforéticas	80
2.5. Determinação de mercúrio total	81
2.6. Determinação de macro e microminerais no tecido muscular	82
2.7. Digestão trípica dos spots proteicos para caracterização por ESI MS MS	82
2.8. Caracterização das proteínas por ESI MS MS	85
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
3.1. Determinação da concentração de proteína total	86
3.2. Fracionamento das proteínas por 2D PAGE	86
3.3. Avaliação quantitativa de mercúrio e de macro e microminerais	89
3.4. Caracterização dos spots proteicos por ESI MS MS	95
4. CONCLUSÕES	104
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

APÊNDICE 1 – A PRELIMINARY AND QUALITATIVE METALLOMICS STUDY OF MERCURY IN THE MUSCLE OF FISH FROM AMAZONAS, BRAZIL	111
--	------------

APÊNDICE 2 – GFAAS DETERMINATION OF MERCURY IN MUSCLE SAMPLES OF FISH FROM AMAZON, BRAZIL	117
--	------------

APÊNDICE 3 – CÁLCULOS ESTEQUIOMÉTRICOS: RELAÇÃO DE ÁTOMOS DE MERCÚRIO POR MOLÉCULAS DE PROTEÍNA	122
--	------------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% Vol	volume normalizado de um spot no gel
°C	grau Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
1D	uma dimensão
2D	duas dimensões
2D PAGE	eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida
3D	três dimensões
Å	angstrom
AAS	espectrometria de absorção atômica
AEBSF	cloridrato de fluoreto de 2,4-(aminoetil) benzenossulfonilo
AHE	aproveitamento hidrelétrico
ANEEL	Agência Nacional de Energia Elétrica
Au	ouro
AXIL	programa de normalização dos picos obtidos por SR XRF
bits	unidade de informação computacional e digital
BG	background
Ca	cálcio
C	carbono
(CH₃)₂Hg	dimetil mercúrio
CH₃Hg⁺	metil mercúrio
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propano sulfonato
cm	centímetro
CO	monóxido de carbono
CO₂	dióxido de carbono
CVAAS	espectrometria de absorção atômica por vapor frio
CVAFS	espectrometria de fluorescência atômica por vapor frio
Da	Dalton (1 Da = 1,661 x 10 ⁻²⁴ g)
d.i.	diâmetro interno
DNA	ácido desoxirribonucleico
DORM 4 NRC	padrão certificado de proteína de peixe
DTT	1,4-ditiotreitol
eV	eletrovolt
ESI MS MS	espectrometria de massas em sequência com ionização por eletrospray
FAAS	espectrometria de absorção atômica com atomização por chama
FAES	espectrometria de emissão atômica com atomização por chama
Fe	ferro

FIA	análise por injeção em fluxo
g	grama
GFAAS	espectrometria de absorção atômica em forno de grafite
h	hora
Hg	mercúrio
Hg⁰	mercúrio metálico ou elementar
Hg⁺²	mercúrio iônico ou mercúrico
IEF	focalização isoeletrica
IT	<i>íon trap</i>
J	joule
K	Kelvin
K	potássio
kDa	quiloDalton (1 Da = 1,661 x 10 ⁻²⁴ g)
keV	quiloeletrovolt
kg	quilograma
kV	quilovolt
L	litro
LC	cromatografia líquida
LOD	limite de detecção
LOQ	limite de quantificação
m	metro
MΩ	megaohm
m₀	massa característica
mA	miliampère
MALDI-TOF MS	espectrometria de massas por tempo de voo com ionização por desorção a laser assistida por matriz
Mg	magnésio
mg	miligrama
min	minutos
mL	mililitro
Mm	massa molar
mmol	milimol
mm	milímetro
m/m	relação massa/massa
m/v	relação massa/volume
m/z	relação massa/carga
N	nitrogênio
N₂	gás nitrogênio
Na	sódio
NaOH	hidróxido de sódio

ng	nanograma
nm	nanômetro
NO₂	dióxido de nitrogênio ou óxido nítrico
O₂	gás oxigênio
O₃	ozônio
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pd	paládio
pg	picograma
pH	potencial hidrogeniônico
pI	ponto isoelétrico
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonilo
ppb	parte por bilhão
Q	quadrupolo
r	coeficiente de correlação linear
RO	estado federativo de Rondônia
rpm	rotações por minuto
s	segundos
SDS	dodecil-sulfato de sódio
SDS PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida em uma dimensão
SO₂	dióxido de enxofre
spot	banda 2D de proteínas
SR TXRF	espectrometria de fluorescência de reflexão total de raios-X por radiação síncrotron
SR XRF	espectrometria de fluorescência de raios-X com radiação síncrotron
S – S	ligação dissulfeto
STPF	forno de grafite de plataforma com temperatura estabilizada
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N,N',N,N'-tetrametiletilenodiamina
THGA	tubo de grafite com aquecimento transversal
tif	formato de arquivo de imagem
TOF	tempo de voo
Tris-HCl	tris(hidroximetil)aminometano ácido
UPLC	cromatografia líquida de ultra performance
UV	ultravioleta
V	volt
v/v	relação volume/volume
Vh	volt-hora
XRF	espectrometria de fluorescência de raios-X
W	watts
Zn	zinco

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – Principais substâncias utilizadas na solubilização de proteínas	15
TABELA 1.2 – Análise de correlação entre os géis de músculo de dourada (<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>)	26
TABELA 1.3 – Análise de correlação entre os géis de músculo de pacu (<i>Mylossoma</i> sp., <i>Myleus</i> sp.)	27
 TABELA 2.1 – Razão N^*/N_0 e a dependência com a temperatura e o comprimento de onda	41
TABELA 2.2 – Programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para determinação de mercúrio nos extratos ácidos obtidos das mineralizações das amostras de tecido muscular de peixes e spots proteicos	47
 TABELA 3.1 – Agentes precipitantes mais utilizados na precipitação de proteínas	66
TABELA 3.2 – Análise de correlação entre os géis obtidos no fracionamento das proteínas nas amostras de tecido muscular de peixes	89
TABELA 3.3 – Resultados obtidos na determinação de mercúrio nos <i>pellets</i> de maior e menor massa molar (Mm) e nas amostras de tecido muscular	90
TABELA 3.4 – Resultados obtidos na determinação de micro e macrominerais nos <i>pellets</i> de maior e menor massa molar (Mm) e nas amostras de tecido muscular de dourada, pacu e jaraqui	91
TABELA 3.5 – Valores obtidos na determinação da concentração de mercúrio por GFAAS nos spots proteicos das amostras de tecido muscular de dourada, pacu e jaraqui	93
TABELA 3.6 – Estimativa do número de átomos de mercúrio por molécula de spot proteico das amostras de tecido muscular de dourada, pacu e jaraqui	94
TABELA 3.7 – Proteínas identificadas utilizando ESI MS MS nas amostras de tecido muscular de dourada	97
TABELA 3.8 – Proteínas identificadas utilizando ESI MS MS nas amostras de tecido muscular de pacu	98
TABELA 3.9 – Proteínas identificadas utilizando ESI MS MS nas amostras de tecido muscular de jaraqui	99

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Concentração de mercúrio total em amostras de água dos principais rios amazônicos	3
FIGURA 2 – Concentração de mercúrio total em amostras de sedimentos coletados no rio Negro, rio Madeira e no complexo do AHE Jirau-RO	3
FIGURA 1.1 – Pontos de coleta na Bacia do rio Madeira	20
FIGURA 1.2 – Gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) de músculo de dourada com pI de 3 a 10 e massa molar de proteína entre 14,4 e 97,0 kDa. Spot 68 detectado com mercúrio por SR XRF	25
FIGURA 1.3 – Gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) de músculo de pacu com pI de 3 a 10 e massa molar de proteína entre 14,4 e 97,0 kDa. Spot 72 detectado com mercúrio por SR XRF	26
FIGURA 1.4 – (A) Detecção dos spots no gel de amostra de músculo de dourada; (B) ampliação em 3D da região selecionada do gel, para a verificação dos spots previamente detectados e selecionados	28
FIGURA 1.5 – Espectro de SR XRF obtido do spot proteico 68 do pool de amostras de tecido muscular de dourada (<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>)	29
FIGURA 1.6 – Espectro de SR XRF obtido do spot proteico 72 do pool de amostras de tecido muscular de pacu (<i>Mylossoma sp.</i> , <i>Myleus sp.</i>)	30
FIGURA 2.1 – Diagrama dos componentes básicos do espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite ...	41
FIGURA 2.2 – Etapa de secagem da amostra no programa de aquecimento para determinação por GFAAS	42
FIGURA 2.3 – Etapa de pirólise da amostra no programa de aquecimento para determinação por GFAAS	42
FIGURA 2.4 – Etapa de atomização da amostra no programa de aquecimento para determinação por GFAAS	43
FIGURA 2.5 – Etapas envolvidas no programa de aquecimento para determinação de metais/metaloídes por GFAAS	43
FIGURA 2.6 – Curvas de temperatura de pirólise dos extratos ácidos das amostras de tecido muscular e spots proteicos e de solução padrão contendo 1,00 µg L ⁻¹ de mercúrio	48
FIGURA 2.7 – Curvas de temperatura de atomização dos extratos ácidos das amostras de tecido muscular e spots proteicos e de solução padrão contendo 1,00 µg L ⁻¹ de mercúrio	48
FIGURA 2.8 – Curva analítica obtida a partir de soluções padrão aquosas contendo 0,25; 0,50; 1,00; 1,50 e 2,00 µg L ⁻¹ de mercúrio	50
FIGURA 3.1 – Esquema da estrutura primária de uma proteína	59
FIGURA 3.2 – Reação de formação da ligação peptídica de uma proteína	59

FIGURA 3.3 – Formação de peptídeos com estruturas primárias diferentes	60
FIGURA 3.4 – Representação da estrutura primária do peptídeo Ala-Ser (AS)	60
FIGURA 3.5 – Configuração trans e cis da ligação peptídica. O carbono da ligação peptídica é representado pela esfera preta no centro da figura, ligado ao oxigênio (esfera rosa), ao nitrogênio (esfera azul) e ao hidrogênio (esfera branca)	61
FIGURA 3.6 – Estrutura da α -hélice destacando a disposição helicoidal da cadeia e sua estabilização por formação de pontes de hidrogênio intramolecular ou intracadeia, representada por tracejados de cor rosa	62
FIGURA 3.7 – Estrutura da β -conformação ou folha β -pregueada, destacando-se a estabilização dessa estrutura por pontes de hidrogênio intercadeia e a posição dos grupos da cadeia lateral dispostos acima e abaixo do plano da folha	62
FIGURA 3.8 – Estrutura terciária apresentando ligações peptídicas α -hélice e folha β	63
FIGURA 3.9 – Estrutura quaternária da hemoglobina, proteína formada com quatro subunidades: $\alpha_1 + \alpha_2$ e $\beta_1 + \beta_2$	64
FIGURA 3.10 – Efeito da concentração em porcentagem de sulfato de amônio na precipitação de proteínas	68
FIGURA 3.11 – Representação dos processos que ocorrem durante a MALDI	75
FIGURA 3.12 – Ilustração do processo de formação de íons numa fonte de eletrospray	77
FIGURA 3.13 – Gel de poliacrilamida 15% (m/v) de músculo de dourada (A), de pacu (B) e de jaraqui (C) obtidos nas condições de corrida 2D PAGE utilizadas na primeira etapa do trabalho (Capítulo 1)	81
FIGURA 3.14 – Gel a 15% (m/v) obtido por 2D PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido muscular de dourada. Os números e círculos em vermelho indicam os spots que foram identificados com presença de mercúrio e caracterizados por ESI MS MS	87
FIGURA 3.15 – Gel a 15% (m/v) obtido por 2D PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido muscular de pacu. Os números e círculos em vermelho indicam os spots que foram identificados com presença de mercúrio e caracterizados por ESI MS MS	88
FIGURA 3.16 – Gel a 15% (m/v) obtido por 2D PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido muscular de jaraqui. Os números e círculos em vermelho indicam os spots que foram identificados com presença de mercúrio e caracterizados por ESI MS MS	88

INTRODUÇÃO

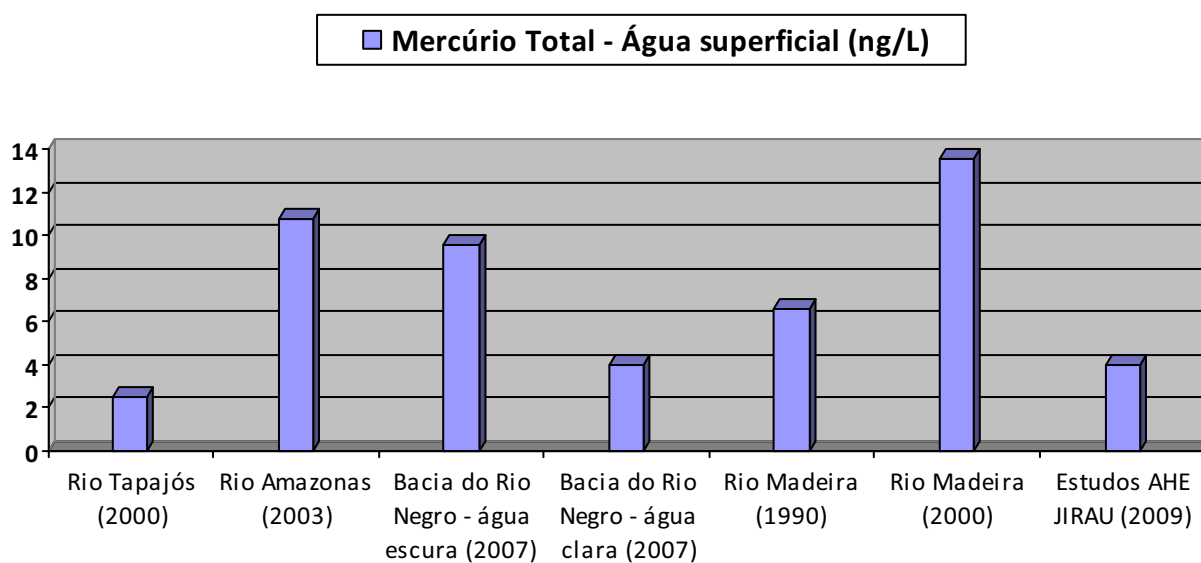
INTRODUÇÃO

As represas desempenham um papel importante no desenvolvimento social e econômico de muitos países. Hoje, quase metade dos rios do mundo tem pelo menos uma grande represa e um terço dos países depende de usinas hidrelétricas para produzir mais da metade da sua eletricidade. Atualmente, existem cerca de 45.000 grandes represas em todo o globo, com os maiores potenciais hidrelétricos situados em grandes bacias como a do Amazonas, do Congo e do Mekong. Só no Brasil existem mais de 500 hidrelétricas e isto representa apenas 24% de todo o potencial hidroenergético estimado para o país. Entretanto, a construção de represas pode facilitar o desenvolvimento e a disseminação de doenças até o momento não endêmicas, devido às mudanças bruscas no ecossistema. Além disso, a fragmentação social resultante de grandes represas pode acarretar efeitos adversos na saúde das comunidades locais [1, 2].

O desenvolvimento de complexos hidrelétricos na bacia do rio Madeira tem despertado discussões científicas sobre os possíveis processos de remobilização e biodisponibilidade das espécies de mercúrio em reservatórios da região Amazônica. Estudos em diversos reservatórios brasileiros, tanto no Sudeste como na Amazônia, têm demonstrado que o mercúrio associado ao material particulado em suspensão, sedimentos e plâncton, apresenta-se especialmente em sua forma inorgânica. A forma inorgânica ocorre principalmente no início (montante) dos reservatórios, enquanto a forma orgânica ocorre como um gradiente crescente de importância e, ao longo do tempo, atinge maiores valores nas áreas mais profundas, próximas à barragem [2].

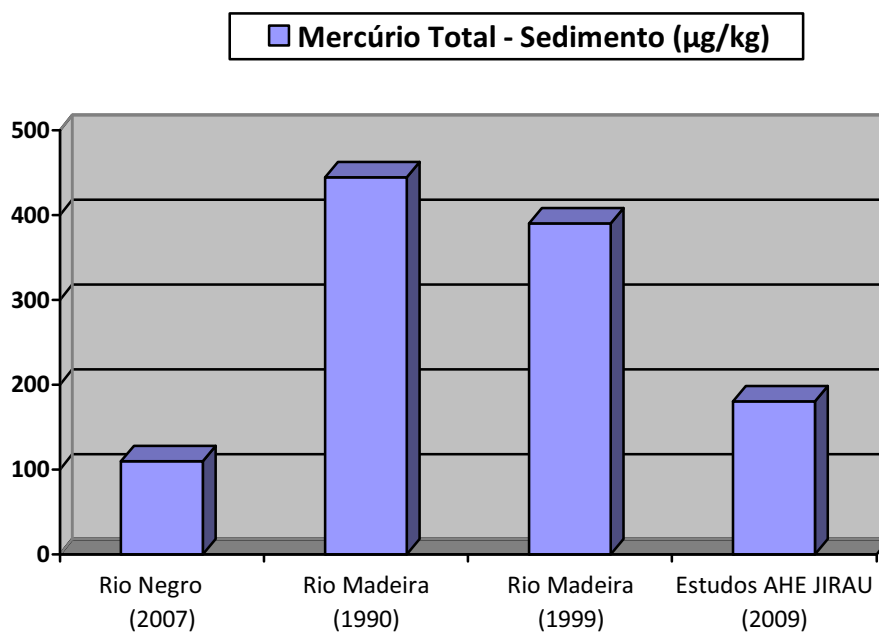
A poluição química e biológica na bacia do rio Madeira está entre os principais problemas socioambientais da Amazônia, podendo, neste aspecto, ser entendida como região que agrega características de laboratório natural, cujo estudo poderá ser referência para a Amazônia brasileira. A contaminação pelo mercúrio, que marcou a Amazônia na década de 80 até meados de 90, volta a ser cenário de discussão devido aos passivos ambientais deixados pela atividade de garimpagem de ouro e pelo potencial de contaminação que estes passivos representam para a sociedade. A construção e implementação do Aproveitamento Hidrelétrico Jirau (AHE JIRAU) na bacia do rio Madeira poderá, em virtude das alterações ambientais, alterar a dinâmica do mercúrio nesse compartimento ambiental [2-4]. As Figuras 1 e 2 mostram as concentrações médias de mercúrio total determinadas em 2009 na bacia do rio Madeira, região do complexo AHE Jirau [3].

Figura 1 – Concentração de mercúrio total em amostras de água dos principais rios amazônicos.



Fonte: Adaptado de *Bastos et al.*, 2009 [3].

Figura 2 – Concentração de mercúrio total em amostras de sedimentos coletados no rio Negro, rio Madeira e no complexo do AHE Jirau-RO.



Fonte: Adaptado de *Bastos et al.*, 2009 [3].

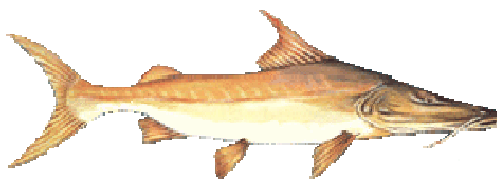
Observa-se que as concentrações de mercúrio têm se mantido dentro dos níveis naturais dos rios amazônicos, no entanto, sabe-se que as transformações e os processos de remobilização das espécies mercuriais até então indisponíveis, podem alterar sua forma química, disponibilizando-as para o meio aquático [3, 4].

Na Amazônia os altos teores de mercúrio encontrados em solo, sedimentos, peixes e humanos, inicialmente foram atribuídos à atividade de garimpos de ouro, entretanto, estudos recentes mostraram que as altas concentrações de mercúrio nos compartimentos bióticos e abióticos são também encontradas em regiões sem fontes antrópicas. O fato é que, independentemente da fonte de contaminação, estudos relacionados à elucidação dos mecanismos de toxicidade do mercúrio são de fundamental importância para o desenvolvimento socioambiental da região amazônica [4-8].

Nesse contexto, o desenvolvimento de biomarcadores relacionados ao mapeamento e expressões de proteínas associadas ao mercúrio poderá indicar previamente possíveis riscos de contaminação do pescado e à exposição humana, devido às alterações da qualidade da água em reservatórios; podendo assim, resguardar a população ribeirinha das áreas de influência direta e indireta dos empreendimentos hidrelétricos na região amazônica.

A metaloproteômica – área científica proposta recentemente – integra estudos analíticos e bioquímicos, contemplando o fracionamento e a caracterização de proteínas associadas a metais. Esta nova área do conhecimento científico tem contribuído para o esclarecimento dos aspectos fisiológicos e funcionais das metaloproteínas responsáveis pelo transporte de íons metálicos nos organismos vivos [9, 10]. A identificação de biomarcadores de toxicidade do mercúrio utilizando a metaloproteômica está associada às proteínas transportadoras desse elemento que possam apresentar aumento ou diminuição de expressão, frente às alterações das características limnológicas e disponibilidades das espécies mercuriais no ambiente. Dessa forma, informações importantes poderão ser obtidas em relação à elucidação dos mecanismos de absorção desse metal potencialmente tóxico pela biota aquática e pelos seres humanos.

Três espécies de peixes foram escolhidas para o estudo metaloproteômico do mercúrio, considerando seus níveis tróficos e, também por se tratarem de espécies bastante consumidas pela população ribeirinha. As espécies de peixes são: dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*), pacu (*Mylossoma* sp., *Myleus* sp.) e jaraqui (*Semaprochilodus* sp.).



Dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*)

Ordem: Siluriformes; Família: Pimelodidae.

Fonte: *Google imagens* [11].

Espécie de grande porte; é um peixe de couro, liso, sem escamas, com corpo alongado e cabeça achatada. Apresenta coloração prateada na cabeça e o corpo claro com reflexos dourados, longos lobos na nadadeira caudal e barbilhões curtos. É uma espécie carnívora e predadora, atacam vorazmente cardumes de peixes menores, principalmente peixes de escamas. Realiza longas migrações reprodutivas, percorrendo distâncias superiores a 4 mil quilômetros, desde o estuário amazônico até a área pré-andina na Colômbia, Peru e Bolívia. Após a desova rio acima, as larvas são carregadas rio abaixo pela correnteza, alcançando a região estuarina - habitat de crescimento desses alevinos. A espécie tem importância comercial em diversas áreas da Amazônia e é muito apreciada para a culinária.



Pacu (*Mylossoma* sp., *Myleus* sp.)

Ordem: Characiformes; Família: Characidae.

Fonte: *Google imagens* [12].

Pacu é o nome geral dado a várias espécies semelhantes da família Characidae, sendo dificilmente identificados até a espécie com precisão. São peixes de escamas, o corpo é alto e comprimido lateralmente, com formato arredondado. A cabeça e a boca são pequenas, com maxilar inferior proeminente, apresentando fortes dentes molariformes. As escamas são diminutas, dando um aspecto prateado. A coloração varia de espécie para espécie, mas normalmente apresentam o ventre mais claro, podendo apresentar manchas variadas no corpo e nadadeiras coloridas. É uma espécie onívora, com tendência à herbivoria; alimentando-se principalmente de frutos, sementes, algas e mais raramente, peixes, moluscos e crustáceos. Na Amazônia, são importantes na pesca de subsistência e pesca comercial local.



Jaraqui (*Semaprochilodus* sp.)

Ordem: Characiformes; Família: Prochilodontidae.

Fonte: *Google imagens* [13].

São peixes de médio porte, atingindo tamanho máximo de 24-30 cm. Nas nadadeiras caudal e anal apresentam faixas transversais de coloração amarela e preta, alternadamente. Como característica principal da família Prochilodontidae, são peixes de hábito bentopelágico e apresentam grandes lábios móveis, com várias fileiras de dentes falciformes, que permitem “raspar” a matéria orgânica de várias superfícies. Portanto, grande parte da sua dieta é detritívora; alimentando-se de microorganismos associados ao sedimento e algas. Os cardumes vivem se deslocando pelo canal para desovar ou à procura de novas áreas para alimentação e dispersão. Na região amazônica, a preços populares, a espécie é facilmente encontrada em todas as feiras, mercados e restaurantes.

Com base no exposto, a presente tese foi dividida em três capítulos: **Capítulo 1** – apresenta os dados obtidos de estudo metaloproteômico qualitativo utilizando Eletroforese Bidimensional em Gel de Poliacrilamida (2D PAGE) como componente de seletividade no processo de fracionamento de proteínas das amostras de tecido muscular de dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) e pacu (*Mylossoma* sp., *Myleus* sp.) e Espectrometria de Fluorescência de Raios-X com Radiação Síncrotron (SR XRF) como componente de sensibilidade no mapeamento de mercúrio nos spots obtidos no fracionamento das proteínas. Os resultados desse capítulo foram publicados no periódico *Biological Trace Element Research* em setembro de 2012 (Apêndice 1); **Capítulo 2** – apresenta os resultados obtidos na otimização de metodologia de mineralização ácida assistida por banho de ultrassom para quantificação de mercúrio por Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS) das amostras de tecido muscular de dourada, pacu e jaraqui e dos spots proteicos obtidos no fracionamento de proteínas dessas amostras por 2D PAGE. Parte dos resultados desse capítulo foram publicados no periódico *Food Chemistry* em maio de 2013 (Apêndice 2); e **Capítulo 3** – apresenta os resultados obtidos no estudo metaloproteômico quantitativo utilizando 2D PAGE assistida por precipitação fracionada, como componente de seletividade, no processo de fracionamento do mercúrio das amostras de tecido muscular de dourada, pacu e jaraqui. GFAAS foi utilizada como

componente de sensibilidade na determinação quantitativa de mercúrio nos spots obtidos no fracionamento das proteínas. E finalmente, as proteínas dos spots proteicos nos quais foi determinada a presença de mercúrio foram caracterizadas por Espectrometria de Massas em Sequência com Ionização por Eletrospray (ESI MS MS), técnica utilizada como componente estrutural. Os resultados obtidos nesse capítulo serão submetidos para publicação no periódico *Microchimica Acta*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BASTOS, W. R.; LACERDA, L. D. A contaminação por Mercúrio na bacia do Rio Madeira: Uma breve revisão. *Geochimica Brasiliensis*, v. 18, p. 99-114, 2004.
- [2] BASTOS, W. R.; GOMES, J. P. O.; OLIVEIRA, R. C.; ALMEIDA, R.; NASCIMENTO, E. L.; LACERDA, L. D.; SILVEIRA, E. G.; PFEIFFER, W. C. Mercury in the environment and riverside population in the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 368, p. 344-351, 2006.
- [3] BASTOS, W. R.; ALMEIDA, R.; ZARA, L. F.; ROCHA, J. C.; SANTOS, A. Programa de Monitoramento Hidrobiogeoquímico do AHE JIRAU – Bacia do Rio Madeira. *Tectebel Energia*, 2009.
- [4] PFEIFFER, W. C.; LACERDA, L. D.; SALOMONS, W.; MALM, O. Environment fate of mercury from gold mining in the Brazilian Amazon. *Environmental Reviews*, v. 1, p. 26-37, 1993.
- [5] MALM, O.; CASTRO, M. B.; BASTOS, W. R.; BRANCHES, F. P. J.; GUIMARÃES, J. R. D.; ZUFFO, C. E.; PFEIFFER, W. C. An assessment of Hg pollution in different gold mining areas, Amazon Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 175, p. 127-140, 1995.
- [6] LECHLER, P. J.; MILLER, J. R.; LACERDA, L. D.; VINSON, D.; BONZONGO, J. C.; LYONS, W. B.; WARWICK, J. J. Elevated mercury concentrations in soils, sediments, water, and fish of the Madeira River basin, Brazilian Amazon: a function of natural enrichments? *Science of the Total Environment*, v. 260, p. 87-96, 2000.
- [7] GUIMARÃES, J. R. D.; FOSTIER, A. H.; FORTI, M. C.; MELFI, A. J.; ARAUJO, I.; COSTA, L. S.; MAURO, J. N. Mercury in human and environmental samples from two lakes in Amapá, Brazilian Amazon: Natural background and anthropogenic contamination. *Ambio*, v. 28, p. 296-301, 1999.
- [8] FADINI, P. S.; JARDIM, W. F. Is the Negro river basin (Amazon) impacted by naturally occurring mercury? *Science of the Total Environment*, v. 275, p. 71-82, 2001.
- [9] HARAGUCHI, H. Metallomics as integrated biometal science. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 19, p. 5-14, 2004.

[10] GARCIA, J. S.; MAGALHÃES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. *Talanta*, v. 69, p. 1-15, 2006.

[11] Link Google imagens: <http://www.pescadores.com.br/images/dourada.gif>, acessado em 9 de janeiro de 2014.

[12] Link Google imagens: <http://gerencia.ambientebrasil.com.br/midia/imagens/961.gif>, acessado em 9 de janeiro de 2014.

[13] Link Google imagens: <http://1.bp.blogspot.com/-X2JTLZqarHc/T7vfLmp1GKI/AAAAAAAQAE/ZQp2sa88BJo/s400/jaraqui%252Bde%252Bescama%252Bfina.jpeg>, acessado em 9 de janeiro de 2014.

CAPÍTULO 1

ABORDAGEM METALOPROTEÔMICA QUALITATIVA DO MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE TECIDO MUSCULAR DE PEIXES DO RIO MADEIRA - RO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pesca nos Rios Amazônicos

A região amazônica apresenta grande diversidade de corpos d'água, sendo formada não só por grandes rios e lagos, mas também por inúmeros igarapés que aumentam ainda mais a dimensão do volume d'água e a heterogeneidade de ecossistemas. Estes são fatores fundamentais para a manutenção da alta diversidade de peixes nesta região. A ictiofauna de água doce da Amazônia é considerada a mais rica do mundo, com mais de 1300 espécies já descritas. Essa diversidade de peixes das diferentes regiões dentro da Amazônia brasileira ainda é difícil de ser avaliada, já que os estudos existentes se encontram esparsos nos diversos institutos de pesquisa [1].

Entre as espécies de peixes amazônicos, destacam-se aquelas de interesses comerciais e ecológicos. Deve-se salientar ainda a grande importância que esses peixes têm para a alimentação humana, já que o pescado é a principal fonte de proteínas e representa o alimento diário da população ribeirinha. Na década de 70, o consumo médio de peixe per capita da população de Manaus chegou a 55 kg/ano, quase dez vezes maior que a média nacional, representando 64% da proteína animal consumida [2].

A pesca dessa região coexiste com cinco tipos diferentes de pescaria: a pesca de subsistência – praticada pelos pescadores das comunidades; a pesca comercial multiespecífica – que abastece os principais centros urbanos regionais; a pesca industrial – voltada principalmente para a captura de grandes bagres; a pesca de reservatório – nos lagos das hidrelétricas de Balbinas no Amazonas e Tucuruí no Pará; e a pesca de ornamentais [3].

O rio Madeira, como tributário do rio Amazonas, é explorado por frotas pesqueiras dos estados do Amazonas, Pará e Rondônia, tendo grande importância na pesca comercial local. Foi responsável por 15% de todo o desembarque de peixes em Manaus entre 1994 e 1996. A frota comercial local tem como principal agente de produção os pescadores de barcos, que capturam nas calhas dos rios, e as canoas motorizadas que conseguem explorar igarapés e lagos.

A pesca comercial concentra-se em cerca de 40 espécies exploradas e dentre as mais capturadas estão: jaraqui (*Semaprochilodus* spp), pacu (*Mylossoma duriventre*), curimatã (*Prochilodus nigricans*), sardinha (*Triportheus* spp) e jatuarana (*Brycon* spp); estas espécies representam 75% da produção da pesca comercial do município de Manicoré, região do médio rio Madeira [3].

1.2. Contaminação das águas por mercúrio

A contaminação pelo mercúrio através da atividade garimpeira do ouro marcou a Amazônia na década de 80 até meados de 90. A emissão anual de mercúrio (Hg) para a bacia Amazônica pode ter alcançado cerca de 200 toneladas, sendo o Brasil, a Bolívia, a Venezuela, a Guiana e a Colômbia os maiores emissores. A bacia superior do rio Madeira foi a segunda mais importante região produtora de ouro de garimpo na Amazônia e essa atividade teve o fator de emissão médio de Hg calculado por Pfeiffer & Lacerda (1988), que obteve resultado de aproximadamente 1,3 kg de Hg para 1 kg de ouro produzido nesta bacia [4].

A emissão total do mercúrio é compreendida em cerca de 35-45% na forma líquida (metálica) liberada diretamente para os rios, solos e drenagens nas áreas de garimpo, e cerca de 55-65% na forma volátil (vapor) emitido para a atmosfera durante a queima da amálgama de Hg-Au (mercúrio-ouro), quando o ouro é purificado nas casas compradoras. Estas emissões resultam em concentrações extremamente elevadas tanto nas regiões garimpeiras quanto nas proximidades dos grandes centros, onde se localizavam as casas compradoras [4].

Para uma avaliação da contaminação dos recursos de uma região, como a bacia do rio Madeira e sua população, é preciso não só determinações do mercúrio nos compartimentos ambientais, mas também se faz necessário o conhecimento biogeoquímico de seus ecossistemas, já que são os processos biogeoquímicos que controlam a biodisponibilidade deste metal.

As mudanças no uso da terra pela agropecuária, o desmatamento, as queimadas, a dragagem anual que ocorre em alguns pontos da Hidrovia do rio Madeira, podem acelerar processos de remobilização do mercúrio presente em solos e sedimentos fluviais. Além disso, as características particulares de ambientes amazônicos – como condições anóxicas e acúmulo de matéria orgânica dissolvida – podem ainda criar condições ideais para a metilação do mercúrio, obtendo metilmercúrio – forma química mais tóxica desse elemento.

Observa-se que nos últimos anos as concentrações de mercúrio têm se mantido dentro dos níveis naturais nos rios amazônicos, no entanto, sabe-se que essas transformações e os processos de remobilização das espécies mercuriais até então indisponíveis, podem alterar sua forma química, tornando-as biodisponíveis, ou seja, disponibilizando-as para os ciclos ecológicos e o meio aquático [5, 6].

1.3. Biomagnificação do Hg na cadeia alimentar

O metilmercúrio, ao contrário da forma metálica, pode ser facilmente absorvido pela biota aquática e tende a acumular-se nos organismos e magnificar-se através da cadeia alimentar. Na Amazônia, como o peixe é a principal fonte de alimento, o consumo de peixes predadores,

como a dourada, pode representar um risco para a saúde humana dessas populações, principalmente para mulheres em idade reprodutiva e para as crianças, já que o mercúrio é reconhecidamente um agente teratogênico – o metilmercúrio da mãe é transferido para a placenta e transportada para o feto. O sistema nervoso central é o alvo principal do metilmercúrio, afetando principalmente áreas específicas do cérebro, como cerebelo e lobos temporais. Os principais efeitos neurotóxicos em humanos são: ataxia (perda da coordenação dos movimentos voluntários); disartria (problemas nas articulações das palavras); parestesia (perda da sensibilidade nas extremidades das mãos e pés e em torno da boca); visão de túnel (constricção do campo visual); e perda da audição [7-9].

A meia-vida biológica do mercúrio em peixes, dependendo da espécie, pode ser de vários anos. As concentrações elevadas de mercúrio em peixes são comumente encontradas naquelas espécies que ocupam o topo da cadeia alimentar. Entretanto, a extensão da cadeia alimentar, a taxa de crescimento individual e a idade do peixe são fatores responsáveis pela variabilidade dos níveis de mercúrio nos predadores. Outra variável a ser considerada é a mudança dos hábitos alimentares que frequentemente variam em função da fase de desenvolvimento, assim como podem variar significativamente entre indivíduos da mesma espécie [10-13].

Diversos trabalhos desenvolvidos nas últimas duas décadas destacam as altas concentrações de mercúrio determinadas nos peixes amazônicos. De uma forma geral, todas essas pesquisas apontam a bioacumulação ao longo da cadeia trófica como a responsável pelo alto teor de mercúrio nos peixes amazônicos. Como as algas e as plantas aquáticas dos rios amazônicos apresentam concentrações de mercúrio maiores que as concentrações encontradas nas águas desses rios, os peixes que se alimentam exclusivamente dessas algas e plantas apresentam concentrações de mercúrio maiores e, assim por diante, até atingir peixes como o pintado ou a piranha, que apresentam concentrações um milhão de vezes superiores às das águas dos rios [11-14].

O aumento significativo da concentração de mercúrio nos peixes de maior longevidade pode estar relacionado ao fato desse elemento apresentar baixa taxa de eliminação pelo organismo. Ou seja, à medida que o organismo envelhece, as concentrações de mercúrio aumentam constantemente e, os organismos que apresentam maior longevidade apresentarão maiores concentrações. Outro aspecto a ser considerado é que, à medida que subimos na cadeia trófica, não apenas a concentração de mercúrio aumenta, mas também a taxa de conversão em metilmercúrio. Por exemplo, um peixe carnívoro adulto pode apresentar mais de 90% do mercúrio na forma metilada, enquanto que esse valor nas águas dos rios não ultrapassa os 2% [15-18].

Portanto, em resumo, o mercúrio de origem natural e/ou antrópica, ao entrar nos ecossistemas aquáticos, participa de ciclos biogeoquímicos mediados por microorganismos, onde será transformado quimicamente, bioacumulado e biomagnificado na cadeia trófica. Sendo assim, os peixes predadores, ao acumularem altos níveis de mercúrio, podem funcionar como veículos desta forma química para seus consumidores, como répteis, aves, mamíferos e por fim, seres humanos.

1.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida – 2D PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida é uma técnica utilizada no fracionamento das proteínas desde 1975 e até o momento nenhuma outra metodologia se mostrou capaz de fracionar mais proteínas simultaneamente do que a mesma. Esta técnica possui uma ótima resolução, podendo ser empregada em caracterização de sistemas biológicos e em seleção específicas de pontos proteicos (spots) para posterior sequenciamento ou identificação. Esta técnica baseia-se na migração de partículas carregadas em um determinado meio na presença de um campo elétrico contínuo, sendo que a carga recebida por estas partículas pode resultar da ionização, dissociação ou pela associação com outras moléculas carregadas [19].

Na separação das proteínas, alguns fatores influenciam diretamente na velocidade de migração ao longo da corrida eletroforética, como por exemplo, a massa molar, a carga e a sua conformação. Nesta separação, o sistema de 2D PAGE mostra-se muito eficiente, separando as proteínas em duas propriedades; na primeira etapa – primeira dimensão – é explorada a propriedade da carga das proteínas, a qual se dá por meio da focalização isoeletrica (IEF), em que um gradiente de pH é formado no gel; em uma segunda etapa – segunda dimensão – explora-se a propriedade da massa molar (Mm) das proteínas em condição desnaturante, ou seja, na presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS). Cada spot resultante no gel 2D PAGE corresponde a um grupo de espécies proteicas presentes na amostra [20].

Para compreender melhor como ocorre a separação das proteínas por 2D PAGE, faz-se necessário esclarecer que na eletroforese com focalização isoeletrica (IEF) o objetivo é separar as proteínas de acordo com seus pontos isoeletricos (pI), sendo que o pI é o pH no qual a molécula apresenta carga igual a zero; ou seja, um gradiente de pH é formado durante a focalização isoeletrica e as partículas carregadas, sob a influência de um campo elétrico, movem-se através do gel até atingirem seus pIs, quando não mais migraram [21-23]. Na eletroforese em condições desnaturantes (SDS PAGE), o surfactante (SDS) atua de modo a normalizar a carga e a forma das proteínas, de modo que o elemento de distinção entre elas passa a ser sua massa molar. Esta normalização se dá pelo aumento das cargas negativas nas proteínas, provenientes da

transferência do SDS e pela presença de agentes redutores (como o DTT), os quais rompem ligações de sulfeto na estrutura proteica facilitando o acesso do SDS e conferindo uma forma similar ao conjunto de proteínas [19, 20]. Portanto nota-se que a 2D PAGE é a combinação da eletroforese IEF e SDS PAGE.

A poliacrilamida é uma matriz de gel muito comum nestes experimentos, pois possui características importantes como, por exemplo, ser um material quimicamente inerte, transparente e estável em uma ampla faixa de pH, temperatura e força iônica. Esta é formada pela copolimerização entre acrilamida e a N,N'-metilenobisacrilamida, na presença de persulfato de amônio e TEMED [20].

O preparo da amostra é uma etapa essencial no processo de separação das proteínas, conforme mostra o item a seguir.

1.4.1. Separação de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida

As proteínas da amostra precisam ser desnaturadas, desagregadas, reduzidas e solubilizadas para que atinjam um completo rompimento das interações moleculares de modo a garantir que cada spot presente no gel represente um provável grupo de proteína individual. Portanto, o preparo apropriado da amostra é absolutamente necessário para a obtenção de uma boa resolução na separação das proteínas por 2D PAGE [24].

Um procedimento de extração das proteínas deverá ser determinado empiricamente para cada tipo de amostra, em função da grande diversidade de tipos de proteínas em uma amostra e suas origens [24, 25].

Para que as proteínas intracelulares sejam analisadas, inicialmente devem ser rompidas as células do material biológico. O rompimento celular pode ser de dois tipos: mecânico (por exemplo, maceração ou sonicação) ou químico (por exemplo, enzimático ou na presença de detergentes) [26]. Na etapa de preparo as proteínas são removidas do seu ambiente natural, ficando expostas a muitos agentes que podem danificá-las de maneira irreversível, por isso, é necessário que o rompimento celular seja realizado rapidamente e em baixas temperaturas [27, 28].

Alguns compostos interferentes, tais como proteases, sais, lipídeos, ácidos nucleicos, polissacarídeos, pigmentos fenólicos e/ou proteínas muito abundantes, após ou durante o rompimento celular, devem ser removidos ou inativados. Por estarem ligados às proteínas que serão analisadas, os compostos interferentes afetam a solubilização e/ou o processo eletroforético, prejudicando a separação das mesmas ou a eletroforese em si [28, 29].

As proteases podem ser inativadas para prevenir a proteólise, isto é, a degradação de proteínas, o que pode comprometer os resultados obtidos na separação por 2D PAGE. Neste caso, são utilizados inibidores de protease, tais como o PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) e o AEBSF (Cloridrato de fluoreto de 2,4-(aminoetil) benzenossulfonilo), porém há que se certificar que estas substâncias não interajam com as enzimas e/ou proteínas de interesse [30].

Os surfactantes e lipídeos, considerados também interferentes na separação eletroforética, são separados seletivamente por meio do procedimento de precipitação das proteínas. A precipitação com solução de acetato de amônio em metanol, com acetona ou com solução de ácido tricloroacético (TCA) em acetona, geralmente são os métodos mais utilizados para esta etapa [29, 30].

Os polipeptídeos individuais devem ser desnaturados e reduzidos, rompendo as interações intra e intermoleculares, logo após o rompimento celular e a remoção dos compostos interferentes, como também solubilizados, mantendo as propriedades de carga. Portanto, a solubilização das proteínas deve ser conduzida em um tampão contendo surfactantes, agentes caotrópicos e redutores, como também os inibidores de protease [28].

A tabela abaixo apresenta os principais reagentes utilizados nesta finalidade com as respectivas funções que os mesmos desempenham [28-30].

Tabela 1.1 – Principais substâncias utilizadas na solubilização de proteínas.

Componentes do Tampão	Exemplos	Finalidade
Surfactantes	SDS, CHAPS e Triton X-100	Extração integral de proteínas e solubilização de proteínas pouco solúveis.
Agentes Redutores	DTT e β -mercaptoetanol	Manter os resíduos de cisteína reduzidos.
Inibidores de Protease	PMSF, pepstatina e leupeptina	Inibir a proteólise dos aminoácidos serina, aspártico e cisteína, respectivamente.
Agentes Caotrópicos	Ureia e tiourea	Quebrar as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Evitar agregações indesejáveis e formação de estrutura secundária.

1.4.2. Tratamento de imagens

A importância da eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D PAGE) é destacada em sua resolução, pois, devido às características inerentes à técnica, permite realizar uma separação eficiente com a obtenção de gel bidimensional. Portanto, há possibilidade de se realizar estudos comparativos que podem facilitar a identificação de candidatos a possíveis

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 são as principais aplicações [27].

O principal problema desses estudos comparativos é a alta variação que existe entre os géis. Isso ocorre devido à variabilidade extrínseca de amostras biológicas e outros fatores, como, por exemplo, o método empregado para a marcação das proteínas no gel, o preparo da amostra, a quantidade de proteínas totais aplicada, e, pode ser que um dos fatores mais relevantes seja a polimerização do gel. No entanto, inúmeros fatores podem influenciar nesta etapa: a temperatura em que ocorre a polimerização, a pureza e a concentração dos reagentes, tempo de formação do polímero, e outros. Portanto, o processo de comparação entre géis, que é realizada pela comparação das imagens dos géis obtidas por registradores de imagens específicos, é um processo árduo, que exige bastante atenção, paciência e, essencialmente cuidado experimental [28, 31].

Em alguns estudos, as análises sugerem que variações quanto à expressão de proteínas no gel somente são usualmente consideradas relevantes se alcançarem diferenças da ordem de 100% (2 vezes) ou superiores [25, 27].

A literatura, em função das dificuldades experimentais acima citadas, ainda não apresenta claramente quanto deve ser a diferença de expressão entre spots de pares de géis para que se possa garantir que, realmente, haja uma significativa variação entre as expressões de proteínas no gel [25-27, 29-31]. Portanto, devem ser tomados cuidados adicionais para realizar uma confiável análise comparativa, como por exemplo, uniformidade da densidade de fundo no gel, a qual deve ser baixa em relação à densidade dos spots.

1.5. Fluorescência de raios-X com radiação Síncrotron

A espectrometria de fluorescência de raios-X é uma técnica não destrutiva, na qual o preparo da amostra prévio à análise é simples e rápido. Esta técnica é multielementar, sendo capaz de identificar os elementos com número atômico maior que o do oxigênio. Os elementos da amostra são excitados pela absorção de um feixe primário de raios-X e, então, emitem picos característicos de fluorescência [32].

Quando são necessárias maiores sensibilidade e resolução para a identificação dos elementos, emprega-se a SR XRF. A radiação síncrotron como fonte de raios-X apresenta uma alta intensidade (10^3 a 10^6 vezes mais intensa que as fontes convencionais), é altamente colimada e linearmente polarizada no plano orbital do elétron. Esta técnica permite atingir limites de detecção absolutos da ordem de 10^{-15} g e limites de detecção relativos com valores menores do

que 10 ng g^{-1} , em amostras contendo apenas alguns microgramas dos elementos a serem identificados [33].

Existem poucos trabalhos na literatura que fazem o uso da SR XRF como técnica de detecção após a separação eletroforética de proteínas. Uma aplicação desta técnica na análise de íons metálicos em proteínas é o estudo onde foi feita a separação e a detecção de metaloproteínas de citosol de fígado humano para a determinação de ferro, cobre e zinco. O procedimento adotado incluía a separação das proteínas por cromatografia de filtração em gel e também por IEF. Com o uso desta metodologia, foi possível distinguir 35 bandas de proteínas, além da identificação e comparação da distribuição dos íons Cu^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} em várias metaloproteínas [33]. Outro estudo da literatura utilizando a SR XRF foi o que buscou a determinação da distribuição de selênio em proteínas de testículos de ratos, previamente separadas por SDS PAGE e transferidas para uma membrana pelo processo de *blotting*. Neste trabalho, os autores utilizaram a mesma técnica para determinar a distribuição espacial de alguns íons metálicos em seções cerebrais de ratos infectados com *scrapie*, que é uma doença neurodegenerativa. Este método mostrou-se bastante adequado para a determinação dos padrões de distribuição de elementos em baixas concentrações em proteínas separadas por eletroforese e em preparações histológicas de tecidos [34]. Recentemente, foi feito o mapeamento de proteínas provenientes de calos embriogênicos de *Citrus*, previamente separadas por SDS PAGE, utilizando a microfluorescência de raios-X com fonte de radiação síncrotron. A quantificação dos íons metálicos Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , K^{+} e Zn^{2+} foi realizada empregando-se a Fluorescência de reflexão total de raios-X por radiação síncrotron (SR TXRF), dos íons metálicos Mg^{2+} e Ca^{2+} empregando-se a FAAS e de Na^{+} empregando-se a Espectrometria de emissão atômica com atomização por chama (FAES). As análises qualitativa e quantitativa mostraram concordância entre os resultados, sendo que o Fe^{2+} e o Mg^{2+} foram detectados em apenas duas bandas de proteínas, indicando que estes íons metálicos devem ter um papel importante em processos bioquímicos, nos quais estas proteínas participam [35].

Considerando o exposto, nessa etapa do trabalho foi desenvolvido estudo metaloproteômico qualitativo utilizado a 2D PAGE na obtenção do proteoma das amostras de tecido muscular de dourada e pacu e SR XRF para identificação do mercúrio nos spots proteicos obtidos nos géis de poliacrilamida nas corridas eletroforéticas bidimensional.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Equipamentos e Acessórios

Os seguintes equipamentos e acessórios foram utilizados para o desenvolvimento desta etapa do trabalho:

- Agitador por efeito Vórtex, marca Vixar, modelo VortexMixer AC (Coreia);
- Agitador magnético Corning, modelo PC-420 (EUA);
- Balança analítica, marca Mettler Toledo, modelo AG245 (Suíça);
- Balança analítica, marca Gehaka, modelo BG 400 (São Paulo, Brasil);
- Banho Maria, marca Marconi, modelo MA 156/6 (Piracicaba, Brasil);
- Espectrofotômetro UV/Visível, marca ThermoSpectronic, modelo Evolution 60 (Madison, EUA);
- Linha de Fluorescência de Raios-X do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil);
- Mesa Agitadora, marca Tecnal, modelo TE-140 (Piracicaba, Brasil);
- Scanner para gel, marca GE Healthcare, modelo ImageScanner III (Uppsala, Suécia);
- Sistema de purificação PURELAB Ultra, marca ELGA LabWater, modelo Ultra Ionic (Bucks, Reino Unido);
- Sistema para eletroforese 2D PAGE, marca GE Healthcare, modelo SE600 Ruby (Uppsala, Suécia);
- Sistema para focalização isoeletrica, marca GE Healthcare, modelo Ettan IPGphor 3 (Uppsala, Suécia);
- Ultracentrífuga refrigerada, marca Hettich Zentrifugen, modelo Universal 320R (Alemanha);
- Pipetas marca Gilson (França) e Vidrarias convencionalmente utilizada em laboratório de Química Analítica.

2.2. Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica, sendo as soluções preparadas todas com água ultrapura, obtida pelo sistema PURELAB Ultra. Os frascos plásticos, vidrarias e demais utensílios utilizados foram descontaminados por meio de imersão em ácido nítrico 10% (v/v) por 12h. Após este procedimento o material foi lavado com água ultrapura e seco à temperatura ambiente. Os seguintes reagentes/soluções foram utilizados para o desenvolvimento desta etapa do trabalho:

- Acetona P.A., C_3H_6O , $M_m = 58,08 \text{ g mol}^{-1}$ (J.T. Baker, México);
- Ácido Acético Glacial, $C_2H_4O_2$, $M_m = 60,05 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck, Brasil);
- Ácido Clorídrico, HCl , $M_m = 36,46 \text{ g mol}^{-1}$ (J.T. Baker, México);
- Ácido Fosfórico 85%, H_3PO_4 , $M_m = 98,00 \text{ g mol}^{-1}$ (Mallinckrodt, México);
- Ácido Nítrico, HNO_3 , $M_m = 63,01 \text{ g mol}^{-1}$ (J.T. Baker, México);
- Acrilamida, C_3H_5NO , $M_m = 71,08 \text{ g mol}^{-1}$ (GE Healthcare, Alemanha);
- Agarose grau Biologia Molecular (GE Healthcare, Uppsala, Suécia);
- Albumina de Soro Bovino, pH 5 (Acrós Organics, New Jersey, EUA);
- Azul de Bromofenol, $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$, $M_m = 669,99 \text{ g mol}^{-1}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Azul de Coomassie G-250, $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$, $M_m = 854,02 \text{ g mol}^{-1}$ (USB, Cleveland, EUA);
- Ditioneitol (DTT), $C_4H_{10}O_2S_2$, $M_m = 154,25 \text{ g mol}^{-1}$ (USB, Cleveland, EUA);
- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), $C_{12}H_{25}NaO_4S$, $M_m = 288,28 \text{ g mol}^{-1}$ (GE Healthcare, Bélgica);
- Extran® MA 02 neutro (Merck Millipore, Brasil);
- Etanol, C_2H_6O , $M_m = 46,07 \text{ g mol}^{-1}$ (J.T. Baker, México);
- Fitas para focalização isoeletrica 13 cm, com anfólitos imobilizados de pH 3 a 10 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia);
- Glicerol 87%, $C_3H_8O_3$, $M_m = 92,09 \text{ g mol}^{-1}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Glicina, $C_2H_5O_2N$, $M_m = 75,07 \text{ g mol}^{-1}$ (GE Healthcare, Bélgica);
- Iodoacetamida, C_2H_4INO , $M_m = 185,0 \text{ g mol}^{-1}$ (GE Healthcare, Reino Unido);
- IPG Buffer pH 3-10 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia);
- Metanol, CH_3OH , $M_m = 32,04 \text{ g mol}^{-1}$ (J.T. Baker, EUA);
- N, N'-metilenobisacrilamida, $C_7H_{10}N_2O_2$, $M_m = 154,17 \text{ g mol}^{-1}$ (GE Healthcare, Uppsala, Suécia);
- N, N', N, N'-tetrametilenodiamina (TEMED), $C_6H_{16}N_2$, $M_m = 116,21 \text{ g mol}^{-1}$ (GE Healthcare, Uppsala, Suécia);
- Óleo Mineral (GE Healthcare, Alemanha);
- Padrão Proteico de Massa Molar (GE Healthcare, Reino Unido);
- Persulfato de amônio, $N_2H_8S_2O_8$, $M_m = 228,20 \text{ g mol}^{-1}$ (Mallinckrodt, EUA);
- Sulfato de amônio, $H_8N_2O_4S$, $M_m = 132,14 \text{ g mol}^{-1}$ (J.T. Baker, EUA);
- 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propano sulfonato (CHAPS), $C_{32}H_{58}N_2O_7S$, $M_m = 614,89 \text{ g mol}^{-1}$ (GE Healthcare, Alemanha);

- Tioureaia, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$, $M_m = 76,12 \text{ g mol}^{-1}$ (GE Healthcare, Reino Unido);
- Tris-hidroximetil amino metano (Tris), $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}$, $M_m = 121,14 \text{ g mol}^{-1}$ (GE Healthcare, Bélgica);
- Ureia, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$, $M_m = 60,06 \text{ g mol}^{-1}$ (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

2.3. Trabalho de Campo

Todo o processo metodológico envolvendo os trabalhos de campo, ou seja, estabelecimento das estações de amostragens, as espécies de peixes coletadas e sua aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa com Animais, foram conduzidos em parceria com pesquisadores que desenvolvem o Programa de Monitoramento do Comportamento de Hg na área do AHE Jirau (programa financiado pelo consórcio ESBR e regulamentada pela Agência Nacional de Energia Elétrica – ANEEL).

2.3.1. Coleta e preparo das amostras

Todo o processo de amostragem foi feito considerando a sazonalidade regional (cheia, enchente, vazante e seca). A Figura 1.1 mostra os pontos de coleta ao longo do rio Madeira até o AHE Jirau.

Figura 1.1 – Pontos de coleta na Bacia do rio Madeira.



Fonte: *Bastos et al.*, 2009 [5].

Após o processo de coleta, os peixes foram anestesiados e em seguida eutanasiados para retirada das amostras de tecido muscular. Um pool de amostra do filé de cada uma das espécies

de peixes coletados foi então transferido para frascos de polipropileno de 15 mL e armazenadas em gelo seco a -70°C na Base de Operações do Programa de Monitoramento Hidrobiogeoquímico, localizada na área do Canteiro de Obras do AHE Jirau. Posteriormente, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Bioanalítica no Instituto de Biociências – Departamento de Química e Bioquímica/UNESP.

2.4. Preparação das Amostras para Eletroforese

2.4.1. Extração das Proteínas

Cerca de 1 g do pool das amostras de músculo para cada espécie foi macerado em água ultrapura, com auxílio de almofariz e pistilo. Em seguida, os extratos contendo as proteínas foram separados da parte sólida por centrifugação a 13000 rpm e 4°C , em ultracentrífuga refrigerada. Os extratos proteicos obtidos dessas amostras foram transferidos para microtubos e utilizados posteriormente para quantificação dos teores proteicos totais e para as corridas eletroforéticas.

2.4.2. Precipitação e Ressolubilização das Proteínas

A precipitação das proteínas contidas nos extratos proteicos foi feita adicionando-se solução gelada de acetona 80% (v/v) na proporção de 1:4 (amostra:acetona). Essa precipitação foi conduzida durante 2-3 horas em geladeira a 8°C , garantindo assim que a precipitação ocorresse de maneira quantitativa. Em seguida, o precipitado proteico foi centrifugado a 13000 rpm e 4°C em centrífuga refrigerada por 10 min e o sobrenadante foi retirado. Esse precipitado proteico foi lavado mais duas vezes com a mesma solução utilizada para a precipitação. Após estes procedimentos, uma parte dos precipitados proteicos foi ressolubilizada em solução a $0,50\text{ mol L}^{-1}$ de NaOH para quantificação do teor total de proteínas, e outra parte foi ressolubilizada em tampão específico, contendo ureia a 7 mol L^{-1} , tioureia a 2 mol L^{-1} , CHAPS a 2% (m/v), anfólitos de pH 3 a 10 a 0,5% (v/v) e azul de bromofenol a 0,002%; além disso, 2,8 mg de DTT foram adicionados a este tampão e esta mistura foi utilizada nas separações eletroforéticas.

2.4.3. Quantificação de Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais nos extratos proteicos de músculo foi determinada de acordo com o método do Biureto, empregando-se albumina de soro bovino como padrão [36]. Foi construída curva analítica com concentrações de 5 a 50 g L^{-1} a partir de solução padrão

estoque de albumina bovina 100 g L^{-1} . Para leitura das amostras, os precipitados proteicos foram ressolubilizados em $100 \mu\text{L}$ de $\text{NaOH } 0,50 \text{ mol L}^{-1}$. Em tubos de vidro foram adicionados $50 \mu\text{L}$ de padrão/amostra e $2,5 \text{ mL}$ do reagente do Biureto. A mistura padrão ou amostra com o reagente foi mantida a 32°C em banho Maria (Marconi) durante 10 min. Após o tempo de reação, as leituras de absorbância foram medidas a 545 nm , usando espectrofotômetro UV/Visível. A determinação de proteínas totais nas amostras estudadas permite calcular o volume exato de extrato proteico necessário para aplicar uma massa de aproximadamente $250 \mu\text{g}$ de proteína em cada amostragem na primeira etapa da eletroforese bidimensional (fita de focalização isoeletrica de 13 cm) [37].

2.5. Separações Eletroforéticas

Para a eletroforese com focalização isoeletrica (IEF) foram utilizadas fitas de 13 cm que continham o gel pré-fabricado com anfólitos imobilizados de $\text{pH } 3$ a 10 . Antes do início das separações eletroforéticas, as fitas foram hidratadas com o extrato proteico obtido após a precipitação e ressolubilização das proteínas da amostra (item 2.4.2.). Essas fitas foram colocadas em um aparato (caixa de hidratação) com um volume de $250 \mu\text{L}$ de amostra (com concentração de $1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de proteína) e cerca de $900 \mu\text{L}$ de óleo mineral, onde permaneceram em temperatura ambiente por um período de 12 h. Dessa maneira, aproximadamente $250 \mu\text{g}$ de proteína foi aplicada para cada fita. Após este período, a fita hidratada foi levada ao sistema de focalização isoeletrica (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) para a corrida em primeira dimensão da eletroforese bidimensional [37-40].

Para a primeira dimensão do processo eletroforético foi utilizada a seguinte programação de tensão: Estágio 1 = 500 V , com acúmulo de 500 Vh ; Estágio 2 = 1000 V , com acúmulo de 800 Vh ; Estágio 3 = 10000 V , com acúmulo de 11300 Vh ; Estágio 4 = 10000 V , com acúmulo de 3000 Vh . O programa de separação em primeira dimensão durou em média $4,5 \text{ h}$. Após o término da focalização isoeletrica, as fitas com as proteínas separadas em função do pI foram reidratadas e equilibradas em duas etapas. Na primeira etapa foram usados 10 mL de solução contendo ureia 6 mol L^{-1} , SDS 2% (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mol L^{-1} , azul de bromofenol $0,002\%$ (m/v) e DTT 2% (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 [37-40]. Cada uma destas etapas durou 15 min e foi feita sob leve agitação em mesa agitadora.

Após a etapa de equilíbrio das fitas, foi realizada a segunda dimensão do processo eletroforético (SDS PAGE). A fita foi aplicada em um gel de poliacrilamida 12,5% previamente preparado em placa de vidro de 180 x 160 x 1,5 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), Persulfato de Amônio, N,N',N,N'-tetrametilenodiamina (TEMED) e água ultrapura. Ao lado da fita, foi colocado um pedaço de papel de filtro, ao qual foi aplicado 7 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), de modo a garantir o contato destes com o gel de poliacrilamida. Em seguida, a corrida eletroforética em segunda dimensão foi feita em sistema para eletroforese 2D PAGE (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) utilizando a seguinte programação: Tensão – 90 V; Tempo – 17 h. Após o período de corrida *overnight*, as proteínas foram fixadas durante 1h empregando-se uma solução contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v) como fixador. Depois, foram coradas e reveladas empregando-se o corante Coomassie coloidal, que consiste em 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). O corante ficou em contato com o gel durante 72 h e depois foi removido por sucessivas lavagens com água ultrapura. Os géis obtidos foram, por fim, digitalizados em Scanner (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) [37-40].

2.6. Tratamento de imagens dos géis – ImageMaster 2D Platinum 7.0

Os parâmetros escolhidos para a obtenção das imagens dos géis foram: *resolução* 300 dpi, *zoom* 100% e *depth* (regula o nível de cinza do pixel) 12 ou 16 bits por pixel; os quais foram selecionados a partir das recomendações do fabricante. As imagens capturadas foram gravadas no formato **tif* e em seguida, importadas para tratamento das mesmas no programa ImageMaster 2D Platinum 7.0 [28].

O tratamento das imagens foi sempre realizado para quatro géis por amostra, obtidos de um mesmo processo eletroforético. Iniciou-se pelo ajuste de contraste da imagem do gel a fim de melhorar a visualização pelo analista. Depois, realizou-se a seleção de uma pequena região do gel, a qual continha spots de expressão intermediária. Os parâmetros utilizados para a detecção dos spots foram: *smooth* (fixa o número de vezes que o programa homogeneiza a região selecionada antes de seguir a detecção) – 2; *saliency* (medida que se baseia na curvatura do spot, filtra spots reais) – 40; e *min area* (elimina regiões menores que as indicadas) – 10. Em seguida,

estenderam-se estes parâmetros para todo o gel por meio de uma ferramenta do programa para a detecção automática.

A correlação obtida entre os géis foi feita pela equivalência entre os spots dos quatro géis (*matching*), onde os spots foram comparados quanto à sua distribuição, volume, intensidade relativa, ponto isoelétrico (pI) e massa molar (Mm).

2.7. Investigação qualitativa de mercúrio nos spots proteicos por SR XRF

A investigação de mercúrio nos spots de proteínas foi feita na linha de Fluorescência de raios-X, disponível no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas-SP. Os spots proteicos foram retirados do gel com o auxílio de ponteira de pipeta e fixados em suporte de alumínio por meio de fita adesiva, para o procedimento das medidas de fluorescência. Após serem estabelecidas as condições de análise, o mapeamento foi feito irradiando-se os spots por 200 s em dois pontos. Os espectros coletados foram processados pelo 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 [33, 34].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação da concentração das proteínas totais nas amostras

O teor proteico total nas amostras de tecido muscular de dourada e pacu foi avaliado com o intuito de se determinar a melhor quantidade de massa proteica a ser aplicada nas corridas eletroforéticas, levando-se em consideração o tamanho da fita utilizada na etapa de focalização isoelétrica do processo eletroforético. Essas determinações foram feitas utilizando-se o método do Biureto que se baseia na reação cobre(II) complexado com íons tartarato e os grupos peptídicos das proteínas em meio alcalino, formando um complexo quadrado planar que absorve com poucas interferências em 545 nm [36]. A curva analítica, com valores de 5 a 50 g L⁻¹, obtida para as determinações de proteína total nas amostras de tecido muscular, apresentou coeficiente de correlação linear (r) de 0,99984 e seguinte equação de reta: $C_{\text{proteína}} = \text{Abs.} - 0,00515/0,00423$.

As concentrações de proteína total nas amostras de tecido muscular determinadas pelo método do Biureto foram (g L⁻¹): dourada – 5,95±1,0; pacu – 6,07±1,51. Com base no resultado da concentração de proteína total presente nas amostras de tecido muscular foi possível calcular o volume de amostra (extrato proteico) a ser adicionado nas fitas na etapa de hidratação anterior

à focalização isoeétrica (separação das proteínas em 1D) a fim de se ter uma massa de proteína de 250 µg, considerando que a fita utilizada na etapa de IEF foi de 13 cm [37-40].

3.2. Otimização das Separações Eletroforéticas

Os experimentos de eletroforese 2D PAGE nessa etapa do trabalho foram feitos com quatro repetições nas amostras de tecido muscular de dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) e pacu (*Mylossoma* sp., *Myleus* sp.). Também foram feitas análises de correlação entre as repetições de géis, bem como a contagem de spots dos mesmos. Os géis obtidos para as amostras de tecido muscular de dourada e pacu são apresentados nas Figuras 1.2 e 1.3 (A, B, C e D). O resultado das análises de correlação entre as repetições de géis, bem como a contagem de spots dos mesmos, são apresentados nas Tabelas 1.2 e 1.3.

Figura 1.2 – Gel de poliácridamida 12,5% (m/v) de músculo de dourada com pI de 3 a 10 e massa molar de proteína entre 14,4 e 97,0 kDa. Spot 68 detectado com mercúrio por SR XRF.

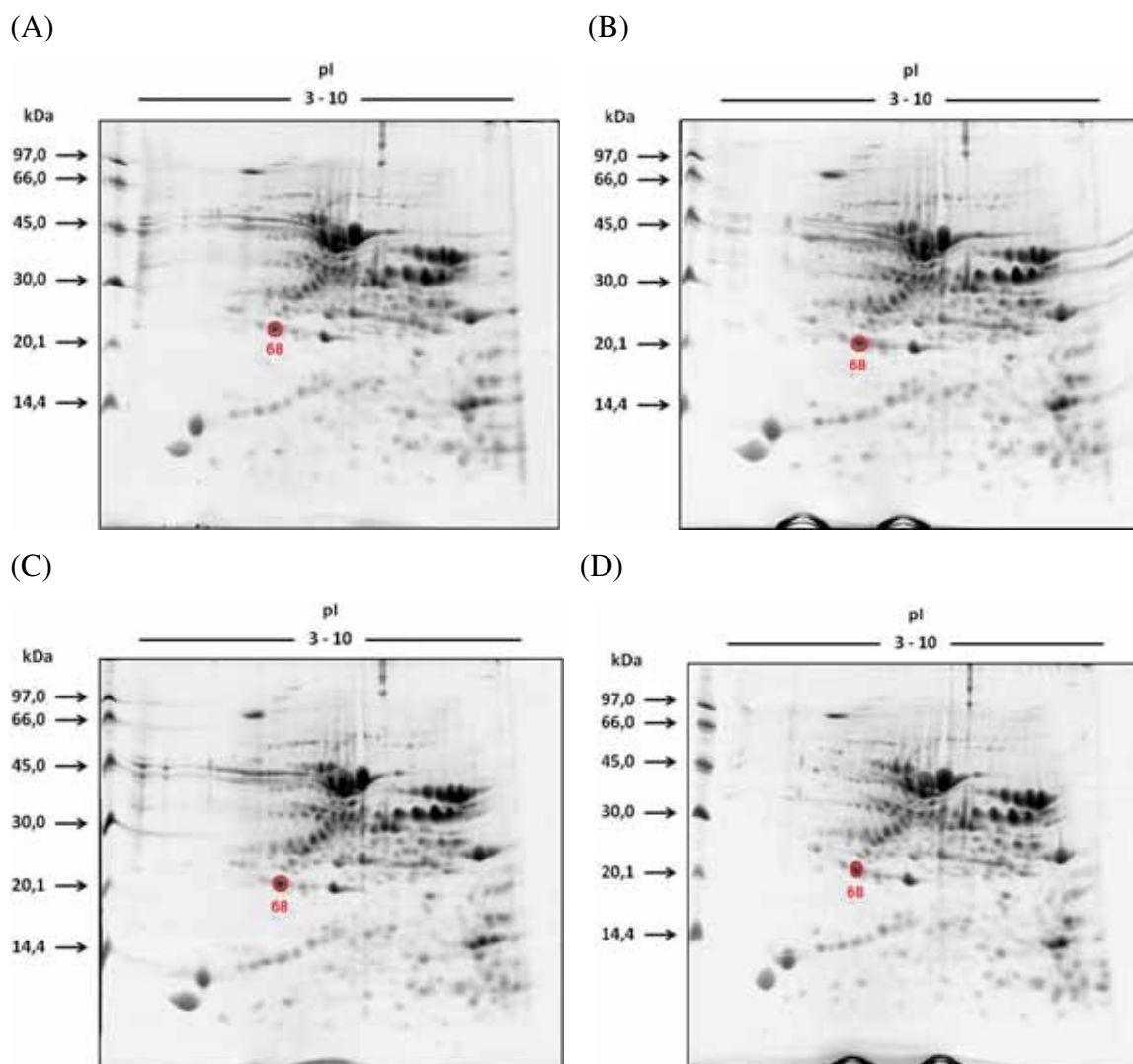


Figura 1.3 – Gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) de músculo de pacu com pI de 3 a 10 e massa molar de proteína entre 14,4 e 97,0 kDa. Spot 72 detectado com mercúrio por SR XRF.

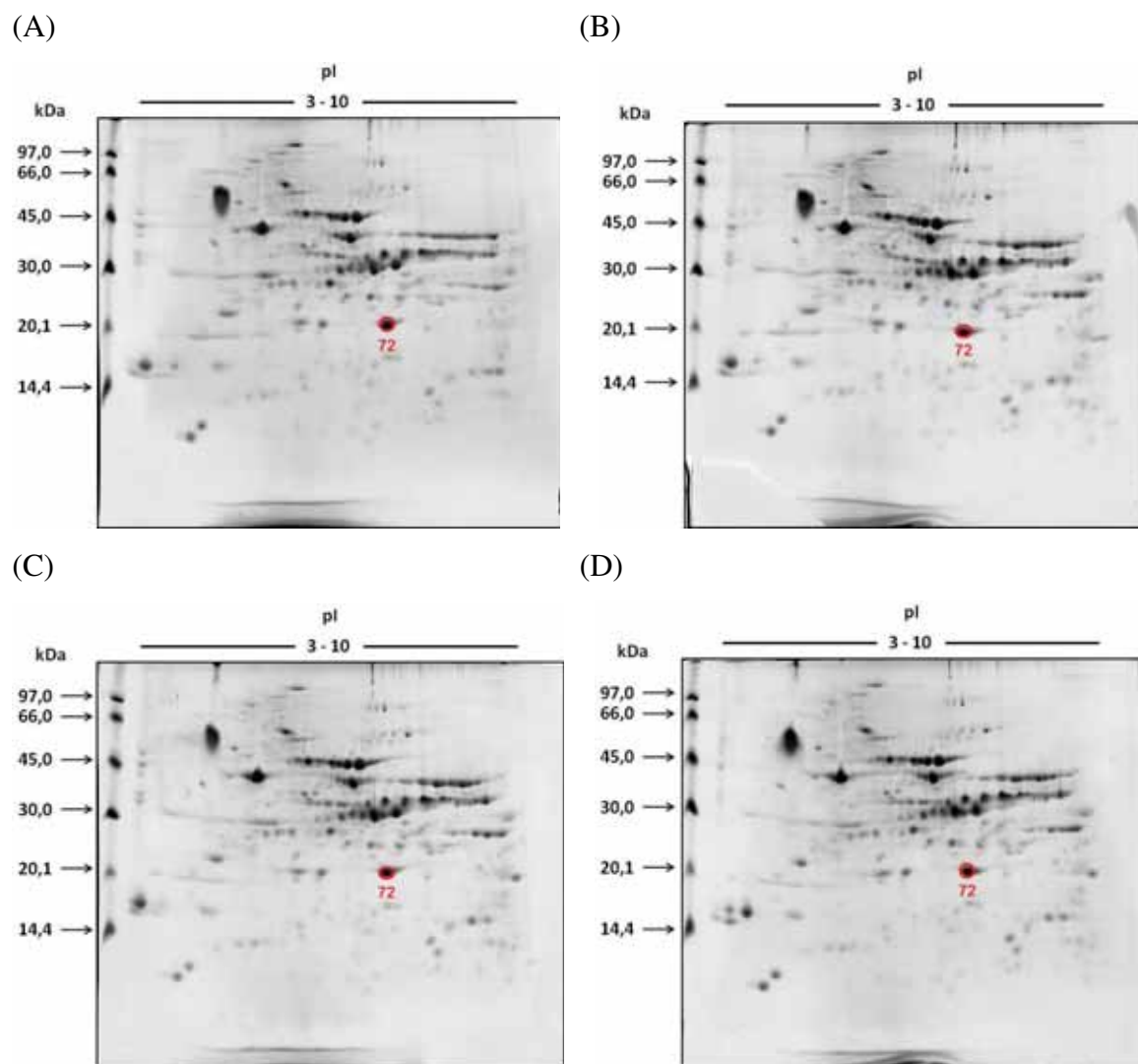


Tabela 1.2 – Análise de correlação entre os géis de músculo de dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*).

Gel	Nº de spots	Média ± Desvio Padrão (Nº de spots)	Correlação média entre os géis (<i>matching</i>)
A	684	764 ± 69	65%
B	852		
C	770		
D	748		

Tabela 1.3 – Análise de correlação entre os géis de músculo de pacu (*Mylossoma* sp., *Myleus* sp.).

Gel	Nº de spots	Média ± Desvio Padrão (Nº de spots)	Correlação média entre os géis (<i>matching</i>)
A	399	431 ± 25	73%
B	457		
C	443		
D	439		

Conforme mostram as Figuras 1.2 e 1.3 (A, B, C e D), os géis de dourada e pacu apresentaram boa resolução, o que demonstra que a separação de proteínas ocorreu de forma eficiente. Observa-se que os géis apresentam uma grande diversidade de spots proteicos, alguns com maior intensidade, e mais concentrados na região com pI entre 6 e 9 e massa molar em torno de 30-45 kDa. A análise de correlação entre os géis obtidos demonstrou que 65% e 73% dos spots proteicos estavam presentes nos quatro géis das amostras de tecido muscular de dourada e pacu, respectivamente. Além disso, o número médio de spots encontrados nos géis – 764 para a dourada e 431 para o pacu – apresentaram desvio padrão relativamente menor que 10%, o que é considerado muito bom no fracionamento de proteínas por 2D PAGE [37-43].

3.3. Detecção e Seleção dos Spots

Os parâmetros utilizados para a obtenção das imagens (item 2.6) influenciam diretamente na qualidade da mesma. Resoluções inferiores à utilizada levam a perda de informações neste estudo (definição de imagem) e não são recomendadas. Ampliação (*zoom*) menor que o utilizado leva à inabilidade de se resolver a imagem, e quando superior ao utilizado apenas aumenta o tamanho do arquivo e não traz informações relevantes. O parâmetro *depth*, deve ser pelo menos 12 bits, porque permite a obtenção de imagens com mais detalhes do gel [28].

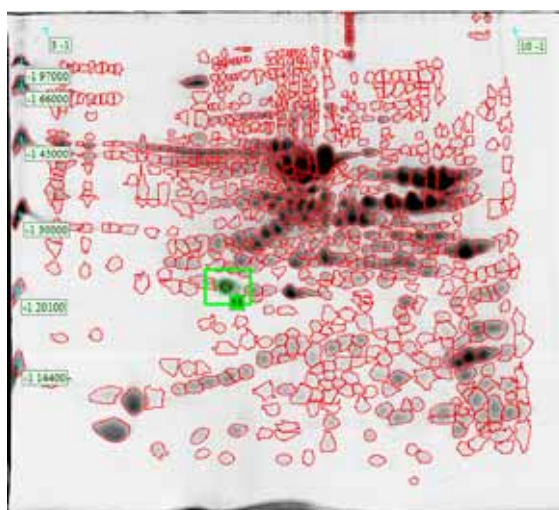
Embora o ajuste feito melhore a visualização da imagem para o analista, não afeta a latente dos dados. O que mais influencia a qualidade dos dados é a adequada edição manual. O *smooth*, que fixa o número de vezes que o programa irá homogeneizar a região selecionada antes de seguir a detecção, deve ser otimizado de forma a detectar spots reais. A *saliency*, que é uma medida baseada na curvatura do spot e que serve como um filtro para o algoritmo do programa selecionar os spots reais, deve ser ajustada para que os spots reais apresentem saliência maior que a do fundo. A *min area* (minimização da área), que é utilizado para eliminar regiões menores

que a indicada, possibilita também que partículas do gel com pixels muito escuros sejam eliminadas.

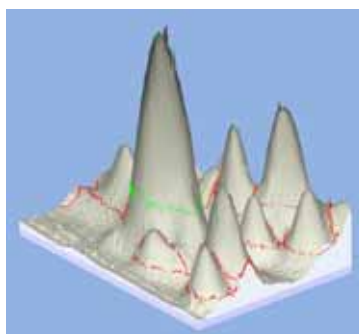
Portanto, o ajuste adequado destes parâmetros resulta em um processo de detecção eficiente. Por esse motivo, a edição manual dos spots do gel é indispensável para se fazer a seleção dos mesmos. A edição manual visa eliminar spots falso positivos, inserir spots falso negativos e efetuar correções quanto à delimitação das regiões dos spots, as quais devem ser aproximadamente circulares ou elípticas [41, 42]. Pode-se compreender melhor este processo ao olhar para a Figura 1.4, gerada a partir da ferramenta para visualização em 3D de pequenas regiões do gel.

Figura 1.4 – (A) Detecção dos spots no gel de amostra de músculo de dourada; (B) ampliação em 3D da região selecionada do gel, para a verificação dos spots previamente detectados e selecionados.

(A)



(B)



3.4. Identificação de mercúrio nos spots proteicos por SR XRF

A espectrometria de fluorescência de raios-X com radiação síncrotron, por ser uma técnica multi-elementar capaz de identificar os elementos com números atômicos maiores que o do oxigênio, foi utilizada na identificação do mercúrio nos spots proteicos obtidos após o fracionamento do tecido muscular de dourada e pacu. Considerando os resultados iniciais obtidos nas determinações qualitativas de mercúrio por SR XRF, foi possível identificar dois spots proteicos com presença desse metal. As Figuras 1.5 e 1.6 apresentam os espectros de fluorescência dos spots 68 e 72, nos quais foi identificado mercúrio nas amostras de tecido muscular de dourada e pacu, respectivamente.

De forma geral, todos os espectros de SR XRF apresentaram fundo contínuo de bastante intensidade. 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 [33, 34]. Dessa forma, utilizando os valores das áreas dos picos normalizados (após desconto do branco analítico) dos espectros de SR XRF, foi possível identificar mercúrio ($L_{\alpha 1} = 9,987$ keV) ligado às proteínas dos spots 68 e 72 das amostras de músculo de dourada e pacu – spots estes destacados com círculo vermelho nos géis apresentados nas Figuras 1.2 e 1.3.

Figura 1.5 – Espectro de SR XRF obtido do spot proteico 68 do pool de amostras de tecido muscular de dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*).

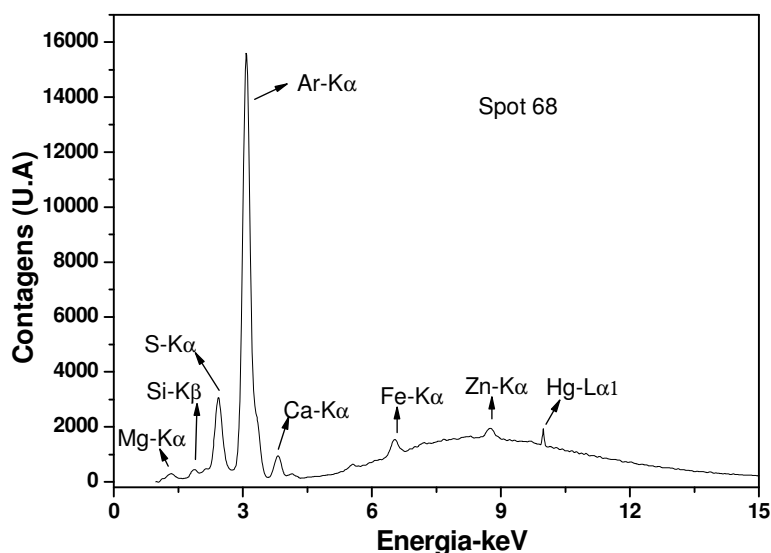
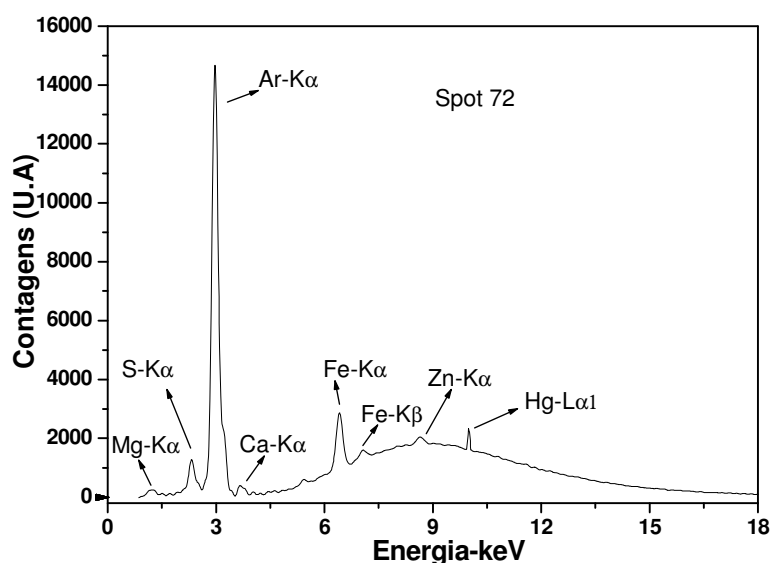


Figura 1.6 – Espectro de SR XRF obtido do spot proteico 72 do pool de amostras de tecido muscular de pacu (*Mylossoma* sp., *Myleus* sp.).



Além do mercúrio, é possível observar nos espectros de fluorescência (Figuras 1.5 e 1.6) que foi detectada a presença de enxofre ($K_{\alpha 1} = 2,308$ keV), não-metal que pode estar presente na estrutura da proteína dos spots analisados. Também foi identificada a presença de cálcio ($K_{\alpha 1} = 3,691$ keV), ferro ($K_{\alpha 1} = 6,403$ keV; $K_{\beta 1} = 7,057$ keV), magnésio ($K_{\alpha 1} = 1,254$ keV) e zinco ($K_{\alpha 1} = 8,638$ keV). A presença de mais de um íon metálico/metaloide em spots de proteínas é aceitável, já que uma única metaloproteína ou proteína *metal-binding* (proteína metal ligante) pode ter vários sítios ativos formados por átomos de íons de diferentes elementos [35]. O pico de grande intensidade relativo ao argônio ($K_{\alpha} = 2,957$), que aparece nos dois espectros, é devido ao argônio que está presente no ar ambiente a uma taxa constante de 0,934% v/v [33, 34].

Os resultados obtidos nas avaliações iniciais do mercúrio por SR XRF mostram que o mercúrio está ligado às proteínas de spots proteicos com massa molar de 20,8 kDa com pI = 5,6 (spot 68) e 19,8 kDa com pI = 7,5 (spot 72). Essas proteínas apresentam nas cadeias laterais de seus fragmentos peptídicos, grupos funcionais com átomos de enxofre (grupos tióis), que apresentam características de bases moles, e consequentemente ligam-se preferencialmente a metais/metaloídeos com características de ácidos moles, como é no caso, o mercúrio na forma $R-Hg^+$, por exemplo [44]. Dessa forma, pode-se inferir que os spots 68 da amostra de tecido muscular de dourada e 72 de pacu, poderiam ser metaloproteínas e/ou proteína *metal-binding* que apresentam grupos tióis em suas estruturas, grupos estes que apresentam grande afinidade por mercúrio.

4. CONCLUSÕES

Nesta etapa de trabalho, inicialmente foram feitas as determinações de proteínas totais presentes nos extratos proteicos das amostras de tecido muscular de dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) e pacu (*Mylossoma* sp., *Myleus* sp.), além de otimizadas as separações de proteínas por eletroforese bidimensional dessas amostras. No preparo prévio das amostras para separação por 2D PAGE, fez-se necessário o processo de precipitação com acetona e ressolubilização das proteínas com soluções adequadas, com o intuito de eliminar possíveis interferentes das corridas eletroforéticas, tais como, sais e lipídeos. Os géis obtidos mostraram que as amostras de tecido muscular de dourada e pacu apresentam alta diversidade de proteínas e com boa resolução no fracionamento bidimensional após precipitação com acetona para obtenção do pellet proteico. Conforme resultados apresentados, o número médio de spots nos géis de dourada foi de 764 com um desvio padrão de 69 spots, e correlação de 65% entre as repetições do gel; para os géis de pacu, o número médio de spots foi de 431 com um desvio padrão de 25 spots, e correlação de 73% entre as repetições do gel. Os resultados preliminares das avaliações qualitativas de mercúrio indicaram a presença deste elemento no spot proteico 68 (com massa molar de 20,8 kDa e pI=5,6) da amostra de músculo de dourada e no spot proteico 72 (com massa molar de 19,8 kDa e pI=7,5) da amostra de músculo de pacu. Os espectros de fluorescência desses spots também indicaram a presença de enxofre, o que pode sugerir a alta afinidade dessas proteínas pelo mercúrio.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CÁUPER, G. C. B. Ictiofauna In: Biodiversidade Amazônica – Flora Amazônica – Volume II. *Centro Cultural dos Povos da Amazônia*, 2006.
- [2] PARENTE, V. M. A economia da pesca em Manaus: Organização da produção e da comercialização. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 178p., 1996.
- [3] CARDOSO, R. S.; FREITAS, C. E. C. A pesca de pequena escala no rio Madeira pelos desembarques ocorridos em Manicoré (Estado do Amazonas), Brasil. *Acta Amazônica*, v. 38, p. 781-788, 2008.
- [4] BASTOS, W. R.; LACERDA, L. D. A contaminação por mercúrio na bacia do rio Madeira: uma breve revisão. *Geochimica Brasiliensis*, v. 18, p. 99-114, 2004.

- [5] BASTOS, W. R.; ALMEIDA, R.; ZARA, L. F.; ROCHA, J. C.; SANTOS A. Programa de Monitoramento Hidrobiogeoquímico do AHE JIRAU – Bacia do Rio Madeira. *Tectebel Energia*, 2009.
- [6] PFEIFFER, W. C.; LACERDA, L. D.; SALOMONS, W.; MALM, O. Environment fate of mercury from gold mining in the Brazilian Amazon. *Environmental Reviews*, v. 1, p. 26-37, 1993.
- [7] MEILI, M. The coupling of Hg and organic matter in the biogeochemical cycle – a mechanistic model for the boreal forest zone. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 56, p. 333-347, 1991.
- [8] BIDONE, E. D.; CASTILHOS, Z. C.; SANTOS, T. J. S.; SOUZA, T. M. S.; LACERDA, L. D. Fish contamination and human exposure to mercury in Tartarugalzinho River, Amapá state, Northern Amazon, Brazil. A screening approach. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 97, p. 9-15, 1997.
- [9] BARBOSA, A. C.; BOISCHIO, A. A.; EAST, G. A.; FERRARI, I.; GONÇALVES, A.; SILVA, P. R. M.; CRUZ, T. M. E. Mercury contamination in the Brazilian Amazon. Environmental and occupational aspects. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 80, p. 109-121, 1995.
- [10] D'ITRI, F. M. Mercury pollution and cycling in aquatic system. In: *Proceedings of the 5th International Conference on Environmental Contamination*. Edinburgh, Escócia. p. 391-402, 1992.
- [11] AKAGI, H.; MALM, O.; KINJO, Y.; HARADA, M.; BRANCHES, F. J. P.; PFEIFFER, W. C.; KATO H. Methylmercury pollution in the Amazon, Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 175, p. 85-95, 1995.
- [12] AULA, I.; BRAUNSCHWEILER, H.; MALIN, I. The watershed flux of mercury examined with indicators in Tucuruí reservoir in Pará, Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 175, p. 97-107, 1995.
- [13] LECHLER, P. J.; MILLER, J. R.; LACERDA, L. D.; VINSON, D.; BONZONGO, J. C.; LYONS, W. B.; WARWICK, J. J. Elevated mercury concentrations in soils, sediments, water, and fish of the Madeira River basin, Brazilian Amazon: a function of natural enrichments? *Science of the Total Environment*, v. 260, p. 87-96, 2000.
- [14] DOLBEC, J.; MERGLER, D.; LARRIBE, F.; ROULET, M.; LEBEL, J.; LUCOTTE, M. Sequential analysis of hair mercury levels in relation to fish diet of an Amazonian population, Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 271, p. 87-97, 2001.
- [15] LEBEL, J.; MERGLER, D.; BRANCHES, F.; LUCOTTE, M.; AMORIM, M.; LARRIBE, F.; DOLBEC, J. Neurotoxic effects of low-level methylmercury contamination in the Amazonian basin. *Environmental Research*, v. 79, p. 20-32, 1998.
- [16] PASSOS, C. J. S. Exposition humaine au mercure et régime alimentaire en Amazonie brésilienne: une recherche participative. *Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais – Université du Québec à Montréal*. Montréal, Canadá, 120p., 2002.
- [17] WASSERMAN, J. C.; HACON, S.; WASSERMAN, M. A. O Ciclo do mercúrio no Ambiente Amazônico. Rio de Janeiro: *Revista Mundo e Vida*, v. 2, p. 46-53, 2001.

- [18] AMORIM, M. I. M.; MERGLER, D.; BAHIA, M. O.; DUBEAU, H.; MIRANDA, D.; LEBEL, J.; BURBANO, R. R.; LUCOTTE M. Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. *Anais da Academia Brasileira de Ciência*, v. 72, p. 497-507, 2000.
- [19] SILVA, J. G. Eletroforese de proteínas: guia teórico-prático. *Ed. Interciência*, Rio de Janeiro, 126p., 2001.
- [20] BERKLMAN, T.; STENSTEDT, T. 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients: principles and methods. *Amersham Biosciences*, Uppsala, 1998.
- [21] MELVIN, M. Electrophoresis, *John Wiley & Sons*, London, 130p., 1987.
- [22] COPELAND, R. A. Methods for Protein Analysis, *Chapman & Hall*, New York, 228p., 1994.
- [23] GARCIA, J. S.; MAGALHÃES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. *Talanta*, v. 69, p. 1-15, 2006.
- [24] BERTH, M.; MOSER, F. M.; KOLBE, M.; BERNHARDT J. The state of the air in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 76, p. 1223-1243, 2007.
- [25] 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.
- [26] FLACK, C. P.; WOOLLEN, J. W. Prevention of interference by dextran with biuret-type assay of serum proteins. *Clinical Chemistry*, v. 30, p. 559-561, 1984.
- [27] 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. *Electrophoresis*, v. 24, p. 3500-3507, 2003.
- [28] GE HEALTHCARE, Manual do usuário, ImageMaster 2D Platinum 7.0 Edition AA, 2007.
- [29] 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.
- [30] GORG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, v. 4, p. 3665-3685, 2004.
- [31] CUTLER, P.; HEALD, G.; WHITE, I. R.; RUAN, J. A novel approach to spots detection for two-dimension gel electrophoresis images using pixel value collection. *Proteomics*, v. 3, p. 392-401, 2003.
- [32] VAN LANGEVELD, R. D. Trace-element determinations using a 15-keV synchrotron X-ray microprobe. *Analytical Chemistry*, v. 63, p. 2253-2259, 1991.

- [33] GAO, Y.; CHEN, Z.; ZHAO, J.; HUANG, Y. Detection of metalloproteins in human liver cytosol by synchrotron radiation X-ray fluorescence combined with gel filtration chromatography and isoelectric focusing separation. *Analyst*, v. 127, p. 1700-1704, 2002.
- [34] KUNBACHER, M.; WESELOH, G.; THOMZIG, A.; BERTELSMANN, H.; BEHNE, D. Analysis and localization of metal and metalloid containing proteins by synchrotron radiation X-ray fluorescence spectrometry. *X-Ray Spectrometry*, v. 34, p. 112-117, 2005.
- [35] 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 combining gel electrophoresis, synchrotron radiation X-ray fluorescence and atomic spectrometry. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 62, p. 97-109, 2005.
- [36] BARNES, D. B.; PIERCE, G. F.; LICHTI, D.; LANDT, M.; KOENIG, J.; CHAN, K. M. Effects of dextran on five biuret-based procedures for total protein in serum. *Clinical Chemistry*, v. 31, p. 2018-2019, 1985.
- [37] LIMA, P. M.; NEVES, R. C. F.; SANTOS, F. A.; PÉREZ, C. A.; SILVA, M. A. O.; ARRUDA, M. A. Z.; CASTRO, G. R.; PADILHA, P. M. Analytical approach to the metallomic of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver tissue by SR-XRF and FAAS after 2D-PAGE separation: Preliminary results. *Talanta*, v. 82, p. 1052-1056, 2010.
- [38] SANTOS, F. A.; LIMA, P. M.; NEVES, R. C. F.; MORAES, P. M.; PÉREZ, C. A.; SILVA, M. A. O.; ARRUDA, M. A. Z.; CASTRO, G. R.; PADILHA, P. M. Metallomic study of plasma samples from Nile tilapia using SR-XRF and GFAAS after separation by 2D PAGE: Initial results. *Microchimica Acta*, v. 173, p. 43-49, 2011.
- [39] NEVES, R. C. F.; LIMA, P. M.; BALDASSINI, W. A.; SANTOS, F. A.; MORAES, P. M.; CASTRO, G. R.; PADILHA, P. M. Fracionamento de cobre em proteínas do plasma, músculo e fígado de Tilápia do Nilo. *Química Nova*, v. 35, p. 493-498, 2012.
- [40] SILVA, F. A.; CAVECCI, B.; BALDASSINI, W. A.; LIMA, P. M.; MORAES, P. M.; ROLDAN, P. S.; PADILHA, C. C. F.; PADILHA, P. M. Selenium fractionation from plasma, muscle and liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Food Measurement and Characterization*, v. 7, p. 158-165, 2013.
- [41] SUSSULINI, A.; GARCIA, J. S.; MESKO, M. F.; MORAES, D. P.; FLORES, E. M.; PÉREZ, C. A.; ARRUDA, M. A. Z. Evaluation of soybean seed protein extraction focusing on metalloprotein analysis. *Microchimica Acta*, v. 158, p. 173-180, 2007.
- [42] SUSSULINI, A.; SOUZA, G. H. M. F.; EBERLIN, M. N.; ARRUDA, M. A. Z. Comparative metallomics for transgenic and non-transgenic soybeans. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 22, p. 1-6, 2007.
- [43] GARCIA, J. S.; SOUZA, 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*, v. 1, p. 107-113, 2009.
- [44] PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases. *Journal of American Chemical Society*, v. 85, p. 3533-3539, 1963.

CAPÍTULO 2

**DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO TOTAL EM AMOSTRAS DE TECIDO
MUSCULAR DE PEIXES DO RIO MADEIRA - RO E DE SPOTS
PROTEICOS POR GFAAS UTILIZANDO MINERALIZAÇÃO ÁCIDA
ASSISTIDA POR BANHO DE ULTRASSOM**

1. INTRODUÇÃO

A poluição química e biológica na bacia do rio Madeira configura um dos principais problemas socioambientais da Amazônia. A contaminação pelo mercúrio, que marcou a Amazônia na década de 80 até meados de 90, volta a ser cenário de discussão devido aos passivos ambientais deixados pela atividade de garimpagem de ouro e pelo potencial de contaminação que estes passivos representam para a sociedade. A construção e implementação do Aproveitamento Hidrelétrico Jirau na bacia do rio Madeira poderá, em virtude das alterações ambientais, modificar as espécies químicas do mercúrio, disponibilizando-as para o meio aquático. Espécies mercuriais, como por exemplo o metilmercúrio, estando disponíveis no meio aquático, podem ser absorvidas pela biota aquática, acumular-se nos organismos e magnificar-se através da cadeia alimentar [1].

Na Amazônia, o peixe é a principal fonte de alimento para as populações ribeirinhas. Diversos trabalhos desenvolvidos nas últimas duas décadas destacam as altas concentrações de mercúrio determinadas nos peixes amazônicos. De forma geral, todas essas pesquisas, apontam a bioacumulação ao longo da cadeia trófica como a responsável pelo alto teor de mercúrio nos peixes amazônicos. O mercúrio de origem natural e/ou antrópica, ao entrar nos ecossistemas aquáticos, participa de ciclos biogeoquímicos mediados por microorganismos, onde será transformado quimicamente, bioacumulado e biomagnificado na cadeia trófica. Sendo assim, os peixes predadores, como a dourada, ao acumularem altos níveis de mercúrio podem funcionar como veículos desta forma química para seus consumidores, como répteis, aves e seres humanos. Assim, o consumo de peixes pode representar um risco à saúde dessas populações ribeirinhas [2].

A determinação de espécies mercuriais em amostras biológicas apresenta dificuldades devido às baixas concentrações que essas espécies apresentam nessas amostras e também porque a toxicidade depende da espécie mercurial analisada. Diversos trabalhos estão disponíveis na literatura relatando métodos que utilizam a espectrometria atômica em determinações de espécies mercuriais, como por exemplo: sistema FIA (análise por injeção em fluxo) acoplado com CVAAS (espectrometria de absorção atômica por vapor frio) assistida por mineralização da amostra em forno de microondas para determinação de mercúrio total [3]; sistema de pré-concentração de metilmercúrio em fase sólida e determinação por CVAAS [4]; procedimentos de extração ácida e amostragem em suspensão para determinação de metilmercúrio e mercúrio total por GFAAS [5]; determinação de mercúrio total em amostras biológicas utilizando extração com sais de amônio quaternário e posterior quantificação por CVAAS [6]; entre outros.

Especificamente, a determinação de mercúrio por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) apresenta como principal dificuldade a possível perda de mercúrio por volatilização durante a etapa de secagem e pirólise da amostra. Essa perda do analito pode ser evitada com a utilização de modificadores químicos que podem estabilizar o mercúrio até a etapa de atomização. Na literatura podem ser encontradas substâncias que foram propostas como modificadores químicos para a determinação de mercúrio, como por exemplo: o paládio, a mistura magnésio-paládio e o ouro, que são as mais utilizadas. Dessa forma, conseguindo estabilizar termicamente o mercúrio nas etapas de pirólise e atomização, a utilização da GFAAS na determinação desse analito poderá ser utilizada com a vantagem de se obter excelente velocidade analítica, por utilizar amostragem automática [7].

Considerando o exposto, nesta etapa do trabalho foi otimizada metodologia para determinação de mercúrio por GFAAS, utilizando-se nitrato de cobre e tungstato de sódio como modificadores químicos após mineralização ácida das amostras em banho de ultrassom.

No levantamento bibliográfico feito serão sumarizadas as principais técnicas e/ou métodos tradicionalmente utilizados na determinação de mercúrio e os fundamentos da técnica GFAAS – técnica não utilizada rotineiramente na determinação de mercúrio em amostras biológicas, mas que foi utilizada nos experimentos de determinação de mercúrio total nas amostras de tecido muscular de peixes do rio Madeira-RO e de spots proteicos obtidos no fracionamento de proteínas por 2D PAGE.

1.1. Metodologias utilizadas na determinação de mercúrio

O interesse em determinar mercúrio para estimar o seu real impacto ambiental gerou um grande progresso no desenvolvimento de técnicas analíticas para sua quantificação. Além disso, a alta toxicidade aliada às baixas concentrações em algumas amostras, bem como a sua natureza volátil e associação do mercúrio com outros compostos, faz com que sejam necessárias técnicas bastante sensíveis e precisas para sua determinação em diferentes matrizes [8-10].

Deve-se ressaltar a importância de técnicas ultra limpas de amostragem, de manipulação, de análise e de padrões de calibração, para obtermos resultados confiáveis nas determinações de metais traço. Os métodos analíticos para a determinação de mercúrio são selecionados de acordo com a natureza da amostra e a concentração esperada. Em geral, a determinação de mercúrio envolve os seguintes passos: coleta; pré-tratamento/preservação/estocagem da amostra; liberação do mercúrio da matriz; extração/purificação/pré-concentração; separação das espécies de mercúrio de interesse; e quantificação. Assim, será apresentado um breve sumário dos métodos

disponíveis com ênfase nos que são atualmente utilizados para a análise de matrizes aquosas, sem referência aos processos de abertura para outros tipos de matriz [9].

O método colorimétrico é considerado o mais tradicional para determinação de mercúrio, tendo sido bastante utilizado devido à sua simplicidade, baixo custo e rapidez. No entanto, este método sofre interferência de diversos elementos, exigindo várias etapas de separação [8].

A análise por ativação com nêutrons é um método não destrutivo, específico e sensível para a determinação de mercúrio. O método consiste na irradiação da amostra com um fluxo de nêutrons onde são produzidos cinco nuclídeos, mas somente o ^{197}Hg , com meia vida de 65 horas, e o ^{203}Hg , com uma meia vida de 47 dias, são determinados. No entanto, o limite de quantificação desta técnica não permitiria a determinação de mercúrio em níveis baixos [10].

O método de espectrometria de absorção atômica (AAS) é bastante simples e baseia-se na absorção da radiação pelos átomos de mercúrio em 253,65 nm. No entanto, é pouco sensível e alguns interferentes espectrais como o ferro ($\lambda = 248,3$ nm) podem comprometer o resultado analítico. Devido à volatilidade apresentada pelo mercúrio elementar (Hg^0), este pode ser determinado quando os íons deste metal são reduzidos à forma elementar e carregados por um gás até o caminho óptico, onde os átomos sofrem interação com a radiação. Por não utilizar chama, este método é denominado de espectrometria de absorção atômica por vapor frio (CVAAS); sendo atualmente o método mais comum de análise e o recomendado oficialmente para a análise de águas e efluentes. Uma das desvantagens deste método é a possível ocorrência de interferências espectrais devido à presença de NO_2 , SO_2 ou O_3 [10].

A espectrometria de fluorescência atômica por vapor frio (CVAFS) consiste na detecção do sinal de fluorescência emitido pelo mercúrio. Os átomos de mercúrio são excitados do estado fundamental para o estado excitado por uma radiação de comprimento de onda de 253,7 nm. O mercúrio é considerado um bom elemento para a fluorescência porque absorve e emite no mesmo comprimento de onda. Este método é considerado mais sensível para a determinação do mercúrio que a CVAAS, pois a detecção da energia emitida é feita perpendicularmente ao feixe de luz incidente, sendo medido com relação ao sinal de valor zero, e não como uma pequena variação de um sinal intenso, como no caso da CVAAS. Substâncias gasosas como CO/CO_2 , O_2 e N_2 causam interferência neste método. Assim como a CVAAS, a CVAFS só detecta mercúrio na forma elementar [8].

Em relação aos métodos de especiação de mercúrio, observa-se que muitos destes métodos não são específicos para um analito, mas sim etapas operacionalmente definidas que identificam grupos com comportamento físico ou químico similares. Um exemplo deste tipo de especiação é a separação de $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ e Hg^0 (os compostos de mercúrio mais voláteis) em

sistemas aquosos por aeração seguida de adsorção (em Carbotrap® ou Tenax® para o $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ e amalgamação com metal nobre para o Hg^0), imediatamente após a amostragem. A amostra não deve ser acidificada antes deste tipo de separação para evitar a conversão de $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ a CH_3Hg^+ e de Hg^0 a Hg^{+2} . Até mesmo para a determinação de mercúrio total em águas naturais, pode-se determinar as espécies voláteis (Hg^0 e $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$) e o mercúrio total no material particulado e no filtrado [9].

Geralmente, os métodos de especiação de compostos de mercúrio são classificados de acordo com a técnica de isolamento e o sistema de detecção. A maioria dos métodos para o isolamento/separação de compostos de mercúrio baseia-se em extração com solvente, redução diferencial, adsorção/dessorção, complexação, cromatografia gasosa com ou sem derivatização ou cromatografia líquida. Normalmente, após o emprego de uma destas técnicas de isolamento/separação, a determinação é feita utilizando umas das técnicas de determinação anteriormente citadas, porém, existem também métodos de determinação que envolve técnicas diferentes, tais como: voltametria de pulso anódico diferencial; e a determinação enzimática de metilmercúrio baseada em sua transformação específica a metano por células de *Pseudomonas putida*, linhagem FB-1 [10].

1.2. Princípios e fundamentos da espectrometria atômica

O princípio fundamental da espectrometria de absorção atômica consiste na medida da absorção da intensidade da radiação eletromagnética proveniente de uma fonte de radiação primária emitida por átomos gasosos no estado fundamental. Suas determinações utilizam a absorbância como grandeza física e a Lei de Lambert-Beer para determinação das concentrações. A absorbância (A) é puramente uma quantidade matemática que pode ser representado por:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right), \text{ e segue uma relação linear com a concentração, definida pela "Lei de Lambert-Beer", onde, } I_0 \text{ é a radiação inicial emitida em um determinado comprimento de onda, e } I \text{ é a}$$

radiação final emitida pelo decaimento [11].

A espectrometria de absorção atômica (AAS) é utilizada para determinações quantitativas tanto de elementos metálicos e semimetálicos, quanto de alguns elementos não metálicos. É aplicada a uma grande variedade de amostras, tais como, materiais biológicos (tecidos e fluídos), ambientais (águas, solos e sedimentos), alimentares, geológicos, tecnológicos etc. Dentre os tipos de atomizadores mais usados em AAS estão a chama e o forno de grafite. A espectrometria de absorção atômica com ionização por chama (FAAS) é a técnica mais utilizada para análises

elementares em níveis de mg L^{-1} , enquanto que a espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite (GFAAS) é utilizada para determinações de baixas concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$). Sendo assim, a GFAAS apresenta maior sensibilidade que a FAAS devido à maior parte do analito ser introduzido no tubo de grafite e atomizada no caminho óptico, além de condensar a nuvem atômica mais eficientemente por ser um sistema fechado. Já a FAAS é um sistema onde maior parte da amostra é descartada pelo dreno do nebulizador (95%) e a parte da amostra que alcança a chama é diluída pelos gases desta, diminuindo sua sensibilidade. Outra vantagem na GFAAS quando comparada com a FAAS é a pequena quantidade de amostra utilizada, da ordem de microlitros na GFAAS, enquanto que a FAAS trabalha com amostra de alguns mililitros [11-14].

O átomo é composto de um núcleo rodeado por elétrons. Estes elétrons ocupam posições nos orbitais em uma determinada ordem e com caminhos definidos. O “estado fundamental” é a distribuição normal dos elétrons, onde, a energia mais baixa corresponde à configuração eletrônica estável do átomo [14].

Quando os átomos se encontram no estado gasoso fundamental podem absorver energia sofrendo alterações e passando para um estado conhecido como “estado excitado”, onde os elétrons mais externos (elétrons de valência) serão promovidos para configurações menos estáveis. A radiação absorvida para passar um determinado átomo de seu estado fundamental para seu estado excitado corresponde a comprimentos de ondas específicos característicos de cada elemento que podem ser determinados pela equação de Planck:

$$E = hc/\lambda$$

onde, E é a energia para passar um átomo do seu estado fundamental para seu estado excitado; h é a constante de Planck ($h = 6,62608 \times 10^{-34}$); c é a velocidade da luz ($c = 2,99792 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$) e λ é o comprimento de onda [13].

Por ser instável, o estado excitado do átomo tende imediatamente e espontaneamente a retornar para sua configuração no estado fundamental. Ao retornar ao seu estado inicial a energia radiante equivalente à quantidade absorvida no processo inicial de excitação será emitida (I) [12, 13].

Como todos os elementos possuem uma estrutura eletrônica única e o comprimento de onda da luz emitida é uma propriedade individual de cada elemento, pode-se determinar qualitativamente qual é o elemento, sendo assim, uma técnica que apresenta alta seletividade e relativamente poucas interferências. A fração de átomos excitados em um determinado nível de

energia depende da temperatura e do comprimento de onda (Tabela 2.1) e é dada pela distribuição de Boltzmann [14]:

$$\frac{N^*}{N_0} = \frac{g^* e^{-\Delta E/kT}}{g_0}$$

sendo, N^* o número de átomos no estado excitado e N_0 o número de átomos no estado fundamental; E é a energia específica da excitação; k é a constante de Boltzmann ($k = 1,38066 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta (em Kelvin) [14, 15].

Tabela 2.1 – Razão N^*/N_0 e a dependência com a temperatura e o comprimento de onda.

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

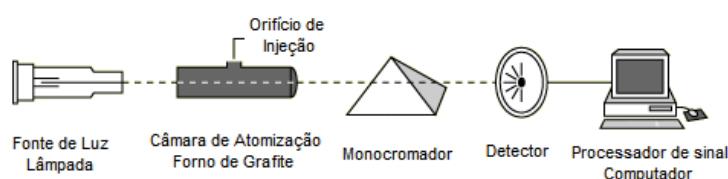
Com isso, chega-se à lei de Lambert-Beer, relacionando a absorbância (A) ou densidade óptica com o número de átomos no estado fundamental (N_0):

$$A = \frac{\log \Phi_0(\lambda)}{\Phi_{tr}(\lambda)} = 0,43 N l k(\lambda)$$

onde, Φ_0 é a potência radiante emitida, Φ_{tr} é a potência radiante transmitida em λ ; N é o número de átomos livres na camada absorvedora; l é o comprimento da camada absorvedora e k é o coeficiente de absorção atômica espectral [12-15].

Os seis principais constituintes da espectrometria de absorção atômica são: 1) a fonte de radiação; 2) o sistema de introdução de amostras; 3) o sistema de atomização; 4) o monocromador; 5) o sistema de detecção; e 6) a leitura. Estes componentes são conectados a sistemas computadorizados para o controle do equipamento e tratamento dos dados (Figura 2.1) [15].

Figura 2.1 – Diagrama dos componentes básicos do espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite.



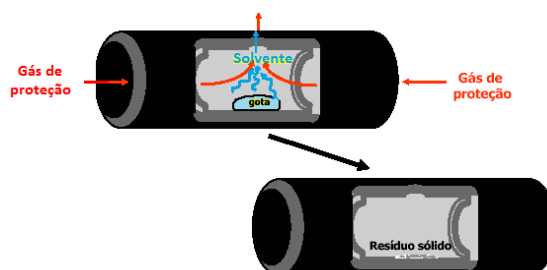
Fonte: Adaptado de *Google imagens* [16].

1.2.1. Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

Nas determinações por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, a amostra é introduzida por uma micropipeta ou um amostrador automático no tubo de grafite através de um orifício no tubo. A amostra pode ser injetada no tubo caindo diretamente em sua parede ou sobre uma plataforma de L'vov presente na parte inferior do tubo. A GFAAS permite a utilização de um programa de aquecimento, pré-definido, que submete a amostra injetada no tubo de grafite a diferentes ciclos de temperatura e tempo. As cinco etapas básicas de aquecimento do tubo são [17-25]:

SECAGEM: etapa de eliminação do solvente, que é evaporado lentamente da amostra para evitar respingos e consequente perda do analito, restando apenas os resíduos sólidos (Figura 2.2).

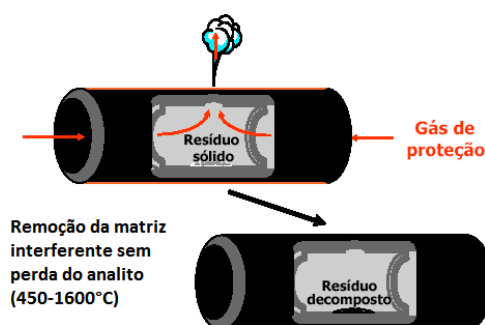
Figura 2.2 – Etapa de secagem da amostra no programa de aquecimento para determinação por GFAAS.



Fonte: Adaptado de *Krug et al.*, 2004 [11].

PIRÓLISE: nesta etapa a temperatura e o tempo de pirólise devem ser ajustados para remoção da maior parte da matriz orgânica da amostra, reduzindo a interferência química e o sinal de fundo. Geralmente modificadores químicos são utilizados para estabilizar o analito a temperaturas mais altas, garantindo a eliminação da matriz sem perda do analito (Figura 2.3).

Figura 2.3 – Etapa de pirólise da amostra no programa de aquecimento para determinação por GFAAS.



Fonte: Adaptado de *Krug et al.*, 2004 [11].

ATOMIZAÇÃO: etapa em que a temperatura deve ser alta o suficiente para garantir a completa e rápida atomização do analito, formando uma nuvem atômica para a consequente medida da radiação absorvida pelo analito no estado fundamental (Figura 2.4).

Figura 2.4 – Etapa de atomização da amostra no programa de aquecimento para determinação por GFAAS.



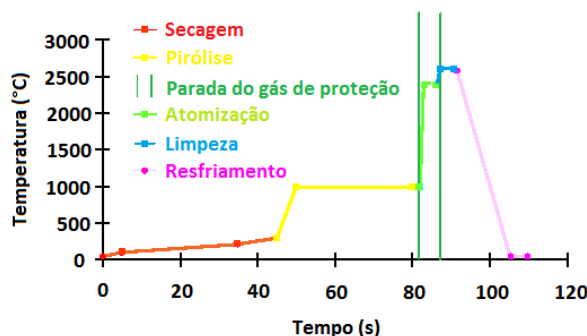
Fonte: Adaptado de *Krug et al.*, 2004 [11].

LIMPEZA: etapa para eliminar qualquer resíduo que possa ter ficado no tubo e posteriores efeitos de memória, onde as temperaturas são elevadas a 2400-2550°C por um curto período de tempo.

RESFRIAMENTO: retorna à temperatura ambiente para introdução de uma nova amostra.

Durante todo o programa de aquecimento, um fluxo externo de argônio (gás inerte) passa ao redor do tubo protegendo-o do excessivo desgaste devido às elevadas temperaturas e o contato com o oxigênio atmosférico. Ao mesmo tempo, um fluxo interno de argônio, exceto na etapa de atomização, auxilia na eliminação do ar e dos vapores formados a partir da volatilização das amostras. A Figura 2.5 mostra um exemplo de um programa de aquecimento com as cinco etapas envolvidas no processo de atomização do analito metálico [17-21].

Figura 2.5 – Etapas envolvidas no programa de aquecimento para determinação de metais/ metaloides por GFAAS.



Fonte: Adaptado de *Krug et al.*, 2004 [11].

Uma grande vantagem da espectrometria de absorção atômica em forno de grafite consiste na análise direta de amostras sólidas e/ou suspensões, eliminando a etapa de digestão ácida, o que reduz o tempo de análise, o custo e a contaminação, além de minimizar consideravelmente a exposição do analista à manipulação de ácidos concentrados. Além disso, a GFAAS apresenta outras vantagens devido à sua versatilidade, como, ação do atomizador como reator químico, obtenção de excelentes limites de detecção, separação do analito da matriz no reator, utilização de pequenos volumes de amostra, caráter multielementar, rapidez, espectro simples, etc. [22-25].

Entretanto, apesar de ser uma técnica bem desenvolvida e robusta, a susceptibilidade à efeitos de matriz – que podem diminuir a sensibilidade ou provocar excessivo desgaste do tubo – limita uma aplicação mais ampla desta técnica em análises de rotina. Além dos erros sistemáticos e aleatórios, que podem prejudicar a exatidão e precisão dos resultados e o desempenho do método analítico em questão. Porém, estando todos os parâmetros instrumentais devidamente otimizados, e se o conceito STPF (forno de grafite de plataforma com temperatura estabilizada) for adotado, o desempenho analítico da técnica pode ser melhorado. O conceito STPF consiste no uso de tubos de grafite THGA (tubo de grafite com aquecimento transversal) recoberto piroliticamente e com plataforma; uso de modificadores químicos; aquecimento rápido; fluxo de gás interno interrompido durante a atomização; sinal analítico em absorbância integrada; rápido processamento do sinal e corretor de fundo eficiente [22, 23].

Os erros resultantes de alterações nas variáveis instrumentais e/ou operacionais podem ser reduzidos através da padronização interna em GFAAS, minimizando erros sistemáticos e corrigindo efeitos de matriz. Os métodos de adição de padrão e de compatibilização de matriz são bem estabelecidos e conhecidos, porém, a adição de padrão demanda muito tempo nas determinações quando comparada com a calibração externa, e a compatibilização de matriz requer diluentes de elevada pureza e de composição química similar à matriz, o que é de difícil obtenção. Sendo assim, a padronização interna é uma alternativa para esses dois métodos de calibração, onde os cálculos são feitos baseados na suposição de que, tanto o analito quanto o padrão interno, apresentam influência similar à da matriz e que ambos são perturbados da mesma forma pelas condições instrumentais ou operacionais [24, 25].

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes e Soluções

Água ultrapura ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida por sistema de purificação PURELAB Ultra, marca ELGA LabWater modelo Ultra Ionic, ácido sulfúrico suprapuro (Merck) e peróxido de hidrogênio (Merck) foram utilizados em toda esta etapa do trabalho. Soluções de cobre e de tungstênio foram utilizadas como modificador químico e modificador permanente. Estas soluções foram preparadas pela diluição apropriada com água ultrapura de solução estoque contendo 1 g L^{-1} de nitrato cobre e/ou tungstato de sódio (Merck). Além de solução padrão de mercúrio 1000 mg L^{-1} (Titrisol, Merck) utilizada para a obtenção da curva analítica de mercúrio.

Todos os frascos de estocagem de amostras e soluções padrão, vidrarias e os copos do autoamostrador do espectrômetro de absorção atômica foram lavados com ácido nítrico 10% v/v por 24 h e em seguida, enxaguados com água ultrapura e secos a temperatura ambiente antes da utilização.

2.2. Equipamentos e Acessórios

As determinações de mercúrio foram feitas utilizando-se espectrômetro de absorção atômica SHIMADZU AA 6800 com sistema de atomização eletrotérmica em forno de grafite GFA-EX7 e amostrador automático ASC-6100. No processo de mineralização das amostras de tecido muscular de peixes e de spots proteicos foi utilizado Banho de Ultrassom UNIQUE Ultrasonic Cleaner, modelo USC1800A.

2.3. Mineralização das amostras

As amostras de tecido muscular de cada espécie de peixe estudada e/ou de spots proteicos foram mineralizadas utilizando-se procedimento conhecido [26] com modificações descritas a seguir: cerca de 250 mg (pesadas em triplicata em balança analítica com precisão de centésimo de miligrama) de amostra de tecido muscular dos peixes e/ou três repetições dos spots proteicos recortados dos géis de poliacrilamida das corridas eletroforéticas por 2D PAGE foram transferidos para balões de digestão. Para cada balão de digestão foram transferidas alíquotas de 3 mL de ácido sulfúrico concentrado e 1 mL de peróxido de hidrogênio 30% (m/m). O conjunto de balões de digestão foi colocado em banho de ultrassom da UNIQUE à temperatura de 40°C e 135 W de potência, até completa mineralização das amostras (extrato translúcido). Em seguida, os extratos ácidos obtidos foram transferidos para balões volumétricos de 5 mL completando-se os volumes com água ultrapura. Para validação do método de mineralização foi também

utilizado padrão certificado de proteína de peixe DORM 4 NRC contendo $410 \pm 55 \mu\text{g kg}^{-1}$ de mercúrio total.

2.4. Determinação do mercúrio por GFAAS

Para determinação de mercúrio 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*, tubo de grafite pirolítico com plataforma integrada e amostrador automático ASC-6100. Foi utilizada lâmpada de cátodo oco de mercúrio SHIMADZU, operada com corrente mínima de 12 mA e corrente máxima de 400 mA (corrente utilizada na correção de fundo – BG). O comprimento de onda utilizado foi de 253,7 nm e resolução espectral de 0,5 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 área de pico. Os tubos de grafite pirolíticos com plataforma integrada utilizados nas determinações de mercúrio tiveram suas paredes internas recobertas com tungstênio a fim de aumentar sua vida útil e proporcionar uma maior estabilização térmica do mercúrio. Para isso, alíquotas de $25 \mu\text{L}$ de solução contendo 1000 mg L^{-1} do modificador tungstato de sódio foi injetada dentro do atomizador, o qual em seguida foi submetido ao programa descrito por Silva *et al.* (2007) [27]. Com aquecimento até 500°C íons tungstênio são depositados sobre a plataforma do tubo de grafite, formando uma camada de carbeto de tungstênio que atua como modificador permanente [28].

2.4.1. Preparo da curva analítica

A curva analítica foi preparada utilizando-se solução padrão estoque de mercúrio (Merck). Para isso, os padrões de mercúrio foram obtidos utilizando-se o seguinte procedimento no amostrador automático: alíquotas de 2, 4, 8, 12 e $16 \mu\text{L}$ de solução padrão contendo $2,50 \mu\text{g L}^{-1}$ de mercúrio; $4 \mu\text{L}$ de solução 100 mg L^{-1} de nitrato de cobre(II); e água ultrapura de modo que o volume final das soluções ficasse igual $20 \mu\text{L}$. Dessa forma, as concentrações das soluções padrão de mercúrio apresentaram faixa de 0,25 a $2,00 \mu\text{g L}^{-1}$. Essas soluções foram então injetadas para dentro do tubo de grafite do espectrômetro recoberto com carbeto de tungstênio utilizando-se a micropipeta do autoamostrador. As medidas de absorbância foram feitas em triplicata e o programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para determinação de mercúrio encontra-se descrito na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para determinação de mercúrio nos extratos ácidos obtidos das mineralizações das amostras de tecido muscular de peixes e spots proteicos.

Etapas	Temperatura (°C)	Estágios		Fluxo de Argônio (L min ⁻¹)
		Rampa (s)	Aquecimento (s)	
Secagem	90	5	0	1
Secagem	120	5	5	1
Pirólise	250	5	5	1
Pirólise	800	5	10	1
Atomização	1600	2	5	0
Limpeza	1800	5	0	1

2.4.2. Procedimentos analíticos na amostra

Após a etapa de preparo das amostras (extratos ácidos) alíquotas de 20 µL obtidas misturando-se 10 µL dos extratos ácidos com 4 µL de solução 100 mg L⁻¹ de nitrato de cobre(II) e 6 µL de água ultrapura, foram injetadas para dentro do tubo de grafite recoberto com carbeto de tungstênio através da micropipeta do autoamostrador. As medidas foram feitas com três repetições e utilizando o programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado (Tabela 2.2).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação da concentração de mercúrio total nas amostras

A metodologia de determinação de mercúrio por GFAAS foi desenvolvida porque a metodologia por CVAAS (geração de vapor a frio) se mostrou inadequada para ser utilizada nas amostras de tecido muscular de dourada, pacu e jaraqui e dos spots proteicos obtidos no processo de fracionamento das amostras por 2D PAGE, pois apresentou limite de quantificação que ficou acima das concentrações de mercúrio nessas amostras. Também foi necessário otimizar outra metodologia de mineralização das amostras, no caso, a metodologia de mineralização em banho de ultrassom já descrita na literatura foi utilizada [26-30] com algumas modificações (conforme item 2.3).

As amostras de tecido muscular das espécies de peixe estudadas apresentaram as seguintes concentrações de mercúrio (µg kg⁻¹): dourada – 331±7; pacu – 81±2; e jaraqui – 132±4. Os resultados referentes às concentrações de mercúrio determinadas nas amostras dos spots proteicos obtidos no fracionamento das proteínas por 2D PAGE serão apresentados no Capítulo 3.

3.2. Otimização das condições instrumentais para determinação de mercúrio por GFAAS

Nas determinações de metais e/ou metaloides por GFAAS, a obtenção de resultados analíticos exatos e reprodutivos depende da otimização das temperaturas de pirólise e atomização do analito presente nas soluções e/ou suspensões das amostras. Assim, curvas de pirólise e de atomização foram feitas para se determinar as temperaturas ótimas de pirólise e atomização do mercúrio nas soluções padrão e nos extratos ácidos das amostras de tecido muscular das espécies de peixe estudadas e dos spots proteicos.

A influência dos parâmetros físico-químicos (temperatura de pirólise e de atomização) sobre o sinal de absorbância obtido para o mercúrio em padrão contendo $1,00 \mu\text{g L}^{-1}$ e nos extratos ácidos das amostras de materiais biológicos, utilizando-se tubo de grafite pirolítico com plataforma integrada com carbeto de tungstênio e nitrato de cobre(II) como modificadores químicos, são mostrados nas Figuras 2.6 e 2.7.

Figura 2.6 – Curvas de temperatura de pirólise dos extratos ácidos das amostras de tecido muscular e spots proteicos e de solução padrão contendo $1,00 \mu\text{g L}^{-1}$ de mercúrio.

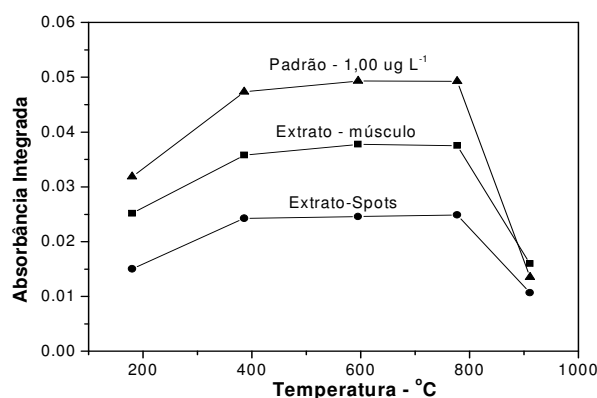
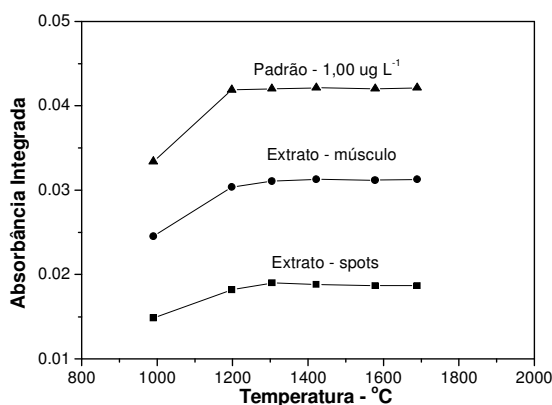


Figura 2.7 – Curvas de temperatura de atomização dos extratos ácidos das amostras de tecido muscular e spots proteicos e de solução padrão contendo $1,00 \mu\text{g L}^{-1}$ de mercúrio.



A temperatura de pirólise de 800°C foi escolhida, porque, conforme mostra a Figura 2.6, os sinais de absorbância obtidos para o mercúrio permanecem constantes a partir de 400°C, sofrendo um rápido decréscimo a partir de 900°C. Todos os demais experimentos foram feitos utilizando essa temperatura na etapa de pirólise, porque até esse valor de temperatura o mercúrio apresentou-se termicamente estável.

Em relação à temperatura de atomização (Figura 2.7), observa-se que os sinais de absorbância obtidos para o mercúrio são constantes de 1300°C até 1700°C. Considerando esse comportamento, a temperatura de atomização de 1600°C foi selecionada para todos os demais experimentos, porque nessa temperatura conseguiu-se maior linearidade da curva analítica, além de melhor reprodutibilidade e repetibilidade das leituras. A boa estabilidade térmica do mercúrio obtida nesses experimentos demonstra a eficiência do nitrato de cobre(II) que atuou como modificador químico. Possivelmente, com o aumento gradativo da temperatura (1000-1700°C), esses íons formam ligações intermetálicas com os íons Hg(II) no processo de redução ao estado elementar, provocando um aumento significativo na temperatura de volatilização do Hg(II) e consequentemente, também, na temperatura de atomização [31, 32].

3.3. Obtenção da curva analítica

Considerando-se os parâmetros físico-químicos otimizados, foi preparada a curva analítica de mercúrio com faixa de concentração de 0,25 a 2,00 µg L⁻¹. A Figura 2.8 mostra a curva analítica obtida com a sua respectiva equação da reta. A obtenção da curva analítica possibilitou o cálculo dos seguintes parâmetros analíticos importantes na validação do método de determinação de mercúrio proposto: [33]

- Massa característica (m₀)

Corresponde à massa de um elemento em pg (10⁻¹² g) que absorve 1% da potência da radiação analítica incidente.

A m₀ do método de determinação de mercúrio proposto foi calculada pela expressão:

$$m_0 = \frac{(\text{Volume injetado, } \mu\text{L}) \times (\text{Concentração, } \mu\text{g L}^{-1}) \times (0,004)}{(\text{Absorbância das amostras}) - (\text{Absorbância do branco})}$$

- Limite de detecção (LOD)

Corresponde à concentração mínima de um analito em solução, que pode ser diferenciada de zero e que produz um sinal de absorção igual a três vezes o desvio padrão (s.d.) de 10 ou mais medidas do sinal observado para o branco da amostra.

O LOD do método de determinação de mercúrio proposto foi calculado pela expressão:

$$\text{LOD} = \frac{3 \times \text{s.d.}}{b}$$

onde, *s.d.* corresponde ao desvio padrão das medidas do branco da amostra; e *b* ao coeficiente angular (*slope*) da curva analítica.

- Limite de quantificação (LOQ)

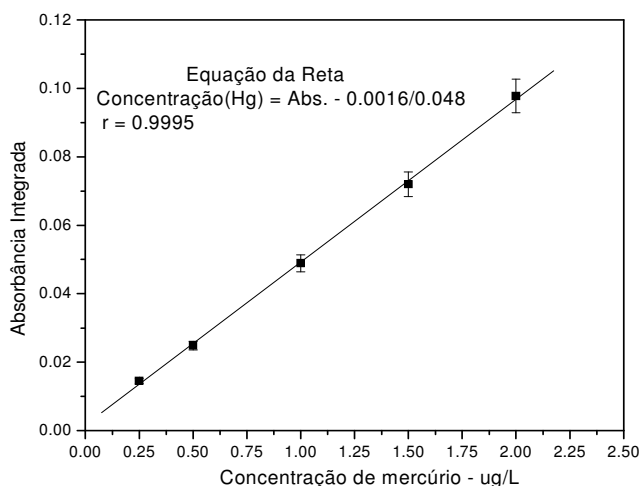
Corresponde ao menor valor quantificável da concentração de um analito em solução, que produz um sinal de absorção com desvio padrão relativo (r.s.d.) geralmente de 10%, o qual pode ser calculado multiplicando-se por 10 o desvio padrão (s.d.) de 10 ou mais medidas do sinal observado para o branco da amostra. Recomenda-se que, tanto o LOQ quanto o LOD, sejam calculados utilizando-se os parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável.

O LOQ do método de determinação de mercúrio proposto foi calculado pela expressão:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \text{s.d.}}{b}$$

onde, *s.d.* corresponde ao desvio padrão das medidas do branco da amostra; e *b* ao coeficiente angular (*slope*) da curva analítica.

Figura 2.8 – Curva analítica obtida a partir de soluções padrão aquosas contendo 0,25; 0,50; 1,00; 1,50 e 2,00 µg L⁻¹ de mercúrio.



Os valores obtidos nas leituras de absorvância dos padrões de mercúrio (n=3) apresentaram boa repetibilidade e reprodutibilidade (desvios padrão relativo menores que 3%), o

que reforça a eficiência do nitrato de cobre(II), utilizado como modificador químico, na estabilização térmica do mercúrio durante a etapa de pirólise e atomização do programa de aquecimento utilizado. A massa característica calculada em relação ao padrão de $1,00 \mu\text{g L}^{-1}$ de mercúrio foi de $1,70 \text{ pg}$; e os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), calculados considerando o desvio padrão de 10 leituras obtidas em relação ao branco das soluções padrão e da inclinação da curva analítica foram respectivamente 14 e $47 \mu\text{g kg}^{-1}$ de mercúrio. O tempo de vida útil do tubo de grafite foi equivalente a 483 queimas, que para o método proposto é aceitável quando comparado com outros métodos descritos na literatura, o que confirma que o método de preparo das amostras utilizando banho de ultrassom foi eficiente na mineralização da matéria orgânica e preservando o analito no extrato aquoso obtido [29-34].

3.4. Figura de mérito do método proposto para determinação de mercúrio

Após a otimização dos parâmetros físico-químicos no processo de extração por digestão ácida em ultrassom e de quantificação por GFAAS, o método proposto foi aplicado na determinação do mercúrio em um pool de amostras de tecido muscular de dourada, pacu e jaraqui. A precisão e exatidão do método foram avaliadas por determinação de mercúrio em padrão certificado de proteína de peixe DORM 4 NRC, utilizando o mesmo procedimento de mineralização das amostras.

As amostras de músculo das espécies de peixe estudadas apresentaram concentrações de mercúrio de 331 , 81 e $132 \mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente para as amostras de dourada, pacu e jaraqui; concentrações estas que estão abaixo do limite máximo permitido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que é de $500 \mu\text{g kg}^{-1}$.

O valor da concentração obtido para o padrão certificado DORM 4 NRC foi de $408 \pm 3 \mu\text{g kg}^{-1}$ e o valor de concentração determinado está bem próximo do valor certificado ($410 \pm 55 \mu\text{g kg}^{-1}$), comprovando assim a exatidão do método de extração proposto. Além disso, deve-se observar que os resultados obtidos para as amostras e para o padrão apresentaram-se acima do LOQ do método que corresponde a $47 \mu\text{g kg}^{-1}$.

4. CONCLUSÕES

O procedimento proposto de digestão ácida utilizando banho de ultrassom possibilitou a completa mineralização das amostras de tecido muscular de peixes e dos spots proteicos para determinação de mercúrio total por GFAAS. Além disso, a associação de nitrato de cobre como modificador químico e de carbeto de tungstênio como modificador permanente estabilizou termicamente o mercúrio na temperatura de atomização a 1600°C nas determinações por GFAAS, possibilitando a determinação de mercúrio em níveis de ppb ($\mu\text{g L}^{-1}$ e/ou $\mu\text{g kg}^{-1}$). Os resultados obtidos nas determinações de mercúrio no padrão certificado de proteína de peixe DORM 4 NRC, apresentaram excelente precisão e exatidão quando comparados com o valor certificado. Dessa forma, o processo de validação qualifica o método proposto para a determinação de mercúrio em amostras de tecido muscular de peixes, como também para a determinação desse analito em spots proteicos obtidos no processo de fracionamento de proteínas por 2D PAGE.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] PFEIFFER, W. C.; LACERDA, L. D.; SALOMONS, W.; MALM, O. Environment fate of mercury from gold mining in the Brazilian Amazon. *Environmental Reviews*, v. 1, p. 26-37, 1993.
- [2] BIDONE, E. D.; CASTILHOS, Z. C.; SANTOS, T. J. S.; SOUZA, T. M. S.; LACERDA, L. D. Fish contamination and human exposure to mercury in Tartarugalzinho River, Amapá state, Northern Amazon, Brazil. A screening approach. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 97, p. 9-15, 1997.
- [3] GALLIGNANI, M.; BAHASAS, M. H.; BRUNETTO, M. R.; BURGUERA, M.; BURGUERA, J. L.; PETIT DE PEÑA, Y. A time-based flow injection-cold vapor-atomic absorption spectrometry system with on-line microwave sample pre-treatment for the determination of inorganic and total mercury in urine. *Analytica Chimica Acta*, v. 369, p. 57-67, 1998.
- [4] MONDAL, B. C.; DAS, A. K. Determination of mercury species with a resin functionalised with a 1,2-bis(o-aminophenylthio)ethane moiety. *Analytica Chimica Acta*, v. 477, p. 73-80, 2003.
- [5] BERMEJO-BARRERA, P.; VERDURA-CONSTENLA, E. M.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, A. Rapid acid leaching and slurry sampling procedures for the determination of methyl-mercury and total mercury in human hair by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 398, p. 263-272, 1999.

- [6] TORRES, A. P.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S.; CURTIUS, A. J. Determination of inorganic and total mercury in biological samples treated with tetramethylammonium hydroxide by cold vapor atomic absorption spectrometry using different temperatures in the quartz cell. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 20, p. 289-294, 2005.
- [7] BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PIÑEIRO, J.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, A. Palladium as a chemical modifier for the determination of mercury in marine sediment slurries by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 296, p. 181-193, 1994.
- [8] OSA, R. H. Mercury Atmospheric Processes: A Synthesis Report. *Workshop Proceedings*, Tampa, Florida, USA, 1994.
- [9] HORVAT, M. Mercury analysis and speciation. In: Regional and Global Mercury Cycles: Sources, Fluxes and Mass Balances, (Baeyens, W.; Ebinghaus, R.; Vasiliev, O.), *Kluwer Academic Publishers*, Netherlands, p. 1-31, 1996.
- [10] MICARONI, R. C. C. M.; BUENO, M. I. M. S.; JARDIM, W. F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. *Química Nova*, v. 23, p. 487-495, 2000.
- [11] KRUG, F. J.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P. V. Espectrometria de Absorção Atômica Parte 1 – Fundamentos e Atomização com Chama. *Disciplina de Pós-Graduação Espectrometria de Absorção Atômica*, ESALQ, 40p., 2004.
- [12] BEATY, R. D.; KERBER, J. D. Concepts, instrumentation and techniques in atomic absorption spectrometry. *The Perkin Elmer Corporation*, Norwalk, USA, 96p., 1993.
- [13] WELZ, B.; SPERLING, M. Atomic Absorption Spectrometry, 3.ed., *Wiley-VCH*, Weinheim, New York, 941p., 1999.
- [14] LAJUNEN, L. H. J.; PERÄMÄKI, P. Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission, *The Royal Society of Chemistry*, Cambridge, 342p., 1992.
- [15] JENNISS, S. W.; KATZ, S. A.; LYNCH, R. W. Applications of Atomic Spectrometry to Regulatory Compliance Monitoring, 2.ed., *Wiley-VCH*, New York, 247p., 1997.
- [16] Link Google imagens: <http://toolboxes.flexiblelearning.net.au/demosites/series5/508/Laboratory/StudyNotes/Graphics/gfaa.gif>, acessado em 3 de março de 2014.
- [17] BUTCHER, D. J.; SNEDDON, J. A practical guide to graphite furnace atomic absorption spectrometry. New York: *John Wiley & Sons*, 250p., 1998.
- [18] JACKSON, K. W. Eletrothermal atomization for analytical atomic spectrometry. Chichester: *John Wiley*, 470p., 1999.
- [19] SAINT'PIERRE, T. D. Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de metais traço em álcool combustível e gasolina por espectrometrias de absorção atômica e de massa com plasma indutivamente acoplado. *Tese de Doutorado em Química – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis*, 107p., 2004.

- [20] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Principles of instrumental analysis, 5.ed. New York: *Saunders College*, 848p., 1998.
- [21] PERKIN ELMER. Recommended conditions for THGA furnaces. Uberlinguer, 1991.
- [22] OLIVEIRA, A. P.; GOMES NETO, J. A.; NÓBREGA, J. A.; CORREIA, P. R. M.; OLIVEIRA, P. V. Determination of selenium in nutritionally relevant foods by graphite furnace atomic absorption spectrometry using arsenic as internal standard. *Food Chemistry*, v. 93, p. 355-360, 2005.
- [23] FERNADES, K. G.; MORAES, M.; GOMES NETO, J. A.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P. V. Evaluation and application of bismuth as an internal standard for the determination of lead in wines by simultaneous electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analyst*, v. 127, p. 157-162, 2002.
- [24] RADZIUK, B.; ROMANOVA, N.; THOMASSEN, Y. Evaluation of internal standardization in electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytical Communication*, v. 36, p. 13-16, 1999.
- [25] TAKADA, T.; NAKANO, K. Evaluation and application of internal standardization in atomic absorption spectrometry with electrothermal atomization. *Analytica Chimica Acta*, v. 107, p. 129-138, 1979.
- [26] NEVES, R. C. F.; MORAES, P. M.; SALEH, M. A. D.; LOUREIRO, V. R.; SILVA, F. A.; BARROS, M. M.; PADILHA, C. C. F.; JORGE, S. M. A.; PADILHA, P. M. FAAS determination of metal nutrients in fish feed after ultrasound extraction. *Food Chemistry*, v. 113, p. 679-683, 2009.
- [27] SILVA, F. A.; NEVES, R. C. F.; QUINTERO-PINTO, L. G.; PADILHA, C. C. F.; JORGE, S. M. A.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; PADILHA, P. M. Determination of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the bioavailability of this micronutrient in feed used in pisciculture. *Chemosphere*, v. 68, p. 1542-1547, 2007.
- [28] 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*, v. 69, p. 1025-1030, 2006.
- [29] PADILHA, C. C. F.; MORAES, P. M.; GARCIA, L. A.; POZZI, C. M. C.; PEREIRA, G. P.; VALENTE, J. P. S.; JORGE, S. M. A.; PADILHA, P. M. Evaluation of Cu, Mn and Se in vegetables using ultrasonic extraction and GFAAS. *Food Analytical Methods*, v. 4, p. 319-325, 2011.
- [30] SILVA, F. A.; PADILHA, C. C. F.; CASTRO, G. R.; ROLDAN, P. S.; NOGUEIRA, A. R. A.; MORAES, P. M.; PADILHA P. M. Selenium determination in tissue samples of Nile tilapia using ultrasound-assisted extraction. *Central European Journal of Chemistry*, v. 9, p. 119-125, 2011.
- [31] MOREDA-PIÑEIRO, L.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, E.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Direct mercury determination in aqueous slurries of environmental and biological samples by cold vapour generation - electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 460, p. 111-122, 2002.

- [32] ZHANG, Y.; ADELOJU, S. B. Speciation of mercury in fish samples by flow injection catalytic cold vapour atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 721, p. 22-27, 2012.
- [33] CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Analytica Chimica Acta*, v. 391, p. 105-126, 1999.
- [34] LOUREIRO, V. R.; SALEH, M. A. D.; MORAES, P. M.; NEVES, R. C. F.; SILVA, A. F.; PADILHA, C. C. F.; PADILHA P. M. Manganese determination by GFAAS in feces and fish feed slurries. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, p. 1235-1241, 2007.

CAPÍTULO 3

ESTUDO METALOPROTEÔMICO QUANTITATIVO DO MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE TECIDO MUSCULAR DE PEIXES DO RIO MADEIRA - RO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Proteínas: Aspectos Gerais

Como um pequeno ponto na galáxia, a Terra primitiva continha moléculas inorgânicas simples que originaram as primeiras macromoléculas biológicas. Tais macromoléculas adquiriram a capacidade de auto-organizaram-se, formando então, formas celulares de vida. A vida das células depende de milhares de interações químicas e reações, primorosamente coordenadas no tempo e no espaço; e da influência de instruções genéticas presentes nas células e no ambiente [1]. As três macromoléculas biológicas mais abundantes – as proteínas, os ácidos nucleicos e os polissacarídeos – são polímeros formados pela repetição de pequenas moléculas (os monômeros) ligadas covalentemente [1, 2]. Dessas macromoléculas, as proteínas estão no centro da ação dos processos biológicos. As proteínas exercem funções reguladoras, controlando as condições intra e extracelulares; são componentes estruturais essenciais das células; e praticamente todas as transformações moleculares que definem o metabolismo celular são mediadas por catálise proteica. Para fazer uma lista completa de funções conhecidas das proteínas, teria que ser considerado milhares de itens, incluindo, por exemplo: proteínas que transportam outras moléculas, proteínas que geram forças mecânicas e eletroquímicas, além de milhares de proteínas cujas funções ainda não estão inteiramente elucidadas [1-3].

A principal estratégia de estudo para se decifrar a função de uma dada proteína é o entendimento da sua estrutura. Assim como as outras duas macromoléculas biológicas destacadas acima (ácidos nucleicos e polissacarídeos), as proteínas são formadas por monômeros, porém, diferentemente dos ácidos nucleicos, as proteínas não apresentam estruturas regulares e uniformes. Isso se deve, em parte, ao fato de os 20 aminoácidos responsáveis pela formação da estrutura proteica apresentarem propriedades físicas e químicas distintas. A investigação de como esses aminoácidos estão dispostos ajuda a entender as propriedades físicas e químicas das proteínas e também seus mecanismos de ação nos seres vivos [4].

Dessa forma, um estudo detalhado dessas macromoléculas requer um sofisticado arsenal de técnicas e/ou métodos analíticos. Com base no exposto, a seguir será apresentado, resumidamente, o estado da arte sobre as proteínas, procurando-se destacar a organização estrutural e as estratégias de extração e precipitação, em relação a essas macromoléculas. E fechando a introdução desse terceiro capítulo, serão apresentados fundamentos dos estudos metaloproteômicos e da espectrometria de massas, componente estrutural utilizado na proteômica e metalômica.

1.1.1. Organização Estrutural das Proteínas

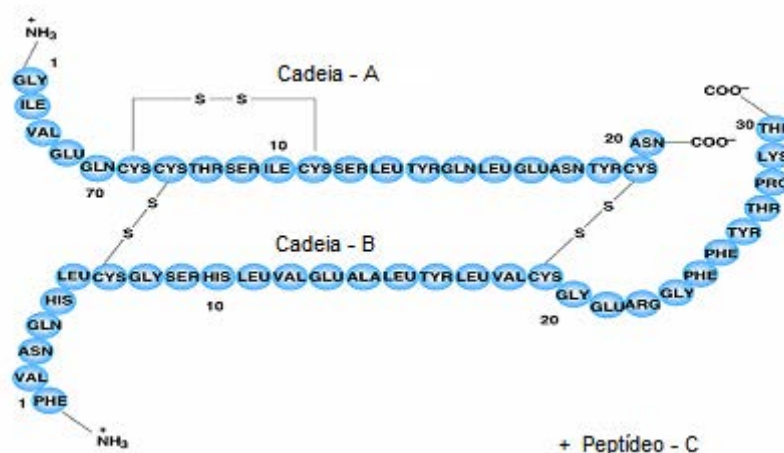
As proteínas são responsáveis pela execução do programa de atividades codificado pelos genes. Esse programa requer o esforço coordenado de diversos tipos de proteínas diferentes que evoluíram de moléculas primitivas, que promoviam um número limitado de reações químicas, para um enorme grupo de enzimas capazes de catalisar diversas reações químicas intra e extracelulares [5]. Nessa etapa de evolução, várias outras proteínas adquiriram capacidades especiais e foram agrupadas em classes funcionais: proteínas estruturais – que fornecem rigidez estrutural à célula; proteínas de transporte – que controlam o fluxo de material através das membranas celulares; proteínas reguladoras – que atuam como sensores e comutadores no controle da atividade enzimática e função gênica; proteínas de sinalização – que transmitem os sinais externos para o interior das células; e proteínas motoras – responsáveis pelo movimento celular. Nesse contexto, o nível de organização estrutural das proteínas é fundamental para se entender a participação dessas macromoléculas em determinada atividade biológica [5, 6].

As proteínas, por serem moléculas grandes, podem apresentar diferentes conformações ou estruturas tridimensionais. Porém, poucas dessas conformações possuem atividade biológica. A estrutura tridimensional exata e necessária para que a proteína desempenhe a sua função é denominada de “conformação nativa”. Normalmente, as proteínas diferenciam-se em quatro níveis de organização estrutural, que serão descritos a seguir [7].

- Estrutura primária

A estrutura primária de uma proteína refere-se à sequência de aminoácidos, ou seja, a ordem na qual os aminoácidos estão ligados para formarem uma cadeia peptídica (Figura 3.1). Nessa estrutura, além das ligações peptídicas, também se destacam as pontes dissulfetos (S–S), formadas entre os resíduos de cisteínas; no entanto, são as ligações peptídicas as responsáveis pela estabilização dessa estrutura. A sequência de aminoácidos é a primeira etapa unidimensional na especificação de estrutura tridimensional de uma proteína e determina o nível estrutural mais importante dessa molécula [7, 8].

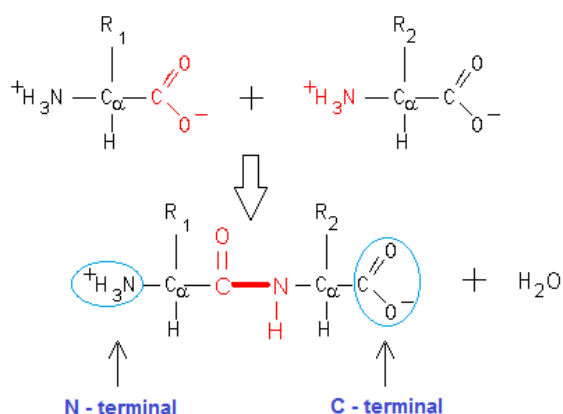
Figura 3.1 – Esquema da estrutura primária de uma proteína.



Fonte: Adaptado de *Wiley-Liss*, 1997 [8].

A formação das cadeias polipeptídicas ocorre por reações de condensação de aminoácidos. A ligação peptídica forma-se entre o átomo de carbono (C) do grupo carboxílico e o átomo de nitrogênio (N) do grupo amina, com eliminação de água (Figura 3.2). As duas extremidades da cadeia assim formada são designadas por "terminal amino" e "terminal carboxílico" ou N-terminal e C-terminal [9].

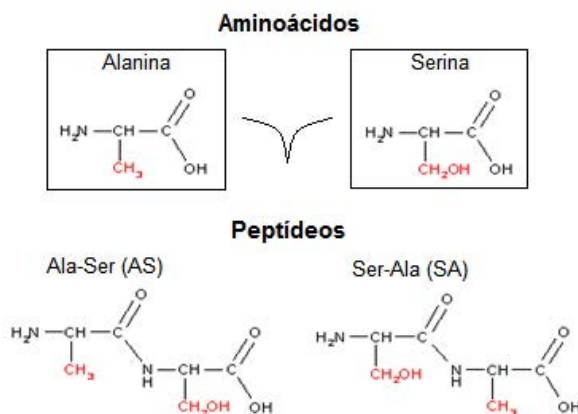
Figura 3.2 – Reação de formação da ligação peptídica de uma proteína.



Fonte: Adaptado de *Creighton*, 1993 [9].

A identificação da sequência de aminoácidos inicia-se no "terminal amino". Por exemplo, considerando a reação entre os aminoácidos alanina e serina, podemos formar dois peptídeos com estrutura primária diferente: AS e SA (Figura 3.3).

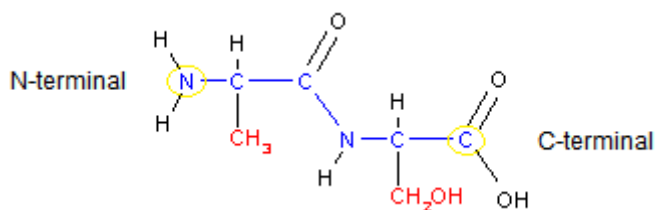
Figura 3.3 – Formação de peptídeos com estruturas primárias diferentes.



Fonte: Adaptado de *Creighton*, 1993 [9].

A estrutura primária do peptídeo Ala-Ser (AS) é representada na Figura 3.4. Em azul destaca-se a cadeia principal e em vermelho as cadeias laterais.

Figura 3.4 – Representação da estrutura primária do peptídeo Ala-Ser (AS).

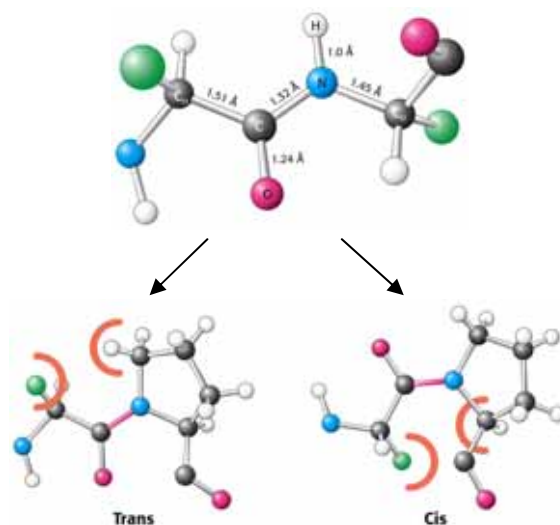


Fonte: Adaptado de *Creighton*, 1993 [9].

A configuração da ligação peptídica foi estudada inicialmente por Linus Pauling e Corey trabalhando com di e tripeptídeos, utilizando a técnica de difração de raios-X. Com base no estudo pioneiro desses pesquisadores foi possível obter as seguintes conclusões sobre as ligações peptídicas [10]:

- O comprimento da ligação covalente C–N da ligação peptídica é de cerca de 1,32 e 1,45 Å;
- Os grupos funcionais em torno da ligação peptídica ($\text{C}_\alpha\text{--C--N--C}_\alpha$) são coplanares;
- A disposição do oxigênio ligado ao carbono (C=O) pode ser cis ou trans em relação ao hidrogênio, bem como os $\text{C}_{\alpha 1}$ e o $\text{C}_{\alpha 2}$;
- A ligação peptídica é rígida, ou seja, não há rotação entre os átomos de C–N e esse caráter parcial de dupla ligação da ligação peptídica impõe uma restrição à rotação em torno da ligação C–N.

Figura 3.5 – Configuração trans e cis da ligação peptídica. O carbono da ligação peptídica é representado pela esfera preta no centro da figura, ligado ao oxigênio (esfera rosa), ao nitrogênio (esfera azul) e ao hidrogênio (esfera branca).



Fonte: Adaptado de *Google imagens* [11].

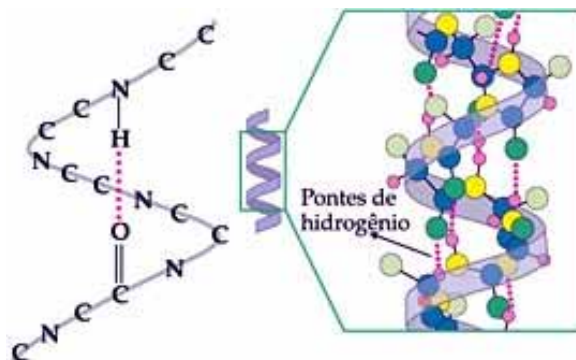
- Estrutura Secundária

A estrutura secundária é definida como o arranjo espacial dos resíduos de aminoácidos sucessivos e próximos na cadeia polipeptídica, em torno de um eixo imaginário. Na década de 50, Linus Pauling e Robert Corey descreveram um modelo tridimensional que explicava a maneira como as cadeias polipeptídicas das α -queratinas se arranjavam no espaço, sendo essa estrutura denominada “ α -hélice”. As proteínas do tipo α -queratina são encontradas em estruturas como o cabelo, unhas, casco de animais, escamas de peixes, chifre de animais, penas de aves, entre outras [12].

Para determinar essa conformação de α -hélice, Linus Pauling e Corey utilizaram tanto os dados obtidos dos estudos com a ligação peptídica, quanto os resultados dos estudos de difração de raios-X; e chegaram às seguintes conclusões:

- Na α -hélice, a cadeia polipeptídica está enrolada de forma helicoidal, tendo a cada volta 3,6 resíduos de aminoácidos e o enrolamento da α -hélice se dá para a direita, no sentido anti-horário;
- A α -hélice é estabilizada por formação de pontes de hidrogênio intracadeia, que se dá com os grupos C=O e NH da ligação peptídica, entre os resíduos de aminoácidos sucessivos e próximos na sequência de aminoácidos;
- As cadeias laterais dos aminoácidos estão projetadas para fora do plano da α -hélice e os grupos da cadeia lateral dos aminoácidos não participam da estabilização dessa conformação.

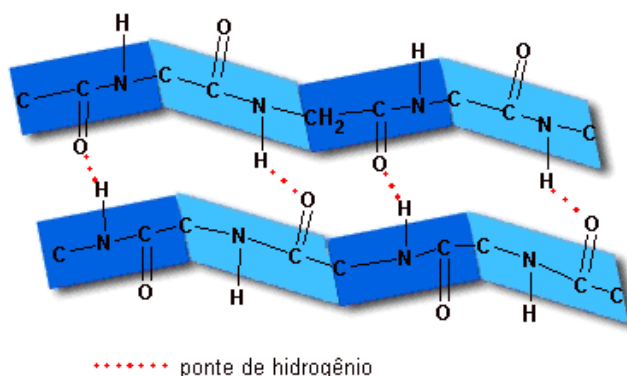
Figura 3.6 – Estrutura da α -hélice destacando a disposição helicoidal da cadeia e sua estabilização por formação de pontes de hidrogênio intramolecular ou intracadeia, representada por tracejados de cor rosa.



Fonte: *Google imagens* [13].

Ainda na década de 50, Linus Pauling e Robert Corey também propuseram um modelo para descrever a estrutura secundária das cadeias polipeptídicas das β -queratinas, denominando-o “conformação β ” ou “folha β -pregueada”. Nessa conformação, as cadeias polipeptídicas estão dispostas lado a lado, assumindo um aspecto em zigue-zague, tendo os grupos da cadeia lateral dos aminoácidos localizados acima e abaixo do plano da folha β [14, 15]. A estabilização da folha pregueada é feita por pontes de hidrogênio intercadeia, com os grupos $C=O$ e NH da ligação peptídica (Figura 3.7).

Figura 3.7 – Estrutura da β -conformação ou folha β -pregueada, destacando-se a estabilização dessa estrutura por pontes de hidrogênio intercadeia e a posição dos grupos da cadeia lateral dispostos acima e abaixo do plano da folha.

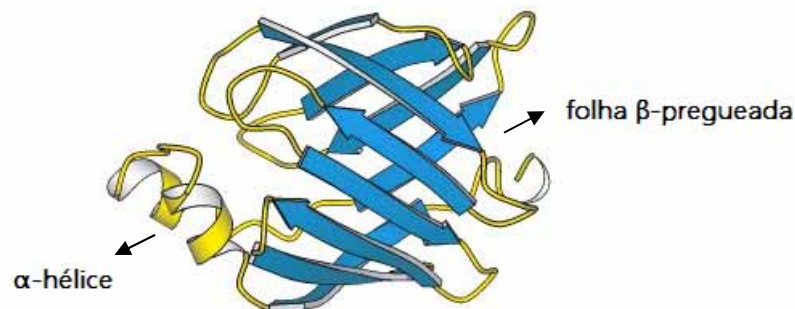


Fonte: *Google imagens* [16].

- Estrutura Terciária e Quaternária

A estrutura terciária refere-se à forma como a cadeia polipeptídica está enovelada, incluindo o arranjo tridimensional de todos os átomos da molécula, inclusive os da cadeia lateral e do grupo prostético. Esse nível estrutural é estabelecido quando diferentes estruturas secundárias dispõem-se entre si (Figura 3.8). A estabilidade da estrutura é mantida por: pontes de hidrogênio entre grupos peptídicos não envolvidos na estrutura secundária; por pontes de hidrogênio entre grupos R; por interações hidrofóbicas; por ligações iônicas entre grupos com cargas positivas e cargas negativas; e por ligações covalentes, como ligações dissulfetos (S–S) [17].

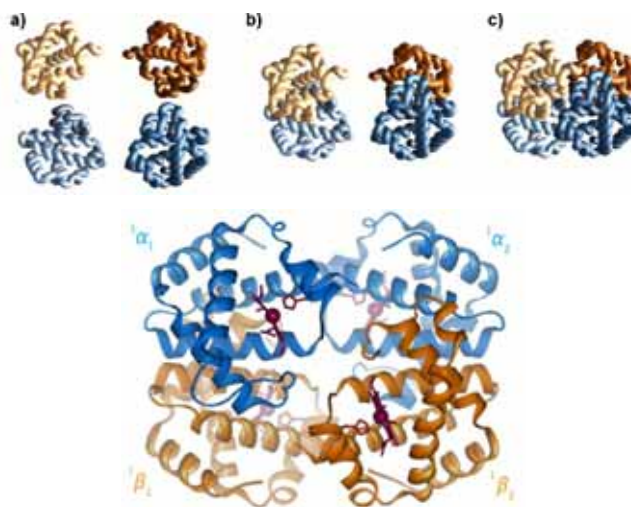
Figura 3.8 – Estrutura terciária apresentando ligações peptídicas α -hélice e folha β .



Fonte: Adaptado de *Google imagens* [18].

As estruturas quaternárias são estruturas de caráter oligomérico, compostas por várias moléculas separadas, mas entrelaçadas em estrutura terciária. Aplica-se somente às proteínas constituídas por duas ou mais cadeias polipeptídicas e se refere à disposição espacial dessas cadeias e às ligações que se estabelecem entre elas – pontes de hidrogênio, atrações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, pontes dissulfeto entre cisteínas de cadeias diferentes [17, 19]. Um exemplo deste tipo de estrutura é a hemoglobina, que é composta por quatro subunidades semelhantes à mioglobina (Figura 3.9).

Figura 3.9 – Estrutura quaternária da hemoglobina, proteína formada com quatro subunidades: $\alpha_1 + \alpha_2$ e $\beta_1 + \beta_2$.



Fonte: *Google imagens* [20, 21].

1.2. Procedimentos de Extração e Precipitação de Proteínas

1.2.1. Aspectos Gerais

As proteínas constituem uma classe extremamente heterogênea de macromoléculas. Geralmente são instáveis quando não estão em seu ambiente nativo, o qual varia consideravelmente nos diferentes compartimentos e fluídos celulares. Uma vez extraídas de seu meio biológico original, as proteínas ficam expostas a muitos agentes que podem comprometer irreversivelmente suas estruturas. Essas influências precisam ser cuidadosamente controladas, visto que, quando em soluções não-estabilizadas, essas macromoléculas podem perder rapidamente a habilidade de desempenhar suas funções específicas [22, 23].

A integridade estrutural das proteínas está diretamente relacionada ao pH e à temperatura do meio onde se encontram. É conveniente utilizar temperaturas próximas a 0°C e manter o pH em uma faixa estreita, controlada pelo uso de soluções tampão. A presença de proteases (enzimas que clivam as ligações peptídicas), que após a lise das células são liberadas para as soluções extratoras, podem também desestabilizar as proteínas de interesse durante a fase de extração. As proteases podem ser inibidas por agentes químicos sem prejuízo à atividade da proteína desejada. Outros fatores que podem comprometer a estrutura das proteínas são: contaminação por íons metálicos de transição (íons metálicos que possuem elétrons *d*, que se ligam irreversivelmente às estruturas proteicas); concentração salina e polaridade das soluções [22-24].

Dessa forma, é de fundamental importância a otimização das condições de uma solução para as quais as proteínas apresentem maior estabilidade possível e que permitam a utilização de diferentes procedimentos de fracionamento com altos graus de recuperação. Nesse contexto, alguns parâmetros podem ser estabelecidos para o estudo dessas macromoléculas e serão discutidos a seguir.

1.2.2. Extração de Proteínas

A solubilidade das proteínas depende do número de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, e da distribuição desses grupos na molécula. Dessa maneira, a solubilidade dessas macromoléculas depende da concentração de sais dissolvidos, do pH, da temperatura e da polaridade do solvente. Algumas ou todas essas variáveis podem ser manipuladas para precipitar seletivamente algumas proteínas, ao passo que outras se mantêm solúveis [25].

Devido à grande quantidade de grupos que podem interagir reversivelmente com prótons, num intervalo grande de pH, soluções de proteínas têm excelente ação tamponante. Em determinado pH, como no caso dos aminoácidos, as cargas positivas e negativas são equivalentes e formam um “Zwitterion” polivalente; esse pH é denominado de ponto isoelétrico (pI). No ponto isoelétrico a soma total das cargas elétricas será igual a zero e não haverá migração da molécula quando colocada em campo elétrico. Nesse ponto, a solubilidade em água, a viscosidade e a capacidade de intumescimento das proteínas é mínima. Dessa forma, em soluções, os grupos de cargas opostas das proteínas interagem entre si, formando ligações eletrovalentes tanto no interior da molécula, como entre as moléculas adjacentes. Essa interação diminui quando o solvente é a água, e esse fenômeno é causado pela alta constante dielétrica da água. Nesse caso, são as moléculas de água que interagem com os grupos polares das proteínas e como consequência ocorre o aumento da solubilidade. No ponto isoelétrico, como o número de cargas positivas é igual ao de cargas negativas, ocorre um aumento nas ligações eletrovalentes tanto intra como intermolecular, provocando a diminuição na solubilidade das proteínas. A adição de pequenas quantidades de sais, fenômeno denominado de “*salting in*”, aumenta a solubilidade, fazendo com que proteínas insolúveis em água se solubilizem. Os íons adicionados blindam as várias cargas da proteína, enfraquecendo as forças de atração intra e intermolecular, responsáveis pela agregação e precipitação da proteína. Contudo, na medida em que se aumenta a concentração salina, ocorre uma diminuição da atividade da água, diminuindo a interação entre as moléculas de água com os grupos polares da proteína, diminuindo assim, a solubilidade e como consequência ocorre a precipitação da proteína. Esse fenômeno de precipitação por sais é denominado de “*salting out*” [25, 26].

Para otimizar um meio de extração adequado, duas condições devem ser definidas: aquela na qual a proteína de interesse é estável e a condição na qual a proteína é mais eficientemente liberada das células ou tecidos. A escolha final é, geralmente, um meio termo entre essas duas condições. Os principais fatores a serem considerados na otimização de uma metodologia de extração de proteínas são o pH e a utilização de soluções como: soluções tampão, detergentes e agentes desnaturantes, agentes redutores, quelantes de íons metálicos, e inibidores proteolíticos [26]. Todos esses fatores já foram discutidos no Capítulo 1 (item 1.4.1.), dessa forma iremos discutir com detalhes as estratégias de precipitação das proteínas após a etapa de extração/solubilização.

1.2.3. Estratégias utilizadas na precipitação de proteínas

A separação de proteínas de outras substâncias envolve uma série de etapas relacionadas com diferentes propriedades físico-químicas dessas macromoléculas. O objetivo principal é sempre eliminar seletivamente outros componentes da mistura, de tal forma que só reste a fração proteica. As estratégias de precipitação são baseadas na diferença de solubilidade dessas macromoléculas num determinado meio reacional [27].

A precipitação de proteínas em um extrato pode ser feita, conforme discutido no item 1.2.2., adicionando-se sais (efeito “*salting out*”), solventes orgânicos (efeito da polaridade) ou polímeros orgânicos (efeito de agregação), ou ainda alterando-se o pH e a temperatura do meio reacional – fatores que afetam diretamente a solubilidade dessas macromoléculas. Na Tabela 3.1 estão listados os agentes precipitantes mais utilizados na precipitação de proteínas [28].

Tabela 3.1 – Agentes precipitantes mais utilizados na precipitação de proteínas.

Agente Precipitante	Natureza	Propriedades
Sulfato de Amônio	Sal	Efeito agregador
Etanol	Solvente	Efeito da CD* e agregador
Acetona	Solvente	Efeito da CD* e agregador
Polietilenoglicol	Polímero	Efeito agregador

CD* – constante dielétrica menor que da água

Considerando-se que cada proteína tem uma composição característica de aminoácidos que determina seu comportamento como um eletrólito, é possível fazer um fracionamento proteico por precipitação diferencial, porque nas condições onde algumas proteínas precipitam, outras permanecem em solução. A precipitação diferencial foi o primeiro método utilizado no fracionamento proteico. Este procedimento ainda é muito utilizado, principalmente quando o

objetivo é concentrar as proteínas ou como uma etapa preliminar de fracionamento em extratos proteicos. A maior parte dos métodos utilizados na precipitação de proteínas – se observados alguns cuidados no manuseio da amostra – consegue-se precipitados proteicos com alta porcentagem de manutenção da atividade original da proteína.

Os precipitantes relacionados na Tabela 3.1 são os que apresentam menor efeito desnaturante. Um precipitante muito utilizado, mais que apresenta efeito desnaturante, é o ácido tricloroacético (TCA). Dependendo dos objetivos, existem algumas outras estratégias de precipitação bastante úteis que não utilizam os agentes precipitantes listados na tabela acima, tais como: precipitação isoeletrica; desnaturação seletiva por variação de pH ou temperatura; e imunoprecipitação [28]. A seguir será discutida as estratégias de precipitação de proteínas utilizando-se o efeito de salificação e de solventes orgânicos, que são as mais utilizadas.

- Precipitação pelo efeito de salificação

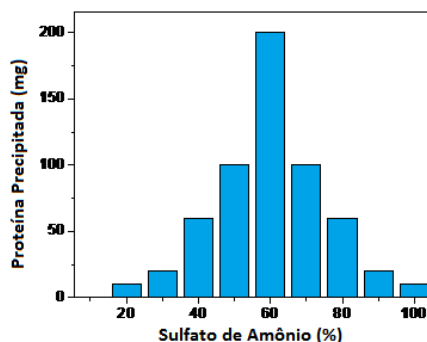
Conforme discussão feita no item 1.2.2., quando sais estão presentes em altas concentrações as proteínas tendem a agregar-se, efeito denominado “precipitação por salificação” (*salting out*). O principal fator físico-químico responsável pela precipitação de proteínas por salificação é que a elevada concentração salina remove a água de hidratação das moléculas proteicas, reduzindo assim, sua solubilidade. Essa estratégia de precipitação não altera a conformação nativa da proteína, sendo que o precipitado pode ser dissolvido novamente, sem ocorrer a desnaturação da molécula. No entanto, deve-se considerar que fatores como pH, temperatura e concomitantes do extrato proteico são fundamentais para se determinar o ponto de “*salting out*” de uma proteína em particular [27, 28].

O sulfato de amônio é o sal mais utilizado nesse tipo de precipitação devido à sua alta solubilidade em água, o que favorece a obtenção de forças iônicas elevadas e consequentemente a agregação das moléculas proteicas. Além disso, as soluções proteicas em sulfato de amônio são estáveis por longos períodos e as soluções podem ser purificadas por diálise e/ou ultrafiltração. Normalmente, as concentrações de sulfato de amônio são expressas em porcentagem. Algumas proteínas, principalmente as de alta massa molar, precipitam em soluções abaixo de 40% (m/v) de sulfato de amônio e as de massa molar média e baixa, precipitam em soluções de 60% (m/v). A Figura 3.10 apresenta uma distribuição típica de precipitação de proteínas de extrato bruto utilizando-se o efeito de salificação com sulfato de amônio [28].

Na precipitação por efeito de salificação, deve-se considerar que a adição de sais nunca precipita todas as moléculas de uma determinada proteína, mas reduz sua solubilidade. Se a mistura contém, por exemplo, uma proteína na concentração $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$, a adição do sal

causará uma redução na sua solubilidade para aproximadamente $0,10 \text{ mg mL}^{-1}$, ou seja, aproximadamente 90% da proteína será precipitada. No entanto, se a concentração da proteína for de $0,10 \text{ mg mL}^{-1}$, a mesma concentração salina não causará nenhum efeito na solubilidade da proteína, não ocorrendo precipitação. Dessa forma, a concentração salina necessária para precipitar uma determinada proteína depende não somente das propriedades das proteínas presentes no extrato, mas também das concentrações dessas proteínas na solução inicial [29].

Figura 3.10 – Efeito da concentração em porcentagem de sulfato de amônio na precipitação de proteínas.



Fonte: Adaptado de *Damaron*, 1996. [28]

- Precipitação com solventes orgânicos

Atualmente, o método de precipitação por solventes orgânicos miscíveis com água é o mais utilizado na precipitação de proteínas, inclusive em escala industrial. A adição de solventes neutros e miscíveis em meio aquoso, em especial o etanol e a acetona, diminui a solubilidade da maioria das proteínas globulares, causando a precipitação destas. Estudos quantitativos desse efeito mostram que a solubilidade proteica em pH e força iônica fixados é dependente da constante dielétrica do meio reacional. Como a acetona e o etanol possuem constantes dielétricas inferiores à da água, a adição desses solventes à solução proteica aquosa aumenta as forças de atração entre cargas opostas, reduzindo o grau de ionização e/ou de protonação dos grupos ácidos e básicos da molécula proteica. Como resultado, as moléculas de proteína tendem a se agregar e precipitar [30].

Misturas de proteínas podem ser separadas em função das diferenças quantitativas de solubilidade utilizando-se misturas geladas de etanol-água ou acetona-água. Como regra geral, a quantidade de solvente orgânico necessária para precipitar uma determinada proteína será tanto menor quanto maior for a massa molar da proteína e quanto mais próximo ao seu ponto isoelétrico estiver o pH da solução. O solvente e/ou mistura de solventes utilizados devem ser miscíveis com água, não interagir com as proteínas e ter um bom efeito precipitante. Os mais

utilizados, conforme já comentado acima, são o etanol e a acetona. No entanto, solventes como metanol, n-propanol, éteres e misturas como etanol–clorofórmio, etanol–ácido clorídrico, também têm sido utilizados, dependendo do tipo de amostra e em casos cujo objetivo é fazer um fracionamento prévio entre proteínas menores e maiores em relação às suas massas molares [28, 29].

Quando se utiliza a precipitação com solventes orgânicos deve-se ter o cuidado de fazer as misturas (solvente–amostra) em temperaturas entre 0 e 4°C. Em temperaturas acima de 10°C, a maioria das proteínas são facilmente desnaturadas na presença de solventes orgânicos. Isso ocorre devido à desestabilização das interações hidrofóbicas intramoleculares que ajudam na manutenção das estruturas proteicas, que é provocada pela forte interação das moléculas orgânicas pequenas com os resíduos proteicos hidrofóbicos em temperaturas aproximadamente acima de 10°C [30].

Conforme o exposto acima, as várias propriedades físico-químicas das proteínas possibilitam a separação dessas macromoléculas dos demais concomitantes de uma amostra. Nos procedimentos descritos, o objetivo principal não é necessariamente minimizar perdas de proteínas, mas eliminar seletivamente os demais componentes da mistura para posteriormente – por meio de outras técnicas, por exemplo, eletroforese SDS PAGE e/ou 2D PAGE – fracionar e purificar as proteínas da amostra original. O conhecimento sobre a proteína alvo ou sobre as proteínas a partir das quais se deseja separá-la de uma amostra, simplifica a escolha do método de extração/precipitação e de purificação.

1.3. Metalômica: aspectos gerais e estratégias de estudo

Embora os íons metálicos constituam uma pequena proporção do tecido corporal (4%), são essenciais como componentes estruturais e em muitos processos vitais [31]; sendo os principais papéis desses íons metálicos descritos como estrutural e funcional. No aspecto funcional, podemos destacar seu papel catalisador nos sistemas enzimáticos através da ligação desses íons a substratos, orientando assim a reação e a mediação nas reações de óxido-redução através de mudanças reversíveis no estado de oxidação do íon metálico. No aspecto estrutural, destacamos o papel como integrantes de compostos orgânicos do corpo, tais como o ferro na hemoglobina, o iodo na tiroxina, o cobalto na vitamina B₁₂ e o enxofre na tiamina e na biotina; eles atuam na estabilização dessas biomoléculas, através da estabilização e/ou proteção de cargas negativas. Existem funções nas quais o balanço de íons é importante, por exemplo: para a formação dos ossos; para a quantidade e a relação entre cálcio e fósforo; para a atividade muscular; e para a relação entre cálcio e potássio no fluido extracelular. Os eletrólitos, dos quais

os sais de sódio e potássio são os mais importantes, representam os principais fatores no controle osmótico do metabolismo da água [31, 32].

Os íons metálicos ligados às proteínas e metaloproteínas representam uma grande porção do número total de proteínas de um indivíduo. Estima-se que aproximadamente 40% de todas as proteínas e enzimas requerem a presença de um íon metálico para realizar atividade biológica. Esses íons são responsáveis por muitos processos metabólicos, como: conversão de energia na fotossíntese e respiração; expressão e regulação gênica; ligação a um substrato e ativação do mesmo; transporte e armazenamento; além de processos catalíticos [31-33].

As metaloproteínas são consideradas diferentes das proteínas ligadas a metais ou metais ligantes (do termo em inglês *metal-binding*). A primeira caracteriza-se pela alta afinidade da interação metal-proteína, enquanto que na segunda, a interação metal-proteína é de baixa afinidade, com isso essa ligação é facilmente quebrada. Fracamente ligados às proteínas, estão os íons monovalentes como o sódio e o potássio. De intensidade moderada temos o magnésio e o cálcio. Dentre os metais que apresentam forte ligação às proteínas, mais frequentemente, estão os metais de transição, tais como o ferro, o cobre, o zinco, o manganês, o molibdênio e o cobalto. Devido às suas propriedades (densidade, pequeno raio atômico, interação via eletromagnética e forças eletrostáticas), esses metais de transição estão ligados à maioria das metaloproteínas. Outro grupo de metaloproteínas, as chamadas metalotioneínas, apresentam alta afinidade não só com íons metálicos essenciais, como o cobre e o zinco, mas também com os metais potencialmente tóxicos, como o cádmio e o mercúrio. Estas metalotioneínas estão presentes em vertebrados, plantas, fungos, algas e até em bactérias metal-resistentes [34-39].

Atualmente é consenso entre os pesquisadores o grande interesse no desenvolvimento de metodologias analíticas que permitam uma avaliação segura das metaloproteínas e/ou proteínas metal-ligante presentes no sangue e em tecidos animais. Principalmente em relação aos microminerais, os quais apresentam faixa de essencialidade e toxicidade muito próximas e que são transportados em nível celular por diferentes proteínas. Devido à 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 [37-42].

O estudo da metalômica nos organismos vivos poderá fornecer informações valiosas sobre: como o íon metálico está distribuído e coordenado às proteínas; sua essencialidade e/ou toxicidade; como também a concentração individual da espécie metálica; contribuindo assim na elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais dessas biomoléculas [42].

Na última década, sempre tomando como base o proteoma de organismos vivos, várias linhas de pesquisa têm surgido na literatura com diferentes termos e abordagens, destacando-se o “metaloma”, a “metalômica” e a “metaloproteômica”. Essas linhas de pesquisa buscam informações sobre as interações e conexões funcionais de espécies metálicas/metaloídes com genes, proteínas, metabólitos e outras biomoléculas do organismo e, portanto, a elucidação e o papel biológico dos íons metálicos ligados à essas biomoléculas [39-42]. A seguir, a proteômica e a metalômica como ferramentas analíticas serão discutidas mais detalhadamente.

1.3.1. Proteômica

Com a busca da decodificação do genoma humano, o qual consiste no conjunto de todos os genes, os cientistas voltaram suas pesquisas ao sequenciamento de proteínas. Uma pesquisa está diretamente ligada à outra, pois são as proteínas que carregam as mensagens dos genes para controlar as funções do organismo [43].

Um dos grandes desafios do século 21, segundo o norte americano *Walter Gilbert*, será decodificar as proteínas que os genes produzem e suas funções biológicas exercidas ao longo da vida, podendo assim viabilizar novas drogas e terapias [44].

O termo “proteoma” foi cunhado por *Wilkins & Williams*, em 1993, para descrever o complemento proteico total do genoma [45]. O proteoma é mais complexo que o genoma, não apenas devido ao número de proteínas, mas, também, devido às inúmeras possibilidades de interações entre elas e à estrutura tridimensional que a mesma possui, indo interferir decisivamente no papel que ela realiza [41-44].

O genoma de um organismo é essencialmente estático e o DNA, do qual pode ser extraído em princípio de uma única célula, contém toda informação. Em contraste, o proteoma observável de uma única célula – definido como a coleção de todas as proteínas existentes em seu fenótipo molecular específico – é bastante dinâmico e dependente do estado da célula. Portanto, o proteoma não é estacionário, mas muda com o desenvolvimento do organismo e com qualquer mudança no seu ambiente. Uma vez que o proteoma muda mais que o genoma, é possível então obter-se mais informação do organismo estudando-se o proteoma [46].

A análise de proteomas possui várias aplicações e a demanda de trabalhos nessa área tem crescido exponencialmente nos últimos anos. O atendimento dessa demanda vai depender do apoio continuado aos grupos de pesquisa em proteínas e proteomas [45].

1.3.2. Metalômica

Como já definido acima, a proteômica envolve o estudo das propriedades das proteínas, tais como o nível de expressão, as modificações pós-traducionais e as interações em ampla escala, de modo a obter uma visão global dos processos celulares [44-46].

Já a metalômica, é um campo de pesquisa que deve estar relacionado com a genômica e a proteômica, pois a síntese e as funções metabólicas dos genes e das proteínas não ocorrem sem a presença de íons metálicos [47]. Dessa forma, a metalômica tem como objetivo a verificação da distribuição das espécies metálicas e/ou metaloides, bem como a elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais das biomoléculas que contenham íons metálicos em suas estruturas [48]. Na metalômica, são definidos como “metalomas” os íons metálicos ou espécies metaloides presentes em um sistema biológico (células, tecidos, fluidos ou organismos), na forma livre ou complexado [49].

Uma das mais importantes tecnologias analíticas para estabelecer a metalômica como ciência dos biometais é a especiação química para a identificação específica de metalomas bioativos, uma vez que a identificação dos metalomas e a elucidação de funções bioquímicas ou fisiológicas nos sistemas biológicos são alvos da metalômica [50].

O estudo do metaloma pode fornecer informações tais como: (i) elemento (espécie metálica ou metaloide) distribuído entre os compartimentos celulares de determinado tipo de célula; (ii) seu meio de coordenação (qual biomolécula está incorporado ou a qual bioligante está complexado); (iii) as concentrações das espécies metálicas individuais presentes e (iv) a estrutura da biomolécula [49, 50].

A informação metalômica pode ser classificada em (i) metalômica qualitativa: identificação das espécies metálicas individuais; (ii) metalômica quantitativa: determinação das concentrações destas espécies; e (iii) metalômica comparativa: monitoramento das alterações do metaloma de determinado organismo, sob a influência de estímulo externo. Ainda dentro da metalômica, é possível subdividi-la na “metaloproteômica”, onde os objetos de estudo são os íons metálicos e/ou metaloides que estão complexados em biomoléculas, como as proteínas. [51-53].

Os estudos metaloproteômicos, na visão analítica, consistem em três componentes principais: (i) a técnica de separação; isto é, a contribuição para o isolamento das espécies-alvo da matriz, denominada como componente de seletividade; (ii) o detector sensível para a quantificação dos elementos; denominado como componente de sensibilidade; e (iii) o detector específico para moléculas; objetivando a sua caracterização, denominado como componente estrutural [51-53].

Considerando que no primeiro e segundo capítulos desta tese foram discutidos os fundamentos do componente de seletividade 2D PAGE (eletroforese bidimensional) e de sensibilidade SR XRF e GFAAS (fluorescência de raios-X com radiação síncrotron e espectrometria de absorção atômica em forno de grafite), serão apresentados a seguir os principais fundamentos da técnica de espectrometria de massas, que constitui a componente estrutural nesses estudos.

1.3.3. Componente estrutural dos estudos proteômicos e metalômicos

As proteínas a serem analisadas em estudos proteômicos e/ou metalômicos devem ser primeiramente isoladas ou extraídas de lisados celulares ou tecidos. Tal procedimento comumente emprega metodologias de extração ou fracionamento, definindo o “sub-proteoma” a ser estudado. A próxima etapa consiste em dividir a proteína de interesse em uma série representativa de peptídeos. Um dos métodos utilizados para produzir peptídeos é a digestão da proteína com enzimas proteolíticas, em geral, a tripsina, chamado de “digestão trípica” [54].

Os peptídeos obtidos na etapa de digestão trípica podem então ser caracterizados por espectrometria de massas utilizando-se a Espectrometria de massas por tempo de voo com ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) e a Espectrometria de massas em sequência com ionização por eletrospray (ESI MS MS) [55]. A seguir serão discutidas as etapas de preparo dos spots proteicos por digestão trípica e as técnicas de caracterização das proteínas por espectrometria de massas.

1.3.3.1. Digestão trípica

A digestão proteolítica é uma etapa crítica no sequenciamento por espectrometria de massas, pois são gerados os peptídeos com massas molares dentro da faixa de massas dos espectrômetros, sendo essencial a fragmentação feita de maneira eficiente. A tripsina é o reagente mais utilizado nos experimentos de sequenciamento por espectrometria de massas por ter um custo relativamente baixo, por possuir uma alta atividade proteolítica, produzir peptídeos pequenos (na faixa de 600 a 2500 Da) e poder ser covalentemente modificada, de modo a minimizar os processos de autodigestão ou autólise [56].

A tripsina cliva as ligações peptídicas de proteínas após os grupos carboxila dos resíduos de lisina (K) e arginina (R), exceto quando estas ligações são com resíduos de prolina (P), ou seja, ligações K-P ou R-P [55, 56].

Existem dois tipos de digestão trípica: em gel ou em solução. A digestão em gel é assim chamada porque a proteína é processada e digerida enquanto está contida em um spot de gel de

poliacrilamida. Já a digestão em solução é aplicada em proteínas ou mistura de proteínas que estão presentes na solução do extrato proteico sem a utilização da separação eletroforética [57].

Na maioria das aplicações proteômicas, a digestão é feita mais adequadamente pelo tratamento da proteína em um spot de gel 2D PAGE. Ao utilizar a digestão em gel, é possível estabelecer uma relação direta entre as observações feitas pelos experimentos eletroforéticos e os peptídeos digeridos [55-57].

1.3.3.2. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas tem se tornado uma ferramenta essencial na química de proteínas moderna, devido não apenas à sua sensibilidade, mas também ao conteúdo total de informações fornecido por esta técnica. Os espectrômetros de massas podem ser utilizados tanto para a simples determinação da massa molar de um polipeptídeo, quanto para a determinação da sequência de aminoácidos, identificação de novos biomarcadores, interações proteína-proteína e caracterização de modificações pós-traducionais [58, 59].

Os espectrômetros de massas consistem em uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector de íons e uma unidade de aquisição de dados. É um instrumento analítico capaz de converter moléculas neutras em íons na forma gasosa e separá-las de acordo com a sua razão massa/carga (m/z), utilizando campos eletromagnéticos para isso. As técnicas de ionização mais empregadas em análise de proteínas são a MALDI (ionização por dessorção a laser assistida por matriz) e a ESI (ionização por eletrospray) e os tipos básicos de analisadores de massas são o *ion trap* (IT), o quadrupolo (Q) e o tempo de voo (TOF) [60].

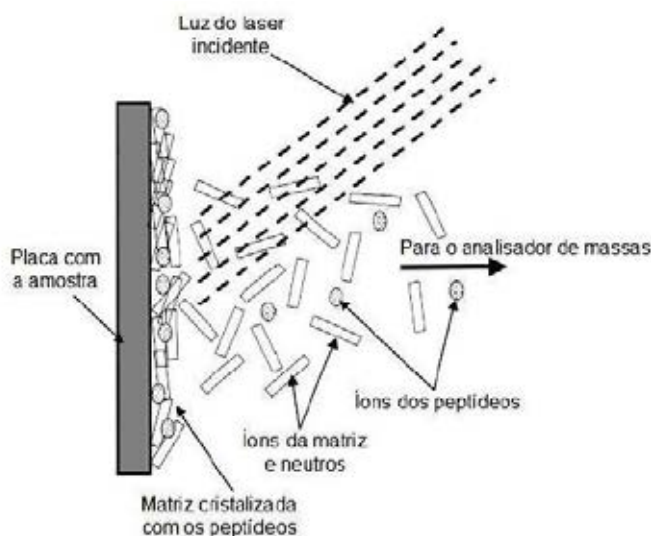
Na identificação de proteínas, dois diferentes métodos de ionização da amostra são comumente empregados. A MALDI-TOF MS é empregada na obtenção da “impressão digital” (*fingerprint*) de peptídeos e proteínas e a ESI MS MS é utilizada na elucidação da sequência peptídica e identificação da proteína correspondente [60, 61].

1.3.3.2.1. MALDI-TOF MS

Na abordagem proteômica clássica, a MALDI-TOF MS é empregada na obtenção da “impressão digital” das massas de peptídeos provenientes de proteínas intactas separadas previamente por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D PAGE). Nesta estratégia de análise, as proteínas são identificadas pela correlação entre uma lista de massas de peptídeos obtida experimentalmente com uma lista de todas as massas de peptídeos calculadas, disponível em bancos de dados [51, 62].

A primeira etapa da MALDI consiste em dissolver os peptídeos de uma determinada amostra em uma matriz orgânica ácida absorvedora de radiação UV e aplicá-los em uma placa. Conforme o solvente desta mistura seca, a matriz cristaliza e as moléculas dos peptídeos são incluídas dentro dos cristais da mesma, por co-cristalização. A matriz deve estar em excesso em relação à amostra, de modo que, quando o laser atinge o spot *matriz/amostra* a ser analisado, a energia é absorvida primeiramente pela matriz. Esta energia é transferida da matriz para a amostra de uma maneira suave, de modo que o processo de ionização não ocasiona a fragmentação dos peptídeos. A absorção da energia do laser causa a evaporação da matriz, sendo que o analito, resultante na fase gasosa, torna-se ionizado via mecanismos de transferência de prótons em fase gasosa [51, 62]. O mecanismo da MALDI não é bem definido, porém, o efeito geral do processo é produzir íons de peptídeos intactos, sem fragmentação [62]. Uma visão geral dos processos associados com a MALDI está representada na Figura 3.11.

Figura 3.11 – Representação dos processos que ocorrem durante a MALDI.



Fonte: Adaptado de *Kinter & Sherman*, em *Gross*, 2011 [62].

Estes íons são posteriormente separados por TOF, onde são acelerados a uma alta energia cinética e separados ao longo de um tubo de tamanho específico. Os íons mais leves, ou seja, com menores relações m/z , passam mais rapidamente pelo tubo do que os íons mais pesados (com maiores relações m/z) e, a partir deste princípio, o tempo de passagem pelo tubo até atingir o detector é utilizado para determinar a relação m/z dos íons. A alta resolução e exatidão na medida de massa são suas principais características [63].

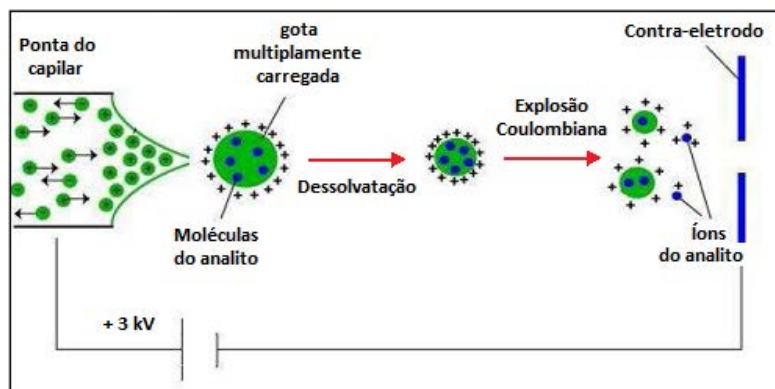
As vantagens da MALDI-TOF MS são a fácil automação, a análise de grande número de amostras em curto período de tempo, a identificação da proteína depende apenas da comparação exata das massas dos peptídeos, e a interpretação dos espectros ser simples, uma vez que a MALDI produz, majoritariamente, íons monocarregados. Apesar destas vantagens, é preciso atenção na remoção dos interferentes da amostra e na calibração dos espectros produzidos [62, 63].

1.3.3.2.2. ESI MS MS

Desde seu surgimento, a ESI MS tornou-se uma das técnicas analíticas mais poderosas e amplamente utilizadas. Dentre as vantagens da ESI MS incluem alta sensibilidade e seletividade, facilidade de uso e consumo reduzido de amostra. Uma ampla variedade de substâncias pode ser analisada, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, e até mesmo complexos metálicos, desde que sejam iônicos ou apresentem sítios ácidos ou básicos [64].

O processo eletrospray pode ser descrito com relativa simplicidade. A produção de íons requer, essencialmente, dois passos: dispersão de gotas altamente carregadas, quase à pressão atmosférica, seguida por condições que permitam a evaporação da gota. Envolve a formação de um *spray* eletrolítico, que gera pequenas gotas carregadas e destas são liberados os íons. É necessária uma fonte de alta tensão (1,0 a 7,0 kV) que esteja em contato com a solução contendo os eletrolíticos. Esta solução é bombeada através de um microcapilar (d.i. 50 a 100 μm) com uma velocidade de fluxo da ordem de 1 a 20 $\mu\text{L min}^{-1}$ ou menores. Quando um potencial positivo é aplicado na solução, os íons positivos tendem a se afastar para uma região menos positiva, isto é, em direção ao contra-eletródo. Conforme a densidade de carga aumenta na gota, o campo elétrico formado entre o capilar e o eletródo aumenta, provocando uma deformação na gota que está presa na ponta do capilar. A gota ganha forma de cone e permanece “presa” ao capilar até o momento em que a densidade de carga na superfície da gota e o aumento da repulsão entre os íons vençam a tensão superficial, ocorrendo liberação de pequenas gotas com alta densidade de carga. Como resultado final, os íons tornam-se completamente dessolvatados [62-65]. A Figura 3.12 ilustra o processo que acontece em uma fonte ESI.

Figura 3.12 – Ilustração do processo de formação de íons numa fonte de eletrospray.



Fonte: Adaptado de Gross, 2011 [64].

Esta versatilidade de técnicas tem aumentado significativamente a gama de substâncias capazes de serem determinadas, possibilitando, por exemplo, que polipeptídios possam ser analisados sem que haja sua decomposição [51, 62-65].

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Equipamentos e Acessórios

Os equipamentos e acessórios utilizados nesta etapa do trabalho foram anteriormente relacionados (Capítulo 1); e para a etapa de caracterização das proteínas obtidas nos spots dos géis, foi utilizado espectrômetro de massas com fonte de ionização por ESI e analisador de massas híbrido, marca Waters, modelo Xevo G2 Q-TOF, acoplado com sistema nanoAcquity Ultra Performance LC (Manchester, UK).

2.2. Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica, sendo as soluções preparadas todas com água ultrapura, obtida pelo sistema PURELAB Ultra. Os frascos, vidrarias e demais utensílios utilizados foram lavados com Extran[®] 10% (v/v) e em seguida com ácido nítrico 10% (v/v) por 24 h. Posteriormente, foram lavados com água ultrapura e secos em estufa, exceto as vidrarias volumétricas, secas à temperatura ambiente. Os reagentes/soluções utilizados para a obtenção dos géis de poliacrilamida no desenvolvimento desta etapa do trabalho foram já mencionados no Capítulo 1. Os demais itens utilizados para a caracterização proteica seguem a seguir:

- Acetonitrila (J.T. Baker) (grau LC-MS, Sigma-Aldrich);
- Ácido Fórmico (Sigma-Aldrich);
- Água Ultrapura (grau LC-MS, Sigma-Aldrich);
- Bicarbonato de amônio (Sigma);
- Tripsina (Promega);
- Solução 50 mmol L⁻¹ de Bicarbonato de amônio;
- Solução 25 mmol L⁻¹ de Bicarbonato de amônio;
- Solução descorante: 50% (v/v) de Acetonitrila em 25 mmol L⁻¹ de Bicarbonato de amônio;
- Solução de redução: 20 mmol L⁻¹ de DTT em 50 mmol L⁻¹ de Bicarbonato de amônio;
- Solução de alquilação: 55 mmol L⁻¹ de iodoacetamida em 50 mmol L⁻¹ de Bicarbonato de amônio;
- Solução 100 µg mL⁻¹ de tripsina em 50 mmol L⁻¹ de Ácido Acético;
- Solução bloqueadora: 5% (v/v) de Ácido Fórmico em 50% (v/v) de Acetonitrila;
- Solução eluente A: 1% (v/v) de Ácido Fórmico em 50% (v/v) de Acetonitrila;
- Solução eluente B: 1% (v/v) de Ácido Fórmico em 60% (v/v) de Metanol;
- Solução fase móvel A: 0,1% (v/v) de Ácido Fórmico em Água Ultrapura (grau LC-MS);
- Solução fase móvel B: 0,1% (v/v) de Ácido Fórmico em Acetonitrila (grau LC-MS);

2.3. Preparação das Amostras para Eletroforese 2D PAGE

O preparo das amostras para o fracionamento das proteínas por 2D PAGE foi feito utilizando-se os processos de extração aquosa e de precipitação fracionada que serão descritos a seguir.

2.3.1. Extração das proteínas

Cerca de 2 g do pool das amostras de tecido muscular de dourada, pacu e jaraqui foram macerados em volume equivalente de água ultrapura (proporção 1:1) com auxílio de almofariz e pistilo. Em seguida, os extratos contendo as proteínas foram separados da parte sólida por centrifugação por 10 min a 10000 rpm a 4°C, em centrífuga refrigerada. Os extratos proteicos obtidos dessas amostras foram transferidos para microtubos de 2 mL e foram utilizados posteriormente para quantificação dos teores proteicos totais, de mercúrio total, e para as precipitações das proteínas utilizadas nas corridas eletroforéticas.

2.3.2. Precipitação Fracionada e Ressolubilização das Proteínas

Para a obtenção das proteínas de menor massa molar, a precipitação das proteínas contidas nos extratos proteicos foi feita em duas etapas (precipitação fracionada). Na primeira etapa, alíquotas de 1 mL de solução etanol-clorofórmio e do extrato proteico foram transferidas para microtubos de 2 mL (proporção 1:1). A mistura homogênea foi mantida em geladeira por 15 minutos, tempo suficiente para formação de precipitado proteico. Após esse tempo, a mistura heterogênea foi centrifugada por 10 min a 10000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi então separado para nova submissão à precipitação e os precipitados obtidos (*pellets* com proteínas de alta massa molar) foram mantidos nos microtubos e guardados em freezer a -20°C para posterior determinação de mercúrio total.

Na segunda etapa de precipitação, em microtubos de 2 mL foi adicionado 1 mL do sobrenadante retirado da primeira etapa e 400 µL de solução etanol-ácido clorídrico (proporção 2,5:1). Essa etapa de precipitação foi conduzida em freezer a -20°C durante 3 horas, garantindo assim que a precipitação ocorresse de maneira quantitativa. Em seguida, a mistura heterogênea foi centrifugada a 10000 rpm a 4°C em centrífuga refrigerada por 10 min, descartando-se o sobrenadante. O precipitado proteico (*pellet* de interesse com proteínas de baixa massa molar) foi lavado quatro vezes com 1 mL de etanol gelado (-20°C) para remoção de resquícios de ácido clorídrico.

Este procedimento foi conduzido com réplicas (n=3) para se garantir a obtenção de *pellets* que seriam utilizados tanto para a quantificação de proteína total e mercúrio total, quanto para as corridas de 2D PAGE.

Para a quantificação de proteína total o *pellet* foi ressolubilizado em solução de NaOH 0,50 mol L⁻¹; já para a determinação de mercúrio total foi feita mineralização ácida do *pellet* conforme procedimento descrito no Capítulo 2, procedimento este já publicado [66]. Para as separações eletroforéticas, o *pellet* foi ressolubilizado em tampão específico, conforme procedimento descrito no Capítulo 1, procedimento este também já publicado [42].

2.3.3. Determinação de proteína total

A determinação de proteína total nos extratos dos *pellets* obtidos na segunda etapa do processo de precipitação das proteínas foi feita utilizando-se o método do Biureto, empregando albumina de soro bovino como padrão [40]. A determinação de proteína total nos extratos dos *pellets* permite calcular o volume de extrato proteico que contenha 375 µg de proteína, para ser aplicado em cada fita de IEF utilizada na primeira etapa da eletroforese bidimensional [40-42].

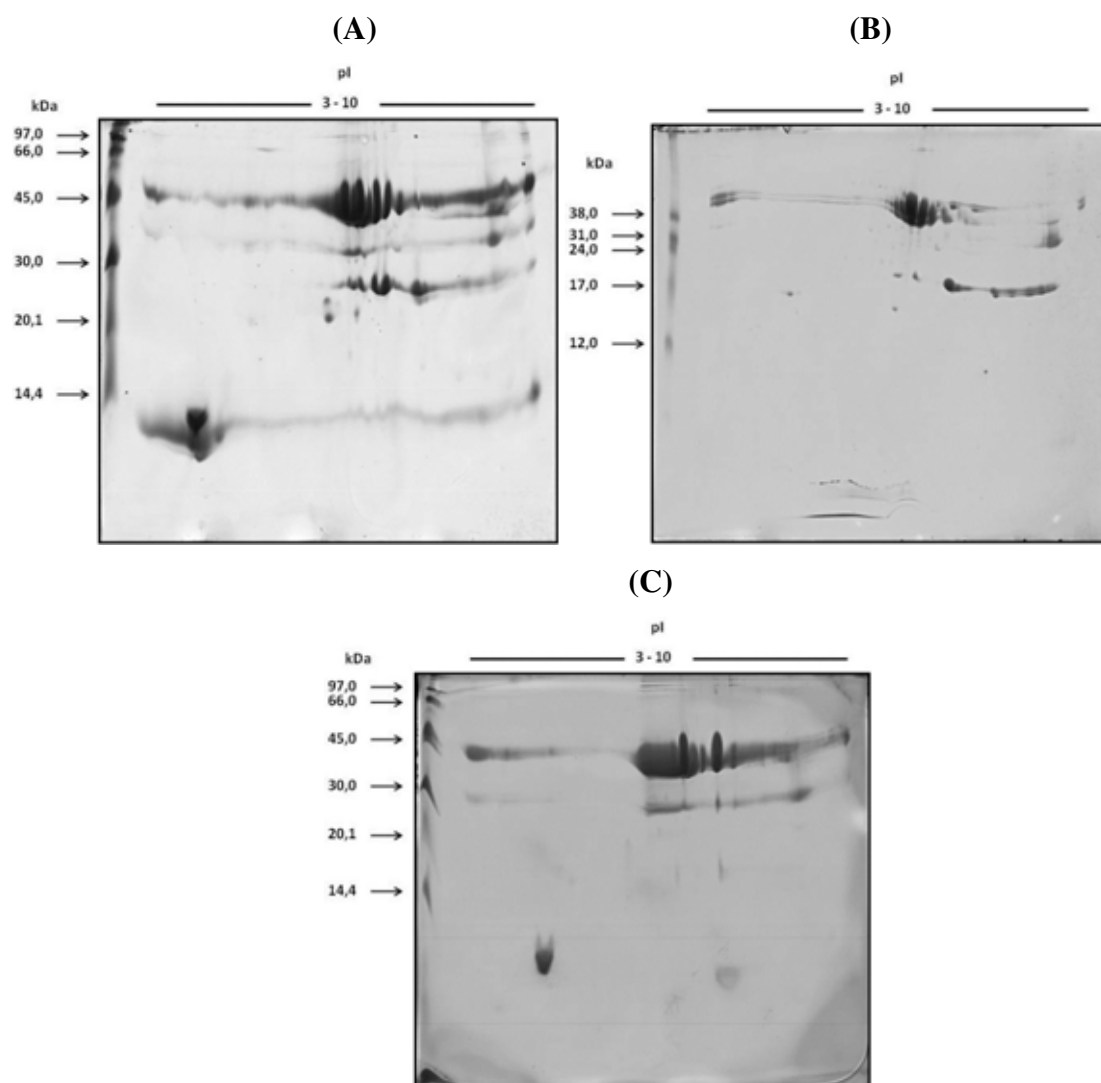
2.4. Corridas Eletroforéticas

As corridas eletroforéticas para fracionamento das proteínas das amostras de tecido muscular foram feitas utilizando-se os procedimentos descritos no Capítulo 1 e já publicados [40-42, 47]. No entanto, nesta etapa do estudo, as corridas eletroforéticas foram desenvolvidas em géis de poliacrilamida com concentração de 15% (m/v) e utilizando os *pellets* obtidos no processo de precipitação fracionada (massa molar < 50 kDa). Além disso, a solução tampão de corrida utilizada na segunda dimensão do processo eletroforético foi dez vezes mais concentrada que a utilizada na primeira etapa do trabalho (Capítulo 1). No caso, as concentrações foram: - primeira etapa: Tris-HCl 2,5 mmol L⁻¹, SDS 0,01% (m/v) e Glicina 19,2 mmol L⁻¹; - segunda etapa: Tris-HCl 25 mmol L⁻¹, SDS 0,1% (m/v) e Glicina 192 mmol L⁻¹.

Foi feita essa modificação após não se obter completa migração dos spots proteicos no gel de poliacrilamida 15% (m/v) utilizando as condições anteriores (Figura 3.13). No caso, com o aumento da concentração do tampão de corrida (mantendo a mesma programação de tensão/corrente) houve uma diminuição no tempo de corrida para 4 h e melhora acentuada na migração dos spots proteicos.

Após o período de corrida, as proteínas foram fixadas, coradas e reveladas utilizando-se os mesmos procedimentos descritos no Capítulo 1 [40-42, 47]. Os géis obtidos foram, por fim, digitalizados em Scanner (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e analisados utilizando-se o software ImageMaster 2D Platinum 7.0. A correlação obtida entre os géis foi feita pela equivalência entre os spots de três géis em cada repetição de corrida (*matching*), onde os spots foram comparados quanto à sua distribuição, volume, intensidade relativa, ponto isoelétrico (pI) e massa molar (Mm). Nessa etapa do trabalho, além das análises de correlação entre os géis, também foi feita a estimativa da massa de proteína por spot com base no cálculo do volume de cada spot proteico no gel de poliacrilamida (dado determinado pelo software de tratamento de imagens – % vol).

Figura 3.13 – Gel de poliacrilamida 15% (m/v) de músculo de dourada (A), de pacu (B) e de jaraqui (C) obtidos nas condições de corrida 2D PAGE utilizadas na primeira etapa do trabalho (Capítulo 1).



2.5. Determinação de mercúrio total

A determinação de mercúrio total nas amostras de tecido muscular dos peixes, nos extratos proteicos dos *pellets* de maior e menor massa molar, e nos spots proteicos, foi feita por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) conforme procedimento descrito a seguir.

As amostras de tecido muscular dos peixes estudados foram mineralizadas conforme descrito anteriormente (item 2.3. do Capítulo 2), enquanto que as amostras de extratos dos *pellets* e spots proteicos foram mineralizadas da seguinte forma: três repetições dos spots proteicos (obtidos das repetições na corrida eletroforética) e/ou a massa total dos *pellets* proteicos de cada uma das duas etapas da precipitação fracionada (~100 mg; obtidos pela diferença da massa

inicial do microtubo vazio e a massa final, após a precipitação das proteínas) foram transferidos para frascos de digestão. Para cada frasco de digestão foram transferidas alíquotas de 0,50 mL de ácido sulfúrico concentrado e 0,25 mL de peróxido de hidrogênio 30% (m/m). O conjunto de frascos foi colocado em banho de ultrassom da UNIQUE à temperatura de 40°C e 135 W de potência, até completa mineralização das amostras (extrato translúcido). Em seguida, os extratos ácidos obtidos foram transferidos para balões volumétricos de 5,00 mL completando-se os volumes com água ultrapura. Para validação do método de mineralização foi utilizado padrão certificado *Fish Protein* DORM 4 NRC contendo $410 \pm 55 \mu\text{g kg}^{-1}$ de mercúrio total.

Na determinação de mercúrio 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*, tubo de grafite pirolítico com plataforma integrada e amostrador automático ASC-6100. Foi utilizada lâmpada de cátodo oco de mercúrio SHIMADZU, operada com corrente mínima de 12 mA e corrente máxima de 400 mA (corrente utilizada na correção de fundo – BG). O comprimento de onda utilizado foi de 253,7 nm e resolução espectral de 0,5 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 área de pico.

Os parâmetros analíticos utilizados nas determinações, tais como: temperaturas de secagem, de pirólise e de atomização, modificadores químicos e volume de amostra injetado, foram descritos anteriormente (item 2.4. do Capítulo 2) [66].

2.6. Determinação de macro e microminerais no tecido muscular

As determinações de alguns macro e microminerais (cálcio, cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) nas amostras de tecido muscular de dourada, pacu e jaraqui foram feitas por espectrometria de absorção atômica chama e/ou forno de grafite. O equipamento utilizado nessas determinações foi o mesmo descrito no item 2.5., no entanto, utilizando condições já otimizadas e publicadas pelo grupo [40-42, 47].

2.7. Digestão trípica dos spots proteicos para caracterização por ESI MS MS

Os spots proteicos selecionados para a etapa de caracterização foram extraídos dos géis utilizando-se bisturi e cortados em segmentos de aproximadamente 1 mm³. Os seguimentos foram transferidos para microtubos de 2 mL contendo ácido acético 1% e mantidos em geladeira até os passos subsequentes, descritos a seguir [67]:

I. Remoção do corante

- Com uma pipeta de 200 μL , o ácido acético foi retirado e os segmentos dos spots foram lavados com solução descorante adicionando um volume suficiente para cobrir o gel, mantendo-se em repouso por 10 min;
- A solução descorante foi removida em seguida e o processo de lavagem repetido até a retirada total do corante *comassie blue* e que o gel ficasse transparente. Após as lavagens foi adicionado acetonitrila, e após agitação a mistura foi mantida em repouso por 10 min (decorrido esse tempo o gel deve ficar branco);
- A acetonitrila foi removida e este passo foi repetido por mais uma vez. Após a segunda remoção desse solvente, o tubo permaneceu aberto por 30 min para que o resíduo remanescente da acetonitrila fosse evaporado à temperatura ambiente;
- Os fragmentos desidratados e sem coloração foram armazenados em freezer até o próximo passo.

II. Redução e alquilação

- Os fragmentos de gel foram reidratados em aproximadamente 200 μL de solução de redução e incubados a 56°C em banho-maria por 40 min;
- Com auxílio de uma pipeta, a solução de redução foi removida e adicionou-se aproximadamente 200 μL de solução de alquilação. Em seguida, a mistura foi incubada na ausência de luz por 30 min à temperatura ambiente;
- A solução de alquilação foi removida e os fragmentos lavados com bicarbonato de amônio 25 mmol L^{-1} por 3 min;
- Após esse tempo a solução de bicarbonato de amônio foi removida e os fragmentos foram desidratados duas vezes com acetonitrila por 10 min. A acetonitrila foi descartada e o resíduo remanescente nos fragmentos foi evaporado à temperatura ambiente;
- Os fragmentos desidratados foram armazenados em freezer até o próximo passo.

III. Digestão trípica das proteínas

- Foi preparado um banho-maria a 37°C aproximadamente duas horas antes de se iniciar a digestão para que a temperatura ficasse estável;
- Foram preparados microtubos de 1,5 mL com a marcação das amostras que seriam digeridas para utilizar no dia posterior;

- Foi preparada a solução de tripsina para a digestão das proteínas a partir da alíquota de 10 μL de tripsina com 90 μL de solução gelada de bicarbonato de amônio 25 mmol L^{-1} , deste modo, obteve-se a concentração final da enzima em solução de 10 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$;
- Transferiu-se para os microtubos que continham os fragmentos de géis desidratados, 15 μL de solução digestora contendo 150 ng de tripsina;
- Após 15 min foi adicionado ao microtubo solução de bicarbonato de amônio 25 mmol L^{-1} até completa cobertura dos fragmentos de gel;
- Os fragmentos foram então incubados a 37°C em banho-maria por 14 h.

IV. Eluição dos peptídeos

- Os microtubos com as amostras foram retirados do banho-maria e centrifugados (foi dado somente um *spin*) para que as gotas retidas na tampa descessem;
- Adicionou-se em seguida 15 μL de solução bloqueadora;
- Logo em seguida, foi adicionado aproximadamente 100 μL do eluente A e transferiu-se a mistura para banho ultrassom por 15 min a 40°C. Após esse tempo, retiraram-se os microtubos do ultrassom, foi dado um *spin* em centrífuga e com uma pipeta acoplada a uma ponteira de microcapilaridade transferiram-se os sobrenadantes para os microtubos de 1,5 mL preparados no dia anterior. As ponteiras utilizadas foram deixadas dentro dos microtubos para utilizá-las nos passos posteriores;
- Este procedimento com o eluente A foi repetido mais uma vez e em seguida os sobrenadantes foram transferidos para os microtubos de 1,5 mL;
- Foi adicionado então aproximadamente 100 μL do eluente B e transferiram-se os microtubos para banho ultrassom por 15 min a 40°C. Decorrido esse tempo, os microtubos foram removidos do ultrassom, foi dado um *spin* em centrífuga e os sobrenadantes foram transferidos para os microtubos de 1,5 mL;
- Foi adicionado em seguida aproximadamente 100 μL de acetonitrila e transferiram-se os microtubos para banho ultrassom por 15 min a 40°C. Após esse tempo, os microtubos foram retirados do ultrassom, foi dado um *spin* em centrífuga e os sobrenadantes foram transferidos para os microtubos de 1,5 mL;
- Finalmente, os microtubos de 1,5 mL com a solução contendo os peptídeos extraídos foram submetidos à secagem em um concentrador a vácuo sob temperatura de 30°C até aproximadamente 1 μL . Após esse processo, as alíquotas das soluções contendo os peptídeos foram armazenadas em freezer até análise por espectrometria de massas.

2.8. Caracterização das proteínas por ESI MS MS

As alíquotas das soluções contendo os peptídeos foram dissolvidas em 10 μL de ácido fórmico e acetonitrila (0,1/3%) e analisadas para obtenção dos espectros de massas utilizando espectrômetro de massa com fonte de ionização por ESI e analisador de massas híbrido Xevo G2 Q-TOF, acoplado com sistema nanoAcquity Ultra Performance LC (Waters, Manchester, UK).

O sistema nanoAcquity UPLC foi equipado com coluna de fase reversa HSS T3 (75 μm x 150 mm; 1,8 μm tamanho da partícula) que foi equilibrada com fase móvel A. Em seguida, os peptídeos foram separados em gradiente linear de 7-85% da fase móvel B durante 31 min com fluxo de 0,4 mL min^{-1} . A temperatura da coluna foi mantida em 35°C. O espectrômetro de massas Xevo G2 Q-TOF foi operado em modo de íons positivos e os dados de nanoeletrospray foram coletados usando o método do MSE em energia elevada (19-45 V), o qual permite a aquisição de dados dos precursores e dos íons de fragmento em uma injeção. As condições da fonte utilizadas foram: tensão capilar 2,5 kV; amostragem em cone 30 V; extração em cone 5 V; e temperatura da fonte 80°C. A aquisição de dados foi obtida durante 20 min, no intervalo de 50-2000 Da. O *lockspray* foi usado para assegurar a precisão e reprodutibilidade com solução [Glu1]fibrinopeptide (1 pmol μL^{-1}) com taxa de fluxo de 1 $\mu\text{L min}^{-1}$ como um íon de referência no modo positivo em m/z 785,8427. O software ProteinLynx Global Server versão 3.0 foi utilizado para processar e consultar os dados LC-MSE. A identificação das proteínas foi obtida com contabilização do algoritmo do íon incorporado através do software e procura em base de dados.

A identificação das proteínas foi feita por homologia utilizando banco de dados *Uniprot* [68]. Nessa etapa, é importante o conhecimento da classificação taxonômica das espécies de peixe estudadas. O banco de dados utilizado na busca foi a série “Otophysi”, que está dentro da superordem Ostariophysi e engloba tanto a ordem taxonômica Characiformes (pacu e jaraqui), quanto a ordem Siluriformes (dourada).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação da concentração de proteína total

A obtenção dos *pellets* proteicos foi feita utilizando-se o processo de precipitação fracionada, conforme descrito no item 2.3.2., com o objetivo de obter frações com proteínas menores (massa molar < 50 kDa). A literatura descreve que o mercúrio apresenta maior afinidade por proteínas com massa molar abaixo de 10 kDa, as chamadas metalotioneínas – proteínas que por apresentarem grande porcentagem de cisteínas (aminoácidos que contêm grupos sulfidríla, classificados como base mole) formam complexos estáveis com o mercúrio [33, 35]. Dessa forma, optou-se por trabalhar com as proteínas presentes na fração de menor massa molar, na tentativa de identificar possíveis proteínas ligadas ao mercúrio.

Assim como na primeira etapa do trabalho (Capítulo 1), inicialmente foi feita a determinação da concentração total de proteína nos extratos obtidos a partir da ressolubilização dos *pellets* proteicos das amostras de tecido muscular das espécies de peixe estudadas, com o objetivo de aplicar uma quantidade de massa proteica conhecida nas fitas de IEF das corridas eletroforéticas. Essas determinações foram feitas utilizando-se o método do Biureto descrito no item 2.3.3. [40-42]. As concentrações de proteína total nos extratos dos *pellets* de menor massa molar foram (g L^{-1}): dourada – $11,20 \pm 0,30$; pacu – $12,60 \pm 0,35$; e jaraqui – $11,70 \pm 0,25$.

Com base no resultado da concentração de proteína total presente nas amostras de tecido muscular, foi possível calcular o volume de amostra (extrato proteico) a ser aplicado nas fitas de IEF na etapa de hidratação, anterior à focalização isoeletrica (separação das proteínas em 1D), a fim de se obter uma massa de proteína de 375 μg , que, com base no manual do sistema IEF, pode favorecer uma melhor separação das proteínas no gradiente de pH 3-10 [40-42]. Observa-se que os resultados obtidos nas amostras de tecido muscular das três espécies de peixes apresentam valores bem próximos, o que demonstra que o processo de extração foi eficiente e homogêneo.

3.2. Fracionamento das proteínas por 2D PAGE

Nessa etapa do trabalho os experimentos de eletroforese 2D PAGE foram feitos utilizando os extratos obtidos na ressolubilização dos *pellets* proteicos de menor massa molar (< 50 kDa) das amostras de tecido muscular das espécies de peixe: dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*), pacu (*Mylossoma* sp., *Myleus* sp.) e jaraqui (*Semaprochilodus* sp.).

Os géis de cada amostra obtidos nas corridas eletroforéticas foram utilizados na determinação de mercúrio nos spots proteicos e na caracterização das proteínas contida nos spots por ESI MS MS. Conforme descrito no item 2.4., a solução tampão de corrida utilizada na

segunda dimensão do processo eletroforético nessa etapa do trabalho foi dez vezes mais concentrada que a utilizada na primeira etapa do trabalho. Essa alteração de concentração do tampão de corrida permitiu obter uma melhor migração dos spots no gel de poliacrilamida e a diminuição no tempo de corrida, mantendo-se a mesma programação de tensão/corrente e concentração do gel em 15% (m/v).

As análises de correlação entre as repetições dos géis (*matching*) e a contagem de spots proteicos obtidos em cada gel foram feitas utilizando-se os parâmetros para obtenção das imagens descritos no manual do programa ImageMaster 2D Platinum 7.0 Edition AA [69]. Nas Figuras 3.14-3.16 são apresentados um exemplo de cada gel obtido nas corridas eletroforéticas das amostras de tecido muscular de dourada, pacu e jaraqui. Os resultados médios das análises de correlação entre as repetições dos géis, bem como a contagem média de spots dos mesmos, são apresentados na Tabela 3.2. Os spots proteicos destacados com círculo são aqueles nos quais foi detectada a presença de mercúrio e determinada as concentrações deste elemento por GFAAS.

Figura 3.14 – Gel a 15% (m/v) obtido por 2D PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido muscular de dourada. Os números e círculos em vermelho indicam os spots que foram identificados com presença de mercúrio e caracterizados por ESI MS MS.

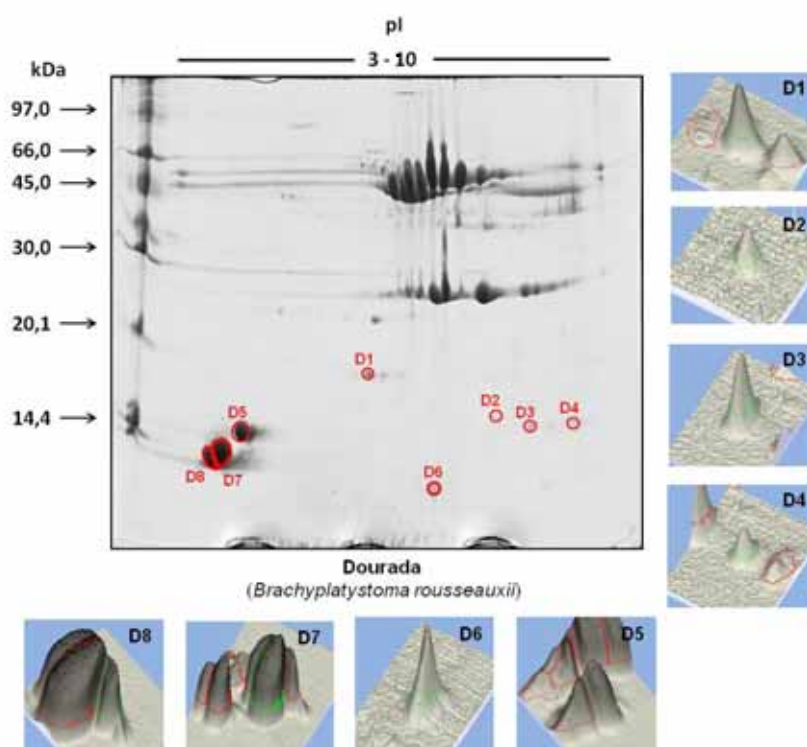


Figura 3.15 – Gel a 15% (m/v) obtido por 2D PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido muscular de pacu. Os números e círculos em vermelho indicam os spots que foram identificados com presença de mercúrio e caracterizados por ESI MS MS.

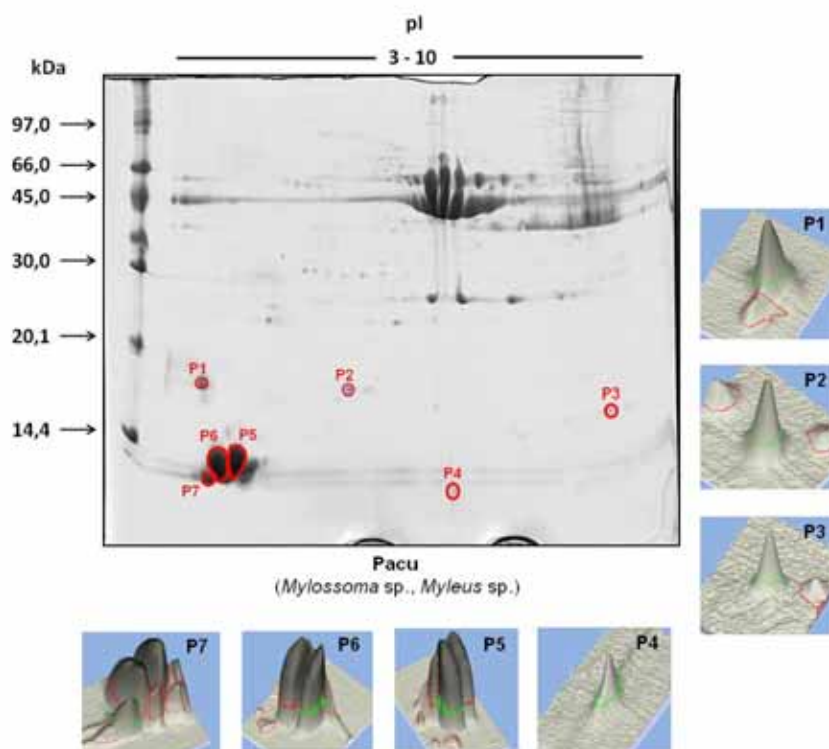


Figura 3.16 – Gel a 15% (m/v) obtido por 2D PAGE (faixa de pH 3-10) para amostras de tecido muscular de jaraqui. Os números e círculos em vermelho indicam os spots que foram identificados com presença de mercúrio e caracterizados por ESI MS MS.

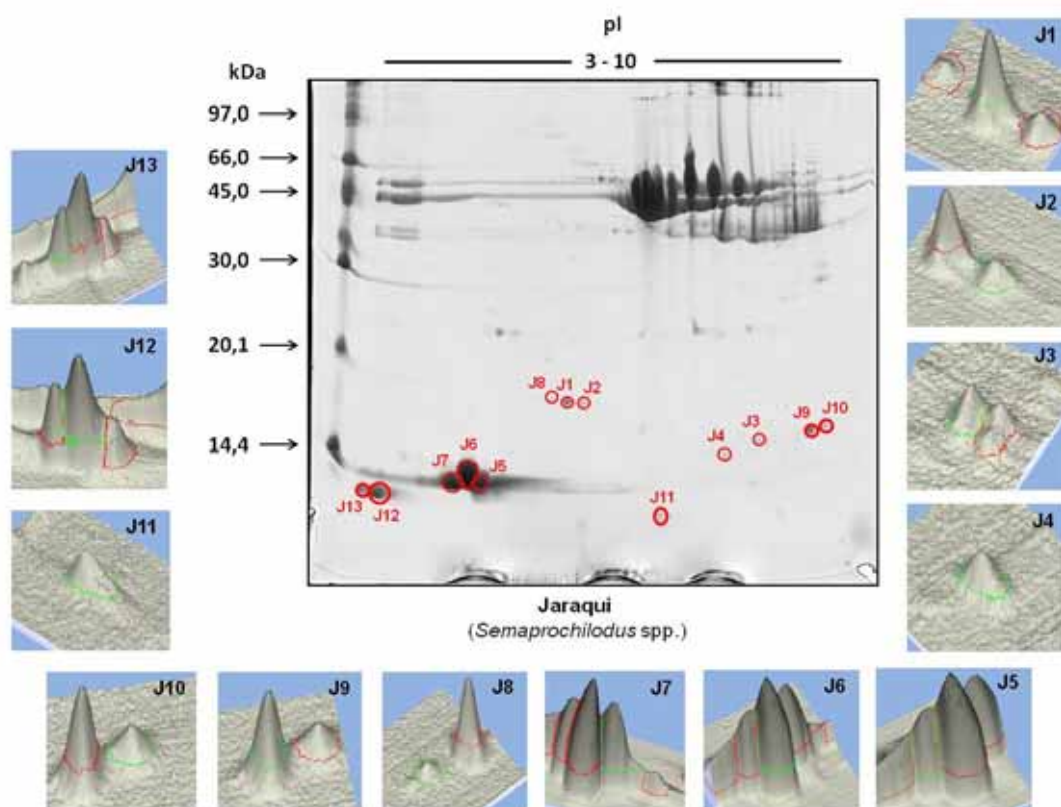


Tabela 3.2 – Análise de correlação entre os géis obtidos no fracionamento das proteínas nas amostras de tecido muscular de peixes.

Espécies de peixes	Nº de médio de spots (n=4)	Correlação média entre os géis (<i>matching</i>)
Dourada	171 ± 2	74 ± 2 %
Pacu	235 ± 6	77 ± 3 %
Jaraqui	210 ± 3	75 ± 2 %

Analisando-se as Figuras 3.14-3.16, os géis das amostras de tecido muscular das espécies de peixe estudadas apresentaram melhor resolução quando comparados aos géis das mesmas amostras apresentados na Figura 3.13. O aumento na concentração do tampão de corrida melhorou a migração dos spots proteicos no gel, o que favoreceu a eficiência no processo de fracionamento das proteínas por 2D PAGE. A análise de correlação entre os géis (Tabela 3.2) demonstrou que, em média, mais de 70% dos spots proteicos estavam presentes nos quatro géis das amostras de tecido muscular de dourada, pacu e jaraqui. Deve-se destacar que o número médio de spots encontrados nos géis e o *matching* (correlação entre os géis) apresentaram desvios padrões menores que 5%, resultados estes bem mais robusto quando comparados com resultados da literatura [32, 38, 49, 52, 70, 71], demonstrando que as condições da 2D PAGE otimizadas foram eficientes.

3.3. Avaliação quantitativa de mercúrio e de macro e microminerais

A determinação de mercúrio nessa etapa do trabalho, além de ter sido feita nas amostras de tecido muscular das espécies de peixes estudadas e nos spots proteicos, também foi feita nos *pellets* proteicos obtidos no processo de precipitação fracionada das proteínas (*pellets* com > massa molar e com < massa molar). O objetivo desse procedimento foi fazer um balanço de massa de mercúrio em relação à concentração desse elemento nas amostras de tecidos e nos extratos dos *pellets* proteicos. Na Tabela 3.3 são apresentadas as concentrações de mercúrio nos *pellets* proteicos obtidos, a concentração de mercúrio nas amostras de tecido muscular das espécies dos peixes e a concentração de mercúrio em padrão certificado de proteína de músculo de peixe. Foi utilizado o padrão DORM 4 NRC para validar o método de determinação de mercúrio otimizado [66].

Tabela 3.3 – Resultados obtidos na determinação de mercúrio nos *pellets* de maior e menor massa molar (Mm) e nas amostras de tecido muscular.

Espécies de peixes	Pellets > Mm	Pellets < Mm	Tecido Muscular
Dourada	n.d.	215 ± 3	331 ± 7
Pacu	n.d.	57 ± 0,7	81 ± 2
Jaraqui	n.d.	86 ± 1	132 ± 4
DORM 4 NRC*	-	-	408 ± 3

Concentração de mercúrio em $\mu\text{g kg}^{-1}$; n.d. – não detectado (< LOQ);

* Padrão certificado de proteína de músculo de peixe contendo $410 \pm 55 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 3.3, observa-se que aproximadamente 65 a 70% do mercúrio presente nas amostras de tecido muscular está ligado nas proteínas dos *pellets* de massa molar menor que 50 kDa, enquanto que nos extratos dos *pellets* proteicos de massa molar maior que 50 kDa não foi detectado mercúrio. Com esses resultados, pode-se inferir, considerando que o processo de extração tenha sido eficiente, que a maior parte do mercúrio presente nas amostras de tecido muscular dos peixes estudados realmente está ligado à fração proteica e que o restante (cerca de 30-35%) pode estar ligado em outros compostos e/ou macromoléculas (por exemplo, lipídeos e carboidratos), ou outros tecidos.

Os dados apresentados são considerados bastante robustos porque foram validados com base no resultado obtido na determinação de mercúrio em padrão certificado DORM 4 NRC de proteína de músculo de peixe. A Tabela 3.3 mostra que o valor experimental do desvio padrão relativo obtido nas amostras é menor que 1% e que o valor experimental absoluto do padrão certificado ($408 \mu\text{g kg}^{-1}$) é cerca de 0,5% menor que o valor certificado absoluto ($410 \mu\text{g kg}^{-1}$), o que comprova a exatidão e a precisão do método otimizado para determinação de mercúrio.

Foram feitas também determinações de cálcio, cobre, ferro, manganês, selênio e zinco nas amostras de tecido muscular e nos *pellets* proteicos das amostras de peixes estudadas. Com os resultados das concentrações dos micro e macrominerais podemos fazer uma correlação da concentração desses minerais com a expressão dos spots proteicos nos quais foi determinada a presença de mercúrio. No entanto, a concentração de mercúrio total nas amostras de tecido muscular (Tabela 3.3) não caracterizou toxicidade elevada, visto que as concentrações determinadas apresentaram-se abaixo da prevista como de risco pela OMS ($500 \mu\text{g kg}^{-1}$) [66].

Dessa forma, optou-se por fazer a determinação total desses minerais nas amostras objetos de estudo e comparar com os valores da literatura e de outros trabalhos já desenvolvidos pelo grupo. Os resultados obtidos nessas determinações são apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Resultados obtidos na determinação de micro e macrominerais nos *pellets* de maior e menor massa molar (Mm) e nas amostras de tecido muscular de dourada, pacu e jaraqui.

Espécies de peixes	Amostra	Minerais (mg kg ⁻¹)					
		Cálcio	Cobre	Ferro	Manganês	Selênio	Zinco
Dourada	Pellets > Mm	530±6	1,60±0,02	5,20±0,09	0,60±0,01	n.d.	0,84±0,02
	Pellets < Mm	240±3	2,30±0,03	1,20±0,02	0,13±0,002	0,37±0,008	8,20±0,12
	T. Muscular	780±9	4,10±0,07	6,50±0,08	0,72±0,01	0,44±0,004	9,30±0,12
Pacu	Pellets > Mm	360±4	0,85±0,01	6,50±0,11	0,45±0,006	n.d.	0,77±0,02
	Pellets < Mm	170±2	1,20±0,01	1,50±0,02	0,12±0,001	0,25±0,006	7,40±0,11
	T. Muscular	540±7	2,20±0,03	8,20±0,13	0,60±0,008	0,30±0,004	8,40±0,11
Jaraqui	Pellets > Mm	350±3	1,10±0,02	19,20±0,22	0,50±0,007	n.d.	0,60±0,01
	Pellets < Mm	160±2	1,50±0,02	4,70±0,05	0,13±0,001	0,27±0,007	6,90±0,10
	T. Muscular	520±6	2,70±0,03	25,10±0,40	0,64±0,009	0,33±0,005	7,80±0,09

n.d. – não detectado (<LQ).

Os resultados das determinações de cálcio, cobre, ferro, manganês, selênio e zinco nas amostras de tecido muscular das espécies de peixes estudadas mostram que o cálcio apresenta maior acúmulo (520-780 mg kg⁻¹) em relação aos demais minerais, o que é esperado, considerando que se trata de um macromineral amplamente envolvido na atividade muscular. Por outro lado, o selênio apresenta menor acúmulo (0,30-0,44 mg kg⁻¹), concentrações estas, mesmo se tratando de um mineral traço, estão abaixo dos resultados reportados na literatura para a espécie tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), no entanto essa espécie de peixe é de aquicultura e não nativa [72]. Diversos trabalhos na literatura reportam o acúmulo de minerais essenciais em órgãos como o fígado e o rim, que atuam como detoxificadores quando a quantidade exigida na dieta de minerais pelo animal é ultrapassada [52-55]. No caso dos resultados obtidos para o selênio – mineral que apresenta uma faixa essencial bastante estreita – como também para os demais microminerais, pode-se inferir que estes tenham um acúmulo maior no fígado e/ou rim dos peixes estudados e, que a fração incorporada ao tecido muscular trata-se apenas da concentração desses minerais que se torna acessível ao organismo do animal quando necessário.

De forma geral, valores de concentrações desses minerais determinadas nas amostras de tecido muscular dos peixes amazônicos estudados, até o momento, não são reportados na literatura. Acreditamos que os valores de concentração desses minerais apresentados na Tabela 3.4 podem ser inéditos, no entanto, há a necessidade de se dar continuidade na busca de trabalhos na literatura que permitam confirmar seu caráter inédito.

Em relação aos valores de concentração dos minerais nos *pellets* proteicos, pode-se observar que existem situações bem distintas: os *pellets* proteicos de maior massa molar (> 50

kDa) apresentam cerca de 40% mais cálcio e 60% mais ferro e manganês em relação aos *pellets* proteicos de menor massa molar (< 50 kDa); no entanto, os *pellets* proteicos de menor massa molar (< 50 kDa) apresentaram cerca de 17% mais cobre e 80% mais zinco do que os *pellets* proteicos de maior massa molar (> 50 kDa), e praticamente 100% do selênio determinado. Esses resultados sugerem que nos *pellets* proteicos de massa molar menor que 50 kDa estão concentradas proteínas com sequências peptídicas contendo resíduos de aminoácidos que apresentam grupos funcionais com características de base mole (grupos sulfidrilas ou tióis), que formam ligações químicas preferencialmente com ácidos moles, como é o caso do cobre, selênio e zinco, comportamento semelhante ao apresentado nas determinações de mercúrio (ácido mole) nos *pellets* proteicos [38, 73]. Em relação aos *pellets* proteicos com massa molar maior que 50 kDa, pode-se inferir que esses apresentam proteínas com sequências peptídicas contendo resíduos de aminoácidos que apresentam grupos funcionais com características de base dura (grupos carboxílicos e/ou hidroxilas), que formam ligações químicas preferencialmente com ácidos duros, como é o caso do cálcio, ferro e manganês [38, 73]. Deve-se destacar também que os balanços de massas desses minerais, considerando-se as concentrações nos dois *pellets* proteicos, estão próximos aos valores de concentração total determinada nas amostras de tecido muscular, sugerindo assim, que esses minerais devem estar, na sua maior parte, ligados quimicamente à fração proteica como metaloproteínas e/ou proteínas *metal-binding* [38].

As concentrações de mercúrio nos spots proteicos obtidos nas corridas por 2D PAGE com os *pellets* de menor massa molar também foram determinadas utilizando-se o método por GFAAS otimizado [66]. Essas determinações indicaram a presença de mercúrio nos spots proteicos destacados com círculo nos géis de poliacrilamida apresentados nas Figuras 3.14-3.16. A Tabela 3.5 mostra os valores de concentração de mercúrio determinados em cada spot proteico, com suas respectivas massas molares (Mm) e pontos isoelétricos (pI), além da massa de proteína estimada utilizando-se dados do programa ImageMaster 2D Platinum 7.0.

Tabela 3.5 – Valores obtidos na determinação da concentração de mercúrio por GFAAS nos spots proteicos das amostras de tecido muscular de dourada, pacu e jaraqui.

Spots proteicos	Massa Molar (kDa)	pI	Massa de proteína (µg)	Concentração de Hg (mg g⁻¹)
D1	18,10	6,30	0,90	33,30
D2	15,40	8,20	0,20	25,50
D3	15,00	8,80	0,40	13,20
D4	15,00	9,60	0,50	13,30
D5	14,20	4,20	33,80	11,40
D6	9,90	7,30	3,80	35,10
D7	11,40	3,70	197,50	16,80
D8	10,80	3,60	19,00	18,30
P1	17,70	3,50	0,30	11,30
P2	17,30	5,70	0,80	11,70
P3	14,00	9,60	0,90	14,20
P4	10,40	7,30	1,80	37,80
P5	11,90	3,90	217,80	16,80
P6	11,60	3,60	191,30	17,40
P7	11,10	3,50	6,70	18,80
J1	17,00	6,00	1,00	12,00
J2	17,00	6,20	0,30	12,20
J3	14,80	8,90	0,30	13,30
J4	14,10	8,30	0,20	29,20
J5	12,80	4,70	7,80	16,00
J6	12,90	4,50	39,30	17,10
J7	12,80	4,20	4,80	16,10
J8	17,30	5,70	0,20	11,40
J9	14,50	9,60	0,30	27,50
J10	14,70	9,80	0,20	41,20
J11	10,80	7,20	1,70	36,80
J12	11,50	3,70	23,10	17,10
J13	11,70	3,60	24,50	16,90

D1–D8 spots do músculo de dourada; P1–P7 spots do músculo de pacu; J1–J13 spots do músculo de jaraqui.

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 3.5, pode-se observar que as concentrações de mercúrio nos spots proteicos apresentam valores na faixa de 11,3 a 41,2 mg g⁻¹. No entanto, os resultados apresentados nessas tabelas não fornecem muitas informações sem que tenham sido caracterizadas as proteínas desses spots proteicos. Dessa forma, foi feita a conversão da estimativa das massas de proteína nos spots proteicos e das massas de mercúrio para quantidade de moléculas de spot proteico e quantidade de átomos de mercúrio. Para isso,

consideraram-se as respectivas massas molares dos spots proteicos, a massa molar do mercúrio ($200,59 \text{ g mol}^{-1}$), a constante de Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$) e que $1 \text{ Da} = 1,661 \times 10^{-24} \text{ g}$. Esses cálculos possibilitaram a estimativa de quantos átomos de mercúrio estariam presentes por moléculas de spot proteico [40, 41, 47, 74]. Os resultados obtidos nesses cálculos são mostrados na Tabela 3.6 em termos de número de átomos mercúrio por molécula do spot proteico considerado. No Apêndice 3 é mostrado um exemplo desses cálculos feito para o spot D1.

Tabela 3.6 – Estimativa do número de átomos de mercúrio por molécula de spot proteico das amostras de tecido muscular de dourada, pacu e jaraqui.

Spots proteicos	Nº de moléculas no spot proteico $\times 10^{12}$	Nº de átomos de mercúrio $\times 10^{12}$	Proporção (Hg / proteína)
D1	30	90	3,00
D2	8	15	1,88
D3	16	14	0,88
D4	19	20	1,05
D5	1160	1156	1,00
D6	230	399	1,73
D7	10400	9961	0,96
D8	1055	1044	0,99
P1	11	10	0,91
P2	29	28	0,97
P3	39	39	1,00
P4	104	204	1,96
P5	110	109	0,99
P6	10900	9990	0,92
P7	364	380	1,04
J1	36	37	1,03
J2	10	11	1,10
J3	13	12	0,92
J4	9	17	1,89
J5	370	146	1,01
J6	1900	5600	1,06
J7	230	916	1,00
J8	5	5	1,00
J9	13	25	1,92
J10	12	25	2,08
J11	94	190	2,02
J12	1210	1187	0,98
J13	1260	1240	0,98

D1–D8 spots do músculo de dourada; P1–P7 spots do músculo de pacu; J1–J13 spots do músculo de jaraqui.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 3.6 é possível estimar a proporção de átomos de mercúrio por molécula de spot proteico, dividindo-se um valor pelo outro. Dessa forma, é possível fazer as seguintes inferências: os spots D3-D5, D7-D8, P1-P3, P5-P7, J1-J3, J5-J8, J12 e J13 apresentam aproximadamente um átomo de mercúrio por molécula de spot proteico; os spots D2, D6, P4, J4 e J9-J11 apresentam aproximadamente dois átomos de mercúrio por molécula de spot proteico; e o spot D1 apresenta três átomos de mercúrio por molécula de spot proteico. Esses resultados, embora estimativos, sugerem que pode existir uma relação estequiométrica entre o número de átomos de mercúrio e o número de moléculas dos spots proteicos, o que seria uma possível indicação de que esses spots podem se tratar de metaloproteínas e ou proteínas *metal-binding* [40-42, 47, 74].

3.4. Caracterização dos spots proteicos por ESI MS MS

Concluídas as etapas de fracionamento das proteínas por 2D PAGE, análise da imagens dos géis contendo os spots proteicos, avaliação quantitativa do mercúrio nos *pellets* e nos spots proteicos – sendo estas as estratégias de estudo utilizando as componentes de seletividade e de sensibilidade – partiu-se então para a etapa de caracterização dos spots proteicos nos quais foram identificados e quantificados mercúrio, utilizando-se a espectrometria de massas como ferramenta na componente estrutural do estudo metaloproteômico. Assim, utilizando as condições experimentais descritas nos itens 2.7 e 2.8, nessa etapa do trabalho foram analisados por ESI MS MS todos os spots proteicos nos quais foi identificada a presença de mercúrio e estimado o número de átomos desse elemento no spot proteico com base na sua concentração determinada por GFAAS – spots destacados com círculos nos géis obtidos por 2D PAGE (Figuras 3.14-3.16). Foi possível caracterizar com sucesso 8 proteínas em diferentes isoformas de um total de 28 spots proteicos analisados.

Na análise de caracterização de spots proteicos é normal encontrar mais de uma proteína na busca no banco de dados [56]; no entanto, foi assumido uma condição de compromisso no fechamento da classe de proteína, considerando o maior *score* e/ou cobertura e, principalmente os dados de massa molar e pI obtidos por 2D PAGE (experimental) em relação à massa molar teórica obtidas no banco de dados *Uniprot*. As Tabelas 3.7-3.9 apresentam os dados de caracterização obtidos na análise por ESI MS MS da provável proteína identificada com base nas condições descritas acima. Em relação às proteínas não identificadas em 7 spots proteicos, a dificuldade no processo de caracterização pode estar relacionada a alguma falha na etapa de digestão trípica ou à baixa concentração proteica, não gerando peptídeos possíveis de serem

sequeenciados, ou ainda devido à limitação de informações disponíveis nos bancos de dados sobre as proteínas de peixes.

Tabela 3.7 – Proteínas identificadas utilizando ESI MS MS nas amostras de tecido muscular de dourada.

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/Mm do spot (kDa)	Mm ESI (Da)	Mm teórica Uniprot (Da)	Cobertura (%)	Peptídeos sequenciados
D1	Protein NLRC5	NLRC5_ICTPU	35.9502	6,30/18,10	20.501	19.298	0,41	AIGPRDR ISLNKTISK
D2	39S ribosomal protein L36. mitochondrial	RM36_DANRE	47.3535	8,20/15,00	14.050	12.944	11,21	SLVGSLTR SALKK
D3	Parvalbumin alpha	PRVA_CYPCA	36.5111		11.817	11.451	10,09	LFLQNFSAGAR
	Parvalbumin-2	PRV2_DANRE	36.5111	8,80/15,00	12.253	11.622	10,09	LFLQNFSAGAR
	N-alpha-acetyltransferase 20	NAA20_DANRE	18.1279		20.817	20.358	6,18	VSNQVAVNMYK
D4	Mth938 domain- containing protein	AAMDC_DANRE	1571.07	9,60/15,00	14.092	13.360	7,38	GVQTLVIGR VWPGGSR TLVIGR VIGR GVQTL QTLVIGR GVQTLV GVQTLVI
D5	<i>Não identificada</i>	-	-	4,20/14,20	-	-	-	-
D6	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	RS27A_ICTPU	1328.94	7,29/9,90	19.764	17.999	5,77	ESTLHLVLR TLHLVLR STLHLVLR ESTLHL
D7	Myoglobin	MYG_CYPCA	988.761	3,70/11,40	16.450	15.776	36,73	IALNNFR EIGFAG LFPK LFPKFVGIASNELAGNAAVK ARGDHAAILKPLATTHANTHK NNFR
	Parvalbumin beta	PRVB_CYPCA	221.718		12.109	11.436	16,67	IGVDEFTALVK SADDVKK SADDVK IGVDEFTALVKA
D8	Parvalbumin beta	PRVB_SQUCE	134.81	3,60/10,80	11.979	11.263	9,43	SGFIEEEELK

Tabela 3.8 – Proteínas identificadas utilizando ESI MS MS nas amostras de tecido muscular de pacu.

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/Mm do spot (kDa)	Mm ESI (Da)	Mm Uniprot (Da)	Cobertura (%)	Peptídeos sequenciados
P1	<i>Não identificada</i>	-	-	3,50/17,70	-	-	-	-
P2	<i>Não identificada</i>	-	-	5,70/17,30	-	-	-	-
P3	<i>Não identificada</i>	-	-	9,60/14,05	-	-	-	-
P4	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	RS27A_ICTPU	911.8476		19.764	17.999	5,77	ESTLHLVLR TLHLVLR
	Parvalbumin alpha	PRVA_CYPCA	101.1696	7,30/10,40	11.816	11.451	10,09	LFLQNFSAGAR
	Parvalbumin-2	PRV2_DANRE	101.1696		12.253	11.622	10,09	LFLQNFSAGAR
	Parvalbumin-2	PRV2_DANRE	528.0483		12.253	11.622	43,12	LFLQNFSAGAR VGLSAK ALTD AETK IGVDEFALLVK IGVDEFALLVKA SGFIEDELKFLQNFSAGAR
P5	Parvalbumin alpha	PRVA_CYPCA	489.3262	3,90/11,85	11.816	11.451	32,11	LFLQNFSAGAR VGLSAK SGFIEDELKFLQNFSAGAR
	Parvalbumin beta	PRVB_SQUCE	514.41		11.979	11.263	44,34	SGFIEEELK ALTD AETK AFLKEADITAALEACK IGIDEFAALVKA
	Parvalbumin-2	PRV2_DANRE	1668.503		12.253	11.622	27,52	LFLQNFSAGAR IGVDEFALLVK ALTD AETK
P6	Parvalbumin alpha	PRVA_CYPCA	1109.494	3,60/11,55	11.816	11.451	17,43	LFLQNFSAGAR ALTD AETK
	Parvalbumin beta	PRVB_SQUCE	426.9213		11.979	11.263	44,34	SGFIEEELK ALTD AETK AFLKEADITAALEACK IGIDEFAALVKA
	Parvalbumin-2	PRV2_DANRE	2341.593		12.253	11.622	21,10	LFLQNFSAGAR IGVDEFALLVK IGVDEFALLVKA
P7	Parvalbumin alpha	PRVA_CYPCA	2308.483	3,50/11,10	11.816	11.451	10,09	LFLQNFSAGAR
	Parvalbumin beta	PRVB_SQUCE	162.2106		11.979	11.263	19,81	SGFIEEELK IGIDEFAALVK

Tabela 3.9 – Proteínas identificadas utilizando ESI MS MS nas amostras de tecido muscular de jaraqui.

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/Mm do spot (kDa)	Mm ESI (Da)	Mm teórica Uniprot (Da)	Cobertura (%)	Peptídeos sequenciados
J1	Parvalbumin alpha	PRVA_CYPCA	134.866		11.816	11.451	10,09	LFLQNFSGAR
	Parvalbumin-2	PRV2_DANRE	134.866		12.253	11.622	10,09	LFLQNFSGAR
	Hemoglobin subunit beta	HBB_SILAS	59.906	6,00/17,00	16.640	16.275	6,76	LLIVYPWTQR
	Hemoglobin subunit beta	HBB_ELEEL	59.906		16.166	15.779	6,80	LLIVYPWTQR
J2	<i>Não identificada</i>							
J3	Hemoglobin subunit beta-1	HBB1_DANRE	3900.207		17.150	16.389	20,27	VEWTD AER LHVDPDNFR NTYAALSVMHSEK LHVD WTDAER NFR LHVDPD LHVDP
	Hemoglobin subunit beta-A/B	HBB_CYPCA	3892.06	8,90/14,80	16.950	16.262	11,56	VEWTD AER LHVDPDNFR LHVD WTDAER NFR LHVDPD LHVDP
	Hemoglobin subunit beta	HBB_CARAU	3892.06		16.970	16.210	11,56	VEWTD AER LHVDPDNFR LHVD WTDAER NFR LHVDPD LHVDP
	Hemoglobin subunit beta-2	HBB2_DANRE	2001.669		17.193	16.389	14,19	VEWTD AER NTYAALSVMHSEK WTDAER
J4	<i>Não identificada</i>							
J5	Parvalbumin beta	PRVB_CYPCA	168.5049	4,70/12,50	12.110	11.440	11,11	IGVDEFTALVK IGVDEFTALVKA VGLTSKSADDVK
J6	Parvalbumin beta	PRVB_CYPCA	177.2487	4,50/12,90	12.109	11.436	30,56	IGVDEFTALVK AGDSGDGKIGVDEFTALVK VGLTSKSADDVK IGVDEFTALVKA
	Parvalbumin beta	PRVB_SQUCE	145.8269		11.979	11.263	16,04	SGFIEEELK SAGDVKK

(Continuação) **Tabela 3.9** – Proteínas identificadas utilizando ESI MS MS nas amostras de tecido muscular de jaraqui.

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/Mm do spot (kDa)	Mm ESI (Da)	Mm teórica Uniprot (Da)	Cobertura (%)	Peptídeos sequenciados
J7	Parvalbumin beta	PRVB_SQUCE	181.2362	4,20/12,80	11.970	11.300	9,43	SGFIEEELK
J8	<i>Não identificada</i>	-	-	5,70/17,30	-	-	-	-
J9	Myoglobin	MYG_CYPCA	1576.988	9,60/14,50	16.450	15.776	39,46	EIGFAG IALNNFR ARGDHAAILKPLATTHANTHK FVGIASNELAGNAAVKAHGATVLK
J10	Myoglobin	MYG_CYPCA	866.2622	9,80/14,70	16.450	15.776	8,84	EIGFAG IALNNFR ARGDHAAILKPLATTHANTHK FVGIASNELAGNAAVKAHGATVLK
J11	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	RS27A_ICTPU	464.2447	7,20/10,80	19.764	17.999	5,77	ESTLHLVLR TLHLVLR
J12	Parvalbumin alpha	PRVA_CYPCA	933.7549		11.816	11.451	10,09	LFLQNFSAGAR
	Parvalbumin-2	PRV2_DANRE	933.7549	3,70/11,50	12.253	11.622	10,09	LFLQNFSAGAR
	Parvalbumin beta	PRVB_SQUCE	219.2693		11.979	11.263	19,81	IGIDEFAALVK IGIDEFAALVKA
	Parvalbumin alpha	PRVA_CYPCA	959.2849		11.816	11.451	10,09	LFLQNFSAGAR
J13	Parvalbumin-2	PRV2_DANRE	959.2849	3,60/11,70	12.253	11.622	10,09	LFLQNFSAGAR
	Parvalbumin beta	PRVB_SQUCE	194.2426		11.979	11.263	19,81	IGIDEFAALVK IGIDEFAALVKA SGFIEEELK IGIDEFAALVKA

Os resultados apresentados nas Tabelas 3.7-3.9 mostram que foi possível caracterizar por ESI MS MS 8 tipos de proteínas diferentes em 16 isoformas. Observa-se que em alguns spots foram identificadas mais de uma proteína, o que pode acontecer na caracterização de spots proteicos por espectrometria de massas e, normalmente tratam-se de isoformas e/ou fragmentos de uma proteína de maior massa molar [76]. A seguir discutiremos a principal função dessas proteínas caracterizadas nos spots proteicos analisados por ESI MS MS após fracionamento do tecido muscular de peixes por 2D PAGE.

- Protein NLRC5

É uma proteína que atua no controle homeostático da imunidade inata e nos mecanismos de defesa antivirais. Essa proteína é formada por sequências peptídicas que contém leucina como principal aminoácido, que apresenta grupos carboxílico e amino [58]. Não é relatada na literatura a incorporação de íons metálicos por essa proteína. No entanto, o spot D1 de tecido muscular de dourada, spot que apresenta mercúrio com relação de três átomos por molécula de proteína, foi caracterizado como *Protein NLRC5*. Com base nos dados obtidos por GFAAS e ESI MS MS, pode-se inferir que o mercúrio nesse caso está ligado aos sítios de coordenação dessa proteína por ligações não específicas, não atuando como um cofator metálico, formando uma proteína do tipo *metal-binding* [8].

- 39S Ribosomal protein L36 mitochondrial

Trata-se de uma proteína componente da subunidade do ribossomo mitocondrial, participando ativamente na síntese de outras proteínas no interior da mitocôndria. Essa proteína não está associada a íons metálicos considerando as informações obtidas na literatura até o momento [59]. No entanto, como qualquer outra proteína, por apresentar cadeias terminais com átomos de nitrogênio, podem formar ligações não específicas com íons metálicos divalentes, como o mercúrio, formando uma proteína do tipo *metal-binding* [8, 59].

- N-alpha-Acetyltransferase 20

Enzima que faz parte da subunidade catalítica do complexo NatB (N-alfa-acetiltransferase B), que catalisa a acetilação dos resíduos de metionina N-terminal dos peptídeos começando com Met-Asp-Glu-Met, Met-Met-Asn e Gln. É necessária para a manutenção da estrutura e função das fibras do complexo actomiosina e na migração celular adequada [60]. Por apresentar resíduos de metionina em sua estrutura, pode atuar como uma base mole e formar

complexos estáveis com íons Hg^{2+} [8, 51, 60]. O spot D3 de tecido muscular de dourada foi caracterizado como sendo essa enzima com mercúrio incorporado em sua estrutura, apresentando forte ligação com esse elemento, o que qualifica esse spot como um possível candidato a biomarcador. Deve-se destacar também que os dados obtidos por GFAAS indicaram uma relação estequiométrica de um átomo de mercúrio por uma molécula de *N-alpha-Acetyltransferase 20*, o que reforça a hipótese desta enzima atuar como um possível biomarcador de mercúrio.

- Mth938 domain - containing protein

Proteína componente do citoplasma que atua na diferenciação positiva de células adiposas e na regulação negativa de processos de apoptose [61]. Não consta na literatura a associação dessa proteína com íons metálicos, no entanto, por apresentar sequências peptídicas com resíduos de leucina e prolina com grupos carboxílico e amino terminais, podem formar ligações não específicas com íons metálicos divalentes, como o mercúrio, caracterizando uma proteína do tipo *metal-binding* [8, 61].

- Hemoglobin subunit beta, beta-1, beta-2 ou beta-A/B

Metaloproteínas envolvidas no transporte de oxigênio a partir das brânquias para os vários tecidos periféricos no caso de peixes. Essas proteínas apresentam o grupo ‘heme’ que é responsável pela complexação específica do íon Fe^{2+} , configurando-o como um cofator metálico [51]. A literatura não relata a interação dessas metaloproteínas com o mercúrio, mas as subunidades *beta-1* e *beta-2* apresentam resíduo de metionina na sua sequência peptídica, que pode formar ligação bastante estável com o mercúrio [8, 51]. O spot J3 de tecido muscular de jaraqui foi caracterizado como sendo a *Hemoglobin subunit beta-1* ou *beta-2* com mercúrio incorporado em sua estrutura; como essa proteína apresenta resíduo de metionina (base mole) que preferencialmente se liga a ácidos moles como o mercúrio, pode-se inferir que se trata de uma metaloproteína possível candidata a biomarcador de mercúrio.

- Parvalbumin

É uma proteína de baixa massa molar (11-12 kDa), apresenta as isoformas *parvalbumin-2*, *parvalbumin alfa* e *parvalbumin beta*, todas as três isoformas normalmente se ligam a íons cálcio. Essa proteína está diretamente envolvida em processos de relaxamento muscular após ocorrência de contração. Essa proteína é basicamente formada por sequências peptídicas que

contém serina e alanina – aminoácidos que apresentam estruturas com grupos carboxílicos, amino e hidroxila, suscetíveis à complexação de íons metálicos divalentes, principalmente cálcio e magnésio [62]. A *parvalbumin* ligada ao mercúrio foi a proteína mais identificada nos spots proteicos analisados, sendo que as diferentes isoformas foram caracterizadas nos spots: D3, D7-D8 de tecido muscular de dourada, P4-P7 de tecido muscular de pacu, e J1, J5-J7, J12-J13 de tecido muscular de jaraqui. A literatura até o momento não apresenta nenhum trabalho que discute a possibilidade da ligação de mercúrio e/ou outros metais potencialmente tóxicos na *parvalbumin* ou em suas isoformas. No entanto, a isoforma *beta* dessa proteína apresenta resíduo de cisteína na sua sequência peptídica, podendo formar ligações específicas com íons Hg^{2+} [8, 62]. Os spots P5 e P6 do tecido muscular de pacu foram caracterizados como sendo a *parvalbumin beta* com resíduos de cisteína, o que pode candidatar esses spots a possíveis biomarcadores de mercúrio.

- Ubiquitin -40S ribosomal protein S27a

Proteína que, quando ligada de forma covalente, pode estar envolvida na reparação do DNA, regulação do ciclo celular, endocitose e degradação lisossomal; pode também estar envolvida em processos de sinalização que conduzem à ativação do fator de transcrição NF-kappa-B; e na sua forma livre, pode ativar proteínas quinases e ter papel na sinalização celular. Essa proteína apresenta domínios com grupos específicos para ligação de zinco (*zinc-finger metal binding domains*) [63]. Por apresentar domínios específicos ligados a átomos de zinco, que apresentam características semelhantes ao mercúrio (ácido mole), pode também se ligar a outros íons divalentes como o cobre, o cádmio e o mercúrio [8, 51, 63]. Os spots D6, P4 e J11 foram caracterizados como sendo essa proteína com mercúrio incorporado em sua estrutura. Os dados obtidos por GFAAS demonstraram que esses spots apresentam uma relação estequiométrica de dois átomos de mercúrio por molécula de proteína nas três espécies de peixe estudadas, o que permite inferir que essa proteína possa atuar como biomarcador desse elemento.

- Myoglobin

Proteína da família das globinas, a *myoglobin* é uma proteína muscular que serve como fonte de reserva de oxigênio e atua como o principal transportador intracelular de oxigênio nos tecidos musculares [68]. Entretanto, não realiza o transporte de oxigênio da mesma forma que a hemoglobina, à qual se assemelha estruturalmente. Por ser formada de uma só unidade e apresentar apenas um grupo “heme”, a *myoglobin* forma ligações menos específicas com o

oxigênio [76]. A literatura não relata a interação dessas proteínas com o mercúrio, mas, como qualquer outra proteína, a *myoglobin* apresenta em suas sequências peptídicas cadeias terminais com átomos de nitrogênio que podem formar ligações não específicas com íons metálicos divalentes, como o mercúrio, caracterizando nesse caso uma proteína do tipo *metal-binding* [8, 51]. Os spots D7, J9 e J10 de tecido muscular de dourada e jaraqui foram caracterizados como sendo uma *myoglobin* com mercúrio incorporado em suas estruturas.

4. CONCLUSÕES

Após a otimização e conclusão das etapas envolvidas nos componentes de seletividade e de sensibilidade do estudo metaloproteômico proposto foi possível desenvolver os experimentos de caracterização dos spots proteicos nos quais foi confirmada por GFAAS a presença de mercúrio. Também foi possível fazer o balanço de massas de mercúrio e dos macro e microminerais (cálcio, cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) nos *pellets* proteicos obtidos no procedimento de precipitação fracionada e estimar a relação estequiométrica do número de átomos de mercúrio por moléculas dos spots proteicos. Com base nas discussões desses resultados pode-se, até o momento, tirar as seguintes conclusões:

- A fração dos *pellets* proteicos de massa molar de <50 kDa apresenta cerca de 65 a 70% da concentração de mercúrio determinada nas amostras de tecidos muscular das espécies de peixe estudadas. Na fração dos *pellets* proteicos de massa molar >50 kDa não foi detectada a presença de mercúrio;
- Em relação aos macro e microminerais, observou-se que os *pellets* de massa molar >50 kDa incorporam 68% do cálcio, 80% do ferro e 83% do manganês presente nas amostras de tecido muscular estudadas; enquanto os *pellets* de massa molar <50 kDa incorporam 56% do cobre, 88% do zinco e praticamente 100% do selênio presente nas amostras de tecido muscular estudadas;
- Com os dados das concentrações de mercúrio determinadas nos spots proteicos foi possível prever uma relação estequiométrica entre o número de átomos de mercúrio por molécula de spot proteico. Essa relação apresentou-se na faixa de um a três átomos de mercúrio por molécula de spot proteico;
- Os dados de caracterização dos spots proteicos possibilitaram a identificação de proteínas e/ou enzimas em 21 spots proteicos; dos quais três proteínas (*Parvalbumin beta*; *Hemoglobin subunits beta-1 e beta-2*; *Ubiquitin -40S ribosomal protein S27a*) e uma enzima (*N-alpha*-

acetyltransferase 20) apresentaram características de biomarcador de mercúrio, com características de ligações específicas – no caso, as que apresentaram resíduos de metionina e/ou cisteína (bases moles) – e domínios específicos ligados a átomos de zinco, que apresentam características semelhantes ao mercúrio (ácido mole);

- A relação estequiométrica entre número de átomos de mercúrio por molécula de spot proteico de algumas proteínas caracterizadas foi igual entre as diferentes espécies de peixes estudadas, o que reforça a ideia de se tratar da mesma proteína nos diferentes tecidos musculares de peixes.

De forma geral, os resultados preliminares obtidos podem ser considerados inéditos para os peixes amazônicos estudados, constituindo o ponto inicial de estudos metalaproteômicos relacionados à toxicidade de mercúrio em peixes. Os spots proteicos caracterizados que apresentaram características de biomarcador poderão ser utilizados no acompanhamento, em nível proteômico, das concentrações de mercúrio nas espécies de peixes estudadas após a total inundação do complexo hidrelétrico da Usina de Jirau, que até o momento ainda não aconteceu.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] DE DUVE, C. Blueprint for a cell: The nature and origin of life, *Caroline Biological Supply Co.*, 275p., 1991.
- [2] SZATHMÁRY, E.; SMITH, J. M. The major evolutionary transitions. *Nature*, v. 374, p. 227-232, 1995.
- [3] VOLKENSTEIN, M. V. Physical approaches to biological evolution. *Springer-Verlag*, Berlin, 1994.
- [4] FINDLAY, J. B.; GEISOW, M. J. Protein sequencing. A practical approach. *IRL Press*, p. 127-177, 1989.
- [5] DOOLITTLE, R. F. The multiplicity of domains in proteins. *Annual Review of Biochemistry*, v. 64, p. 287-314, 1995.
- [6] CREIGHTON, T. E. Protein structure: A practical approach. *IRL Press*, Oxford University Press, p. 1-21, 1989.
- [7] BRANDEN, C.; TOOZE, J. Introduction to protein structure. 2.ed., *Garland Ed.*, New York, 410p., 1999.
- [8] WOOD, E. J. Textbook of biochemistry with clinical correlations. (Devlin, T. M.) 4.ed., *Wiley-Liss*, New York, 1186p., 1997.
- [9] CREIGHTON, T. E. Protein: Structure and molecular properties. 2.ed., *W. H. Freeman and Company*, 512p., 1993.

- [10] HOLM, L.; SANDER, C. Mapping the protein universe. *Science*, v. 273, p. 595-602, 1996.
- [11] Link Google imagens: <https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CDIQFjAB&url=http%3A%2F%2Fxa.yimg.com%2Fkq%2Fgroups%2F21821884%2F1733080549%2Fname%2FPROTE%25C3%258DNAII.pdf&ei=RaPIUu2vFMXX2AX8Ow&usg=AFQjCNEzA5I6OaMFgdPRpejYJ6Na3OcLgQ>, acessado em 9 de janeiro de 2014.
- [12] VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. Fundamentos de bioquímica, *ArteMed Ed.*, Porto Alegre, p. 195-218, 2002.
- [13] Link Google imagens: <http://www.vestibulandoweb.com.br/biologia/teoria/estrutura-secundaria-proteina.jpg>, acessado em 9 de janeiro de 2014.
- [14] WAGNER, G.; HYBERTS, S. G.; HAVEL, T. F. NMR structure determination on solution. A critique and comparison with X-ray crystallography. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, v. 21, p. 167-198, 1992.
- [15] ROST, B.; SANDER, C. Bridging the protein-sequence-structure gap by structure predictions. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, v. 25, p. 113-136, 1996.
- [16] Link Google imagens: http://www.quimica.net/emiliano/aranhas/beta_conformacao.gif, acessado em 9 de janeiro de 2014.
- [17] Proteínas – classificação estrutural, disponível em <http://www.proweb.org/>, acessado em 23 de fevereiro de 2012.
- [18] Link Google imagens: <http://bioquimica.faculdade.zip.net/images/bv2.jpg>, acessado em 9 de janeiro de 2014.
- [19] Proteínas – informações gerais, disponível em <http://www.expasy.ch/>, acessado em 27 de fevereiro de 2012.
- [20] Link Google imagens: <http://www.biocristalografia.df.ibilce.unesp.br/valmir/Tese/images/hemoglobina.gif>, acessado em 9 de janeiro de 2014.
- [21] Link Google imagens: <http://netnature.files.wordpress.com/2012/02/proteina-4.jpg>, acessado em 9 de janeiro de 2014.
- [22] ALEXANDER, R. R.; GRIFFITHS, J. M. Basic biochemical methods, 2.ed., *John Wiley & Sons*, New York, 1993.
- [23] BOLLAG, D. M.; ROZYCKI, M. D.; EDELSTEIN, S. J. Protein methods, 3.ed., *John Wiley & Sons*, New York, 415p., 1996.
- [24] HARRIS, E. L. V.; ANGAL, S. Protein purification application: a practical approach. *IRL Press Oxford University Press*, New York, 336p., 1990.
- [25] JANSON, J. C.; RYDEN, L. Protein purification: Principles, high-resolution methods and applications, 3.ed., *John Wiley & Sons*, New York, 548p., 1998.
- [26] SCHULZ, G. E.; SCHIRMER, R. H. Principles of protein structure, *Springer Verlag*, New York, 1990.

- [27] SCOPES, R. Protein purification: Principles and practice, 3.ed., *Springer Verlag*, New York, 380p., 1994.
- [28] DAMRON, B. L. In: Food chemistry, (O. R. Fennema), *Marcel Dekker Inc.*, New York, 1996.
- [29] ARNAU, J.; LAURITZEN, C.; PETERSEN, G. E.; PEDERSEN, J. Current strategies for the use of aYnity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein expression and purification*, v. 48, p. 1-13, 2006.
- [30] BALEY, A.; FONG, A.; WUA, W.; WOODA, D. W. Optimization of ELP-intein mediated protein purification by salt substitution. *Protein expression and purification*, v. 66, p. 198-202, 2012.
- [31] VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. Fundamentals of biochemistry. Upgrade Edition, *John Wiley & Sons*, 931p., 2002.
- [32] SUSSULINI, A.; SOUZA, G. H. M. F.; EBERLIN, N.; ARRUDA, M. A. Z. Comparative metallomics for transgenic and non-transgenic soybeans. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 22, p. 1-6, 2007.
- [33] VALLEE, B. L. Metallothionein historical review and perspectives. In: KAGI, J.H.R., NORDBERG, M. Metallothionein. Birkhauser, Switzerland, p.19-40, 1999.
- [34] STILLMAN, M. J.; SHAW, C. F.; SUZUKI, K. T. Metallothioneins. In: Metallothioneins. New York: *VCH Publishers*, p. 1-13, 1999.
- [35] ARNESANO, F.; BANCİ, L.; BERTINI, I.; CAPOZZI, F.; CIOFI-BAFFONI, S.; CIURLI, S.; LUCHINAT, C.; MANGANI, S.; ROSATO, A.; TURANO, P.; VIEZZOLI, M. S. An Italian contribution to structural genomics: Understanding metalloproteins. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 250, p. 1419-1450, 2006.
- [36] SZPUNAR, J. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. *Analyst*, v. 130, p. 442-465, 2005.
- [37] HARAGUCHI, H. Metallomics as integrated biometal science. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 19, p. 5-14, 2004.
- [38] GARCIA, J. S.; MAGALHÃES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. *Talanta*, v. 69, p. 1-15, 2006.
- [39] MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. Metallomics: the concepts and methodology. *Chemical Society Reviews*, v. 38, p. 1119-1138, 2009.
- [40] LIMA, P. M.; NEVES, R. C. F.; SANTOS, F. A.; PÉREZ, C. A.; SILVA, M. A. O.; ARRUDA, M. A. Z.; CASTRO, G. R.; PADILHA P. M. Analytical approach to the metallomic of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver tissue by SR XRF and FAAS after 2D PAGE separation: Preliminary results. *Talanta*, v. 82, p. 1052-1056, 2010.
- [41] SANTOS, F. A.; LIMA, P. M.; NEVES, R. C. F.; MORAES, P. M.; PÉREZ, C. A.; SILVA, M. A. O.; ARRUDA, M. A. Z.; CASTRO, G. R.; PADILHA, P. M. Metallomic study of plasma

samples from Nile tilapia using SR-XRF and GFAAS after separation by 2D PAGE: initial results. *Microchimica Acta*, v. 173, p. 43-49, 2011.

[42] MORAES, P. M.; SANTOS, F. A.; PADILHA, C. C. F.; VIEIRA, J. C. S.; ZARA, L. F.; PADILHA P. M. A preliminary and qualitative metallomics study of mercury in the muscle of fish from Amazonas, Brazil. *Biological Trace Element Research*, v. 150, p. 195-199, 2012.

[43] ESCOBAR, H.; MIRANDA, L. Depois do genoma, a corrida pelo proteoma. *O Estado de São Paulo*, 13/02/2001.

[44] KAZMI, S.; KRULL, I. S. Proteomics and the current state of protein separations science, Part one. *Pharma Gennomics*, v. August, p. 14-29, 2001.

[45] BELIZARIO, J. E. Proteoma: o desafio do século 21. *Ciências Hoje*, v. 27, p. 78-81, 2000.

[46] LANÇAS, F. M.; SILVA, J. C. R.; BICUDO, R. C.; NETO, B. M. A química analítica do proteoma. *Analytica*, v. 6, p. 60-66, 2003.

[47] NEVES, R. C. F.; LIMA, P. M.; BALDASSINI, W. A.; SANTOS, F. A.; MORAES, P. M.; CASTRO, G. R.; PADILHA P. M. Fracionamento de cobre em proteínas do plasma, músculo e fígado de tilápia do Nilo. *Química Nova*, v. 35, p. 493-498, 2012.

[48] BLACKSTOCK, W. P.; WEIR, M. P. Proteomics: quantitative and physical mapping cellular proteins. *Trends Biotechnolology*, v. 17, p. 121-127, 1999.

[49] GARCIA, J. S.; SOUZA, 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*, v. 1, p. 107-113, 2009.

[50] BRANDÃO, A. R.; BARBOSA, H. S.; ARRUDA, M. A. Z. Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds. *Journal of Proteomics*, v. 73, p. 1433-1440, 2010.

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

[52] SILVA, M. A. O.; GARCIA, J. S.; SOUZA, G. H. M. F.; EBERLIN, M. N.; ARRUDA, M. A. Z. Evaluation of sample preparation protocols for proteomic analysis of sunflower leaves. *Talanta*, v. 80, p. 1545-1551, 2010.

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

[54] CUNSOLO, V.; MUCCILLI, V.; SALETTI, R.; FOTI, S. Applications of mass spectrometry techniques in the investigation of milk proteome. *European Journal of Mass Spectrometry*, v. 17, p. 305-320, 2011.

- [55] NAGELE, E.; MARTIN, V.; HORTH, P.; VAD, C. 2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures. *Expert Review of Proteomics*, v. 1, p. 38-46, 2004.
- [56] BERANOVA-GIORGIANNI, S. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, p. 273-281, 2003.
- [57] DELAHUNTY, C.; YATES, J. R. Protein identification using 2D-LC-MS/MS. *Methods*, v. 35, p. 248-255, 2005.
- [58] POTH, A. G.; DEETH, H. C.; ALEWOOD, P. F.; HOLLAND, J. W. Analysis of the human casein phosphoproteome by 2-D electrophoresis and MALDI-TOF/TOF MS reveals new phosphoforms. *Journal of Proteome Research*, v. 7, p. 5017-5027, 2008.
- [59] PICARIELLO, G.; FERRANTI, P.; MAMONE, G.; ROEPSTORFF; ADDEO, F. Identification of N-linked glycoproteins in human milk by hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry. *Proteomics*, v. 8, p. 3833-3847, 2008.
- [60] GIRON, P.; DAYON, L.; SANCHEZ, J. Cysteine tagging for MS-based proteomics. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 30, p. 366-395, 2011.
- [61] MAMONE, G.; CAIRA, S.; GARRO, G.; NICOLAI, A.; FERRANTI, P.; PICARIELLO, G.; MALORNI, A.; CHIANESE, L.; ADDEO, F. Casein phosphoproteome: identification of phosphoproteins by combined mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, v. 24, p. 2824-2837, 2003.
- [62] GROSS, J. Introduction. In: Gross, J. Mass Spectrometry: A Textbook. 2.ed. *Springer*, p.1-20, 2011.
- [63] HOFFMAN, E.; STROOBANT, V. Ion sources. In: Hoffman, E; Stroobant, V. Mass Spectrometry: Principles and Applications, 3.ed. *John Wiley and Sons*, p. 15-84, 2007.
- [64] GROSS, J. Electrospray Ionization. In: Gross, J. Mass Spectrometry: A Textbook. 2.ed. *Springer*, p.560-620, 2011.
- [65] GUERRERA, I. C.; KLEINER, O. Application of mass spectrometry in proteomics. *Bioscience Reports*, v. 25, p. 71-93, 2005.
- [66] MORAES, P. M.; SANTOS, F. A.; CAVECCI, B.; PADILHA, C. C. F.; VIEIRA, J. C. S.; ROLDAN, P. S.; PADILHA, P. M. GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon, Brazil. *Food Chemistry*, v. 141, p. 2614-2617, 2013.
- [67] SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J. V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, v. 1, p. 2856-2860, 2006.
- [68] Universal Protein Resource (UniProt), disponível em: www.uniprot.org, acessado em 18 de agosto e 21 de dezembro de 2013.
- [69] GE HEALTHCARE, Manual do usuário, ImageMaster 2D Platinum 7.0 Edition AA, 2007.

- [70] SUSSULINI, A.; GARCIA, J. S.; MESKO, M. F.; MORAES, D. P.; FLORES, E. M.; PÉREZ, C. A.; ARRUDA, M. A. Z. Evaluation of soybean seed protein extraction focusing on metalloprotein analysis. *Microchimica Acta*, v. 158, p. 173-180, 2007.
- [71] MATAVELI, L. R. V.; PAWEL, P.; MOUNICOU, S.; ARRUDA, M. A. Z.; SZPUNAR, J. A comparative study of element concentrations and binding in transgenic and non-transgenic soybean seeds. *Metallomics*, v. 2, p. 800, 2010.
- [72] SILVA, F. A.; PADILHA, C. C. F.; CASTRO, G. R.; ROLDAN, P. S.; NOGUEIRA, A. R. A.; MORAES, P. M.; PADILHA, P. M. Selenium determination in tissue samples of Nile tilapia using ultrasound-assisted extraction. *Central European Journal of Chemistry*, v. 9, p. 119-125, 2011.
- [73] PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases. *Journal of the American Chemical Society*, v. 85, p. 3533-3539, 1963.
- [74] SILVA, F. A.; CAVECCI, B.; BALDASSINI, W. A.; LIMA, P. M.; MORAES, P. M.; ROLDAN, P. S.; PADILHA, C. C. F.; PADILHA P. M. Selenium fractionation from plasma, muscle and liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Food Measurement and Characterization*, v. 7, p. 158-165, 2013.
- [75] OFFER, G.; MOOS, C.; STARR, R. A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils - extraction, purification and characterization. *Journal of Molecular Biology*, v. 74, p. 653-662, 1993.
- [76] Link Wikipédia: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Mioglobina>, acessado em 21 de dezembro de 2013.

APÊNDICE 1

**A PRELIMINARY AND QUALITATIVE METALLOMICS STUDY OF
MERCURY IN THE MUSCLE OF FISH FROM AMAZONAS, BRAZIL**

A Preliminary and Qualitative Metallomics Study of Mercury in the Muscle of Fish from Amazonas, Brazil

Paula M. Moraes · Felipe A. Santos ·
Cilene C. F. Padilha · José C. S. Vieira · Luiz F. Zara ·
Pedro de M. Padilha

Received: 5 June 2012 / Accepted: 26 August 2012 / Published online: 7 September 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract This paper presents preliminary findings for a metallomics study of mercury in the muscle of the fish species from Amazonas, Brazil, after protein separation by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and subsequent evaluation of mercury by synchrotron radiation X-ray fluorescence. The fluorescence spectra revealed mercury in two protein spots. The mercury-containing protein spots showed molecular weights of 20.8 ± 0.7 and 19.8 ± 0.5 kDa and isoelectric points of 5.6 ± 0.2 and 7.5 ± 0.3 , respectively.

Keywords Metallomics study · Mercury in fish · 2D PAGE · SR XRF

Introduction

The environmental mercury contamination that occurred in Amazonia from the 1980s up to the mid-1990s is once more under debate due to the environmental burden left by gold mining and its potential for human contamination. However, recent studies have demonstrated that high concentrations of

mercury from non-anthropogenic sources are also found in abiotic and biotic compartments in various regions of Amazonia. Regardless of the source of contamination, studies aimed at elucidating the mechanisms of mercury toxicity are essential for the socioenvironmental development of this region [1].

The environmental changes resulting from the construction and operation of the Jirau Hydroelectric Power Plant in the Madeira river basin could alter the mercury dynamics in this environmental area. The average total mercury concentrations recorded in the last decade in the Madeira river basin, where the Jirau hydropower project is located, indicate that mercury concentrations have remained within their natural levels in Amazonian rivers. However, it is known that the transformation and remobilisation processes of previously unavailable mercury species can alter their chemical configuration, thereby making them available to the aquatic environment [2].

The identification of biomarkers related to the mapping and expression of metalloproteins associated with mercury could provide early indicators of fish contamination and human exposure resulting from changes in the water quality of reservoirs. Such an effort may protect the riverine population of areas directly and indirectly affected by hydroelectric enterprises in the Amazon region. In this context, metallomics—a recently proposed field of science—brings together analytical and biochemical studies about the fractionation and characterisation of metal-binding proteins. This new field of science has contributed to the elucidation of the physiological and functional aspects of metalloproteins responsible for the transport of metal ions in live organisms [3]. The identification of a biomarker for mercury toxicity through metallomics would likely be based on mercury-transporting metalloproteins whose expression can increase or decrease in response to changes in limnological characteristics and with the availability of mercury

P. M. Moraes · F. A. Santos · C. C. F. Padilha · J. C. S. Vieira ·
P. de M. Padilha (✉)
Instituto de Biociências, UNESP,
Botucatu, SP, Brazil
e-mail: padilha@ibb.unesp.br

L. F. Zara
Campus de Planaltina, Universidade de Brasília – UNB,
Brasília, DF, Brazil

P. de M. Padilha
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica,
UNICAMP,
Campinas, SP, Brazil

species in the environment. This potential biomarker would be useful in elucidating the mechanisms of mercury absorption by the aquatic biota and by humans [4]. Thus, the continuous development of new techniques that combine biochemical or proteomic techniques and atomic spectroscopy, e.g., the combination of gel electrophoresis as a separation component of the proteins with synchrotron radiation X-ray fluorescence as a component identification of metals/metalloids bound to the proteins, could contribute in the metallomic studies of fish [5].

In view of the above, this paper presents preliminary results of a metallomics study of mercury in fishes from the Jirau hydroelectric dam in the Madeira river basin in Brazil using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D PAGE) and (SR XRF). The main objective of this study was the possible identification of mercury biomarker proteins.

Materials and Methods

Sample Collection

The two fish species used in this metallomics study of mercury were chosen based on their trophic levels and because they are among the species most widely consumed by the local riverine population. These fish species were dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*), a predator species, and pacu (*Mylossoma* and *Myleus* spp.), an omnivorous species with a tendency to herbivory. A total of six specimens (dourada or pacu) were collected in the Jirau region—Madeira River (Lat 64°43'36" W and Long 09°16'21" S). The fish were anesthetised with a benzocaine solution (100 mgL⁻¹) and euthanised to remove muscle samples. About 15 g of fresh weight of a pooled sample of muscle from each of the specimens was ground in a ball mill, transferred to 15-mL polypropylene flasks and stored in a freezer at -80 °C.

Sample Preparation

Extraction, Precipitation and Redissolution of Proteins

About 1.00 g of the pool of muscle samples of each species (weighed in triplicate) was macerated in deionised water using a mortar and pestle. The extracts containing the proteins were separated from the solid portion and centrifuged at 13,000 rpm and 4 °C in a refrigerated ultracentrifuge. The protein extracts obtained from these samples were transferred to Eppendorf® tubes and used later for quantification of the total protein content and electrophoretic experiments.

The proteins contained in the protein extracts were precipitated by adding an ice-cold solution of 80 % acetone (v/v)

in a ratio of 1:4 sample-to-acetone. This precipitation was carried out for 2–3 h in a refrigerator at -20 °C, thereby ensuring that it would occur quantitatively. The protein precipitate was then centrifuged at 13,000 rpm at 4 °C in an ultracentrifuge for 10 min, and then the supernatant was removed. This protein precipitate was washed twice with the same solution used for precipitation. Next, part of the protein precipitate was redissolved in 0.50 molL⁻¹ NaOH for quantification of the total protein content. Another part was redissolved in a specific buffer containing 7 molL⁻¹ urea, 2 molL⁻¹ thiourea, 2 % (m/v) 3-[(3-cholamidopropyl)dime-thylammonio]-1-propanesulfonic, 0.5 % (v/v) ampholytes at pH 3 and 0.002 % bromophenol blue. Next, 2.8 mg of dithiothreitol was added to this buffer, and this mixture was used for electrophoretic separations [6].

Protein and Mercury Quantification

The protein concentration in the muscle protein extracts was determined by the biuret method where bovine serum albumin was used as a standard [7]. The determination of the protein content in the sample enables one to calculate the exact volume of protein extract required to apply a mass of approximately 250 µg of protein of each sample to the first step of two-dimensional electrophoresis [6]. The mercury concentration in the muscle extracts was determined by thermal decomposition and amalgamation coupled with atomic absorption (TTA-CAAS) [8]. These determinations were carried out in triplicate.

Electrophoretic Separations

For the isoelectric focusing electrophoresis PAGE (first dimension of the electrophoretic process), 13-cm strips were used containing premade gel with immobilised ampholytes with a pH range from 3 to 10. The first-dimension run of two-dimensional electrophoresis was carried out according to the procedure recently described by Lima et al. and Santos et al. [6, 9]. The second dimension of the electrophoretic process (SDS PAGE) was also carried out according to the procedure recently described by Lima et al. and Santos et al. [6, 9].

Image Processing of the Polyacrylamide Gels

The images of the polyacrylamide gels were recorded using the following parameters (according to the image software manufacturer's recommendations) [10]: resolution 300 dpi, zoom 100 % and depth (regulates the grey level of the pixel) 12 or 16 bits per pixel. These images were recorded in *tif format and imported for processing by the Image Master 2D Platinum 7.0 software programme. The image processing was always performed for four gels per aliquots of protein

extract obtained from the same electrophoretic separation process. The processing started with a contrast adjustment of the image of the gel to improve its visualisation. A small region of the gel was then selected that contains spots with intermediate expression. The detection parameters were: *smooth* (fixes the number of times the programme homogenises the selected region before performing the detection)—2; *saliency* (a measure based on the spot's curvature, filters real spots)—30; and *min area* (eliminates regions smaller than those indicated)—5. These parameters were then applied to the entire gel using the programme's automatic detection tool. The gels were correlated by matching the spots of the four gels and then comparing them in terms of their distribution, volume, relative intensity, isoelectric point (pIs) and molar mass.

Qualitative Investigation of Mercury in Protein Spots by SR XRF

The mercury in protein spots was investigated qualitatively by SR XRF at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory in Campinas, state of São Paulo, Brazil. For the fluorescence measurements, the protein spots were removed from the gel using the tip of a pipette, lyophilised and fixed on an aluminium holder by means of adhesive tape. After establishing the analytical conditions (energy storage ring, 1.37 GeV; Incident photon energy, 32.5 keV; Photon flux, 10^{10} photons s^{-1}), the spots were mapped by irradiating them for 200 s at two points. The resulting spectra were processed by the AXIL programme, which allows for variation of the intensity of the synchrotron radiation beam to be corrected, thereby normalising the peak areas of the chemical species detected by counting the argon peak [11].

Results and Discussion

Determination of Protein and Mercury in the Muscle Extract

The protein content in the muscle extracts of dourada and pacu was evaluated to determine the best protein mass to be applied in the electrophoretic experiments with respect to the resolution of the gel. The protein concentrations in the muscle extracts were as follows (gL^{-1}): Dourada, 5.95 ± 1.0 ; Pacu, 6.07 ± 1.51 . The volume of sample (protein extract) to be added to the strips in the hydration step preceding isoelectric focusing (protein separation by 1D) was calculated based on the result of the total protein concentration in the muscle samples. A calculated protein mass of 250 μg was used because the strip length used in the isoelectric focusing step was 13 cm [10]. The mercury concentration determined

by TTA-CAAS in the muscle extracts were as follow ($\mu g L^{-1}$): Dourada, 198 ± 5 and Pacu, 48 ± 1 .

Optimisation of Electrophoretic Separations

The 2D-PAGE electrophoresis experiments on samples of dourada and pacu muscle tissue were performed with four repetitions. Figure 1 shows representative gels obtained from the muscle samples of dourada and pacu. As seen in Fig. 1a, b, the dourada and pacu gels show good resolution demonstrating the efficiency of the protein separation. Note

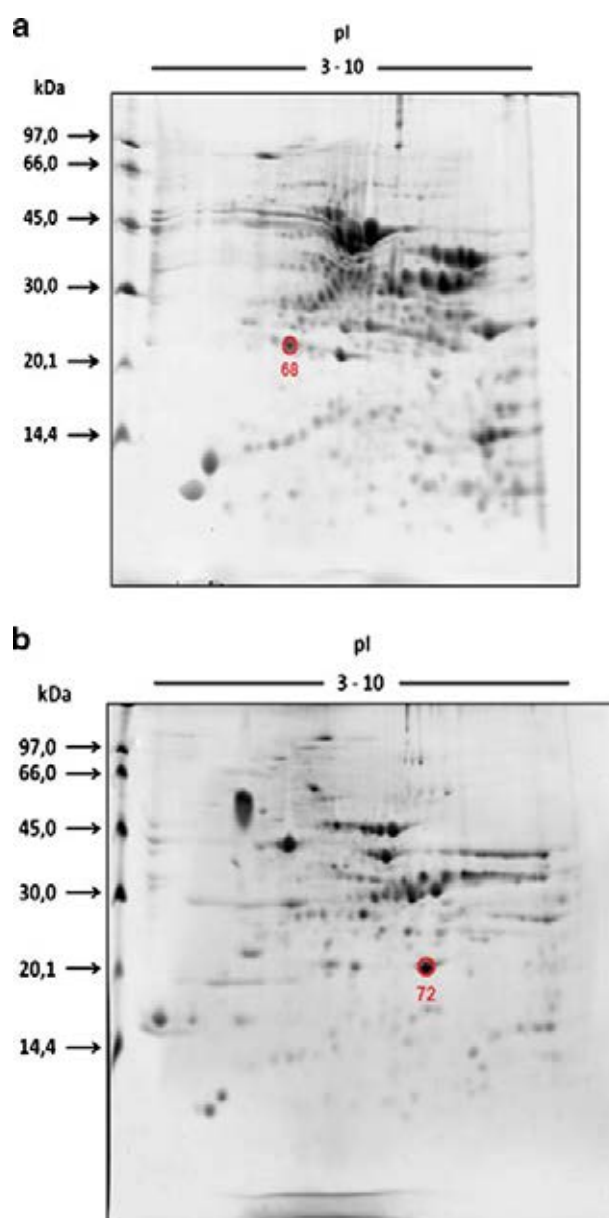


Fig. 1 Gel 12.5 % (m/v) of muscle samples of dourada (a) and pacu (b) with pI in the range of 3–10 and protein molecular weight in the range of 8.0–97.0 kDa. The protein spots which were detected mercury by SR XRF highlighted with a circle

that the gels exhibit a wide diversity of protein spots, some of higher intensity and concentration in the pI region between 4 and 9 and a molar mass of approximately 8.0–45.0 kDa. The correlation analysis of the gels demonstrated that 75 and 73 % of the protein spots were present in the four gels of the dourada and pacu muscle tissue samples, respectively. In addition, the average number of spots found in the gels— 764 ± 52 in dourada and 431 ± 31 in pacu—presented a relative standard deviation of less than 10 %, which is considered very good for protein fractionation by 2D-PAGE [6, 9, 12].

Qualitative Analysis of Mercury in the Protein Spots by SR XRF

X-ray fluorescence spectrometry is a non-destructive technique that involves simple and fast sample preparation prior to analysis [6, 9, 12]. This is a multi-elemental qualitative technique which is able to identify elements of higher atomic number than oxygen. SR XRF spectrometry is employed when higher sensitivity and resolution are required to identify elements. As an X-ray source, synchrotron radiation is very intense (10^3 to 10^6 times more intense than conventional sources) and is highly collimated and linearly polarised in the orbital plane of the electron [13]. Thus, the use of SR XRF enabled the identification of two protein spots containing mercury in the muscle samples of dourada and pacu. Figures 2 and 3 present the fluorescence spectra of spots 68 and 72 (and these are highlighted with circles in Fig. 1a, b), where mercury was identified in the muscle of dourada and pacu, respectively.

An analysis of the SR XRF spectra reveals a continuous background of high intensity. In general, all the other spectra

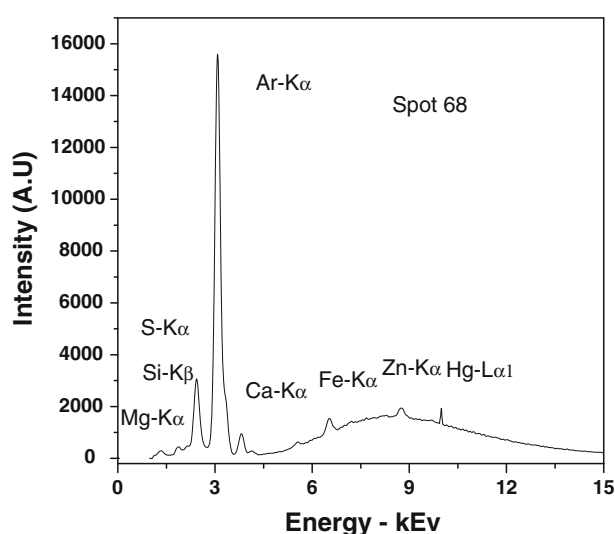


Fig. 2 SR XRF spectra obtained to protein spot 68 of muscle samples of dourada (*B. rousseauxii*)

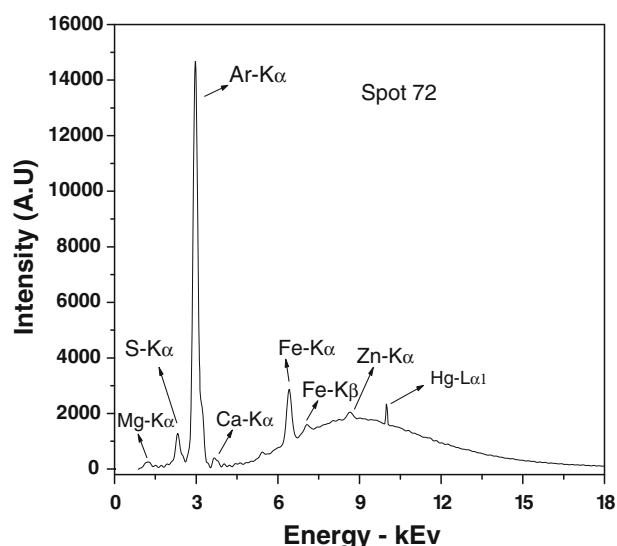


Fig. 3 SR XRF spectra obtained to protein spot 72 of muscle samples of pacu (*Mylossoma* and *Myleus* spp.)

obtained in the SR XRF analyses show the same profile. These backgrounds are due mainly to Compton scattering of the X-ray beams on the gel matrix, which may mask the signals of the element of interest [13]. Thus, using the values of the normalised peak areas (after discounting the analytical blank) of the SR XRF spectra, it was possible to identify mercury ($L_{\alpha 1} = 5,898$ keV) bound to the proteins in spots 68 and 72 from the samples of dourada and pacu muscle. In addition to mercury, the fluorescence spectra (Figs. 2 and 3) revealed the presence of sulphur ($K_{\alpha 1} = 2,308$ keV), a non-metal that may be present in the structure of the protein in the analysed spots. Calcium ($K_{\alpha 1} = 3,691$ keV), iron ($K_{\alpha 1} = 6,403$ keV; $K_{\beta 1} = 7,057$ keV), magnesium ($K_{\alpha 1} = 1,254$ keV) and zinc ($K_{\alpha 1} = 8,638$ keV) were also identified. The presence of more than one metal ion/metalloid in protein spots is acceptable as a single metalloprotein, or metal-binding protein may have several active sites composed of ion atoms of different elements [6, 9, 14]. The highly intense argon peak ($K_{\alpha} = 2,957$) that appears in the two spectra is due to the presence of argon in the ambient air at a constant concentration of 0.934 % v/v [13, 14].

The results of the initial evaluations of mercury by SR XRF indicate that mercury is bound to the proteins in the protein spots with a molar mass of 20.8 ± 0.7 kDa with $pI = 5.6 \pm 0.2$ (spot 68) and 19.8 ± 0.5 kDa with $pI = 7.5 \pm 0.3$ (spot 72). In the side chains of their peptide fragments, these proteins present functional groups with sulphur atoms (thiol groups) that possess soft base characteristics; thus, they bind preferentially to metals/metalloids with soft acid characteristics, as is the case of mercury in the form of $R-Hg^+$ [15]. Therefore, it can be inferred that spot 68 in the muscle samples of dourada and

spot 72 in that of pacu may be metalloproteins and/or metal-bound proteins whose structures contain thiol groups that have a high affinity for mercury.

Conclusion

The use of 2D PAGE in the initial stage in this metallomics study of mercury in samples of muscle tissue of dourada and pacu was efficient in the extraction of proteins and the preservation of metal–protein structure, which enabled the identification of mercury in three protein spots by SR XRF. The gels indicated that the muscle samples of the two fish species contained a high diversity of proteins and that the proteins in some of the protein spots were highly concentrated in the gel. The results obtained from the qualitative evaluation of mercury by SR XRF indicated the presence of this element in a single protein spot with a molar mass of 20.8 ± 0.7 kDa and $pI = 5.6 \pm 0.2$ in the muscle samples of dourada and in a single protein spot with a molar mass of 19.8 ± 0.5 kDa and $pI = 7.5 \pm 0.3$ in the muscle samples of pacu.

Acknowledgments The authors thank the Brazilian research funding agency FAPESP (Process: 2010/51332-5 and 2009/54856-8) for financial support.

References

- Malm O, Castro MB, Bastos WR, Branches FPJ, Guimarães JRD, Zuffo CE, Pfeiffer WC (1995) An assessment of Hg pollution in different gold mining areas, Amazon Brazil. *Sci Total Environ* 175:127–140
- Bastos WR, Almeida R, Zarz LF, Rocha JC, Santos A (2009) Programa de Monitoramento Hidrobiogeoquímico do AHE JIRAU – Bacia do Rio Madeira. Tectebel Energia
- Haraguchi H (2004) Metallomics as integrated biometal science. *J Anal At Spectrom* 19:5–14
- Szpunar P (2004) Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. *Anal Bioanal Chem* 378:54–56
- Hauser-Davis RA, Campos RC, Zioli RL (2012) Fish metalloproteins as biomarkers of environmental contamination. *Rev Environ Contam Toxicol* 218:101–124
- Lima PM, Neves RCF, Santos FA, Pérez CA, Silva MAO, Arruda MAZ, Castro GR, Padilha PM (2010) Analytical approach to the metallomic of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver tissue by SR-XRF and FAAS after 2D-PAGE separation: preliminary results. *Talanta* 82:1052–1056
- Doumas BT, Bayse DB, Borner K, Carter RJ (1981) A candidate reference method for determination of total protein in serum. II. Test for transferability. *Clin Chem* 2:1651–1654
- Determination of total mercury in coal and fly ash using thermal decomposition and amalgamation coupled with atomic absorption. PerkinElmer LAS Application Note 008646_01. <http://www.perkinelmer.cl/e-ine/Spotlight%20On%20Applications%20Complete%20e-Zine%20-%20Volume%2001.pdf>
- Santos FA, Lima PM, Neves RCF, Moraes PM, Pérez CA, Silva MAO, Arruda MAZ, Castro GR, Padilha PM (2011) Metallomic study of plasma samples from Nile tilapia using SR-XRF and GFAAS after separation by 2D PAGE: initial results. *Microchim Acta* 173(1–2):43–49
- GE Healthcare (2007) Manual do usuário, 11-0034-38, ImageMaster 2D Platinum 7.0 Edition AA
- Kunbacher M, Weseloh G, Thomzig A, Bertelsmann H, Behne D (2005) Analysis and localization of metal and metalloid containing proteins by synchrotron radiation X-Ray fluorescence spectrometry. *X-Ray Spectroscopy* 34:112–117
- Sussulini A, Souza GHMF, Eberlin MN, Arruda MAZ (2007) Comparative metallomics for transgenic and non-transgenic soybeans. *J Anal At Spectrom* 22:1–6
- Gao Y, Chen Z, Zhao J, Huang Y (2002) Detection of metalloproteins in human liver cytosol by synchrotron radiation X-ray fluorescence combined with gel filtration chromatography and isoelectric focusing separation. *Analyst* 127:1700–1704
- Wind M, Lehmann WD (2004) Element and molecular mass spectrometry—an emerging analytical team in the life sciences. *J Anal At Spectrom* 19:20–25
- Pearson RG (1963) Hard and soft acids and bases. *J Am Chem Soc* 85(22):3533–3539

APÊNDICE 2

GFAAS DETERMINATION OF MERCURY IN MUSCLE SAMPLES OF FISH FROM AMAZON, BRAZIL



Short communication

GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon, Brazil



Paula M. Moraes^{a,d}, Felipe A. Santos^{a,d}, Bruna Cavecci^{b,d}, Cilene C.F. Padilha^{a,d}, José C.S. Vieira^{a,d}, Paulo S. Roldan^c, Pedro de M. Padilha^{a,e,*}

^a UNESP – São Paulo State University, Biosciences Institute, Botucatu, SP, Brazil

^b UNESP – São Paulo State University, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, SP, Brazil

^c University of Alagoas – IQB/UFAL, Maceió, Al, Brazil

^d University of Brasília, Faculdade de Planaltina, Distrito Federal, Brazil

^e National Institute of Bioanalytical Sciences and Technology, UNICAMP – Campinas State University, Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 August 2012

Received in revised form 23 April 2013

Accepted 5 May 2013

Available online 17 May 2013

Keywords:

Mercury in fish

GFAAS

Chemical modifier

Permanent modifier

Amazon fish

ABSTRACT

In the present study, a simple, rapid and sensitive method was developed for the determination of mercury concentrations in the muscle tissue of fish from the Brazilian Amazon using graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) following acid mineralization of the samples in an ultrasonic cold water bath. Using copper nitrate as a chemical modifier in solution and sodium tungstate as permanent modifier, we were able to attain thermal stabilization of the mercury up to the atomisation temperature of 1600 °C in the GFAAS assay. The calculated limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0.014 and 0.047 mg kg⁻¹, respectively.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chemical and biological pollution in the Madeira river basin is one of the primary social and environmental problems in the Amazon. Mercury contamination, which scarred the Amazon from the 1980s through the mid-1990s, is once again a topic of discussion due to the environmental hazards associated with gold mining activities and the danger of contamination that these activities pose to society. The construction and use of the Jirau hydroelectric plant in the Madeira River basin may, because of environmental changes, modify the chemical species of mercury, resulting in high levels of soluble forms. Mercury species, including methylmercury, are present in aqueous medium, can be absorbed by aquatic biota and accumulate in organisms. As a result, the level of mercury is magnified at high levels of the food chain (Pfeiffer, Lacerda, Salomons, & Malm, 1993).

In the Amazon, fish is the main source of food for coastal communities. Several studies performed over the last two decades indicate high concentrations of mercury in Amazonian fish. In general, all of these studies suggest that bioaccumulation throughout the

food chain is the reason behind the high mercury levels in Amazonian fish. Mercury from natural and/or anthropogenic sources, upon entering aquatic ecosystems, participates in biogeochemical cycles mediated by microorganisms. In these cycles, mercury is chemically transformed, bioaccumulated and biomagnified in the food chain. Thus, predatory fish, including the gilthead bream and peacock bass, accumulate high levels of mercury and can act as a vehicle of this toxin to their consumers, such as reptiles, birds and humans. Thus, the consumption of fish may pose a risk to human health (Bidone, Castilhos, Santos, Souza, & Lacerda, 1997).

The determination of the concentrations of mercury species in biological samples is challenging due to low concentrations of the mercury species, and the evaluation of toxicity is difficult because the toxicity depends on the specific mercury species. Several studies in the literature describe methods for the determination of the concentrations of mercury species using atomic spectrometry techniques. Examples of these techniques include flow injection analysis (FIA), coupled with cold vapour atomic absorption spectrometry (CVAAS) and assisted by sample mineralization in a microwave oven for total mercury determination (Gallignani et al., 1998); solid-phase methylmercury preconcentration and concomitant determination by CVAAS (Mondal & Das, 2003); acid extraction and slurry sampling procedures for the determination

* Corresponding author at: UNESP – São Paulo State University, Biosciences Institute, Botucatu, SP, Brazil.

E-mail address: padilha@ibb.unesp.br (Pedro de M. Padilha).

of methylmercury and total mercury concentrations by GFAA (Bermejo-Barrera, Verdura-Constenla, Moreda-Piñeiro, & Bermejo-Barrera, 1999); and the determination of total mercury concentrations in biological samples using extraction with quaternary ammonium salts and subsequent quantification by CVAAS (Torres, Vieira, Ribeiro, & Curtius, 2005). The major challenge in the determination of mercury concentrations using GFAAS is preventing the loss of mercury by volatilization during the drying and pyrolysis of the sample. This analyte loss can be prevented with the use of chemical modifiers that stabilize mercury prior to atomization. Several types of chemical modifiers for the determination of mercury concentrations have been reported in the literature. Palladium, magnesium–palladium mixtures and gold are the most commonly used chemical modifiers (Bermejo-Barrera, Moreda-Piñeiro, & Bermejo-Barrera, 1994).

In this study, we developed a GFAA-based method for the determination of mercury concentrations in the muscle tissue of dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*), pacu (*Mylossoma* sp., *Myleus* sp.) and jaraqui (*Semaprochilodus* sp.), fish from the Brazilian Amazon, using copper nitrate and sodium tungstate as chemical modifiers to stabilize the mercury after the acid mineralization of samples in an ultrasonic water bath.

2. Materials and methods

2.1. Reagents, standard solutions and samples

High purity deionised water ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) produced using an ELGA LabWater PURELAB Ultra purification system (Saint Maurice, France), high purity sulfuric acid (Merck) and hydrogen peroxide (Merck) were used throughout the study. The working solutions containing copper and/or tungsten were prepared by diluting 1 g L^{-1} copper nitrate and/or sodium tungstate (Merck) stock solutions with ultrapure water.

All vials for the storage of samples and standard solutions, all glassware and all autosampler cups of the atomic absorption spectrometer were washed with 10% v/v nitric acid for 24 h, rinsed with ultrapure water and dried by shaking before use.

2.2. Equipment

The mercury levels were determined using a SHIMADZU AA 6800 atomic absorption spectrometer with an ASC-6100 automatic sampler and an electrothermal atomization system in a GFA-EX7 graphite furnace. A UNIQUE ULTRASONIC CLEANER, model USC1800A, was used in the mineralization of the samples of fish muscle tissue.

2.3. Mineralization of samples

The muscle tissue samples of each fish species studied were mineralized using a procedure previously described in the literature (Neves et al., 2009; Silva, Padilha, Pezzato, Barros, & Padilha, 2006; Silva et al., 2007) with several modifications, as described below: approximately 250 mg (weighed in triplicate using an analytical scale, accurate to hundredths of a milligram) of the fish muscle tissue was transferred to a 25 mL digestion flask. Concentrated sulfuric acid (3 mL) and 30% (w/w) hydrogen peroxide (1 mL) were transferred to each digestion flask. The set of digestion flasks was placed in the UNIQUE ultrasonic water bath at a temperature of 40°C and sonicated at 135 W until the mineralization of the samples was complete (transparent extract). Then, the acid extracts were transferred to 10 mL volumetric flasks, and the volume was brought up to 10 mL with ultrapure water. The Fish Protein DORM-4 NRC certified standard containing $0.410 \pm 0.055 \text{ mg kg}^{-1}$

of total mercury was used to validate the mineralization method. The volume of the acid extract obtained for this standard was adjusted to 5 mL with ultrapure water.

2.4. Determination of mercury concentrations by GFAAS

A SHIMADZU model AA-6800 atomic absorption spectrometer was used for the determination of the mercury concentrations. This spectrometer was equipped with a background absorption corrector with a deuterium lamp and a self-reverse system (SR), a pyrolytic graphite tube with an integrated platform and an ASC-6100 automatic sampler. A Shimadzu hollow cathode mercury lamp was used and operated at a minimum current of 12 mA and a maximum current of 400 mA (current used in background correction – BG). The wavelength was 253.7 nm, and the spectral resolution was 0.5 nm. Argon was used as the inert gas, and a constant flow of 1 L min^{-1} was maintained during the entire heating program except for the atomization stage, during which the gas flow was stopped. The absorbance signals were measured based on the peak area. The inner walls of the pyrolytic graphite tubes with integrated platforms used in the mercury analyses were coated with tungsten. For this purpose, 25 μL aliquots of 1000 mg L^{-1} sodium tungstate modifier solution were injected into the atomizer, which was then subjected to the program described by Silva et al. (2007). Tungsten ions were deposited on the graphite tube platform with heating up to 500°C , forming a tungsten carbide layer that acts as chemical modifier. We were able to use the graphite tube in 483 firings of the samples after this treatment.

2.4.1. Preparation of the analytical curve

The analytical curve was prepared using a stock standard solution of mercury (Merck). The mercury standards were prepared using the autosampler. Aliquots of 2, 4, 8, 12 and 16 μL of a 2.50 mg L^{-1} mercury standard solution were combined with 4 μL of 100 mg L^{-1} of Cu(II) nitrate solution and sufficient ultrapure water to bring the final volume of the solutions to 20 μL . The concentrations of the mercury standard solutions ranged between 0.25 and 2.00 mg L^{-1} . These solutions were then injected into the spectrometer's graphite tube coated with tungsten carbide using the micropipette autosampler. The absorbance measurements were performed in triplicate, and the graphite tube's heating program, optimized for mercury analysis, is described in Table 1.

2.4.2. Analytical procedures

After the sample preparation stage (preparation of acid extracts), 20 μL aliquots, obtained by mixing 10 μL of acid extract with 4 μL of 100 mg L^{-1} Cu(II) nitrate solution and 6 μL of ultrapure water, were injected into the graphite tube coated with tungsten carbide using the micropipette autosampler. The measurements were performed in triplicate, and the graphite tube's heating program, optimized for mercury analysis, is described in Table 1.

Table 1

Graphite tube heating program optimised for mercury determination in acid extracts obtained from mineralised samples of fish muscle.

Steps	Temperature ($^\circ\text{C}$)	Stages		Argon flow (L min^{-1})
		Ramp (s)	Hold (s)	
Drying	90	5	0	1
Drying	120	5	5	1
Pyrolysis	250	5	5	1
Pyrolysis	800	5	10	1
Atomization	1600	2	5	0
Cleanup	1800	5	0	1

3. Results and discussions

3.1. Optimization of the instrumental conditions for the determination of mercury concentrations by GFAAS

In the determination of the concentrations of metals and/or metalloids by GFAAS, obtaining accurate and reproducible analytical results depends on the optimization of the pyrolysis and atomization temperatures. Thus, pyrolysis and atomization curves were constructed to determine the optimal temperatures of mercury pyrolysis and atomization using the standard solutions and the acid extracts of muscle tissue samples. The effects of the pyrolysis and atomization temperatures on the absorbance signal obtained for mercury in a $1.00 \mu\text{g L}^{-1}$ standard solution and in the acid extracts of muscle tissue samples, both treated with copper(II) nitrate as a chemical modifier and analyzed using a pyrolytic graphite tube with an integrated platform coated with tungsten carbide, are shown in Figs. 1 and 2.

The pyrolysis temperature of 800°C was chosen because, as shown in Fig. 1, the mercury absorbance signal remained constant starting at 400°C and exhibited a rapid decrease starting at 900°C . All remaining experiments were conducted at 800°C for the pyrolysis stage because the mercury species were thermally stable up to this temperature.

Regarding the atomization temperature (Fig. 2), the mercury absorbance signals were constant from 1300°C to 1700°C . The atomization temperature of 1600°C was selected for all remaining experiments because a higher linearity of the standard curve was attained at this temperature, in addition to better reproducibility and repeatability of the measurements. The good thermal stability of mercury observed in these experiments demonstrates the efficacy of the Cu(II) chemical modifier when co-injected with the sample and of the tungsten carbide, which acted as a permanent chemical modifier. It is possible that with the gradual temperature increase (1000 – 1700°C), Hg(II) ions formed metal bonds with the copper during the process of reduction to the elemental state and, subsequently, with the carbide tungsten film adhered to the graphite tube platform, causing a significant increase in the mercury volatilization temperature and, consequently, in the temperature of atomization (Silva et al. (2006), (2007)).

3.2. Obtainment of the analytical curve

Using the optimized parameters (pyrolysis and atomization temperature), an analytical curve for mercury was constructed in

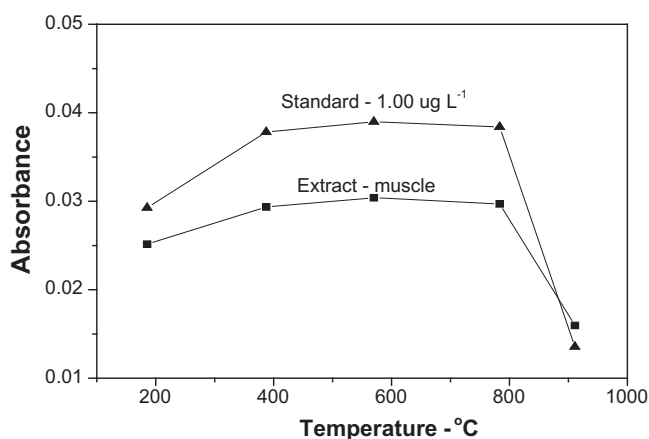


Fig. 1. Pyrolysis temperature curves of the acid extracts from dourada muscle samples and of the standard containing $1.00 \mu\text{g L}^{-1}$ of mercury.

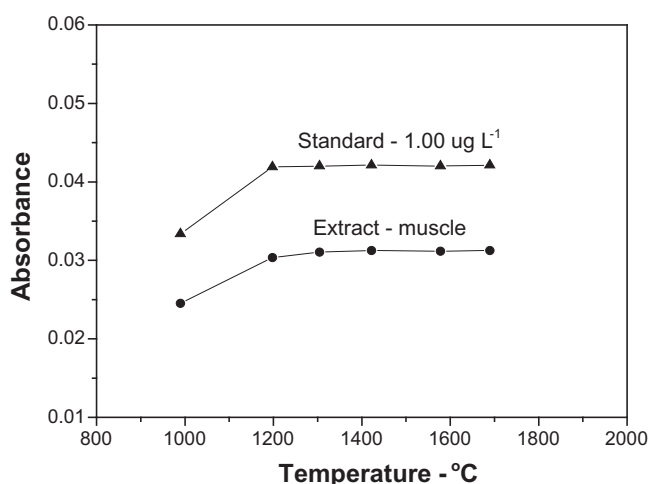


Fig. 2. Atomization temperature curves of the acid extracts from dourada muscle samples and of the standard containing $1.00 \mu\text{g L}^{-1}$ of mercury.

the concentration range of 0.25 – $2.00 \mu\text{g L}^{-1}$. The analytical curve for mercury corresponded to the equation:

$$C_{(\text{Hg})} = \text{Ab.} - 0.0016/0.048 \quad (1)$$

where $C_{(\text{Hg})}$ is the concentration of mercury in $\mu\text{g L}^{-1}$ and Ab. is the absorbance signal. The analytical curve enabled the calculation of the characteristic mass (m_0), the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ); these analytical parameters were crucial for the validation of the proposed mercury quantification process (Currie, 1999). The characteristic mass calculated for the $1.00 \mu\text{g L}^{-1}$ mercury standard was 1.70 pg , and the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), calculated based on the standard deviation of 10 readings of the standard solution blank and on the slope of the analytical curve ($\text{LOD} = 3\sigma/\text{slope}$ and $\text{LOQ} = 10\sigma/\text{slope}$), were 27 and 89 ng L^{-1} mercury, respectively. The graphite tube's lifetime was equivalent to 483 firings, confirming that the sample preparation method using an ultrasonic water bath effectively mineralized the organic matter and preserved the mercury in the obtained aqueous extract.

3.3. Suitability of the proposed method for the determination of mercury concentrations

After the optimization of the parameters of the extraction process and the quantification by GFAAS, the proposed method was used to determine the mercury concentrations of muscle tissue samples from dourada, pacu and jaraqui, fish from the Brazilian Amazon. The analytical results obtained in these determinations are listed in Table 2. The mercury concentrations determined for these three species fall below the maximum of $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ permitted by the World Health Organization (WHO). The reliability of the proposed method for total mercury determination in fish samples was tested with recovery experiments by spiking mercury standard solution into the mineralization solutions. The analytical results and recoveries are also listed in Table 2. It can be observed that the analytical recovery percentages obtained in the three fish digest solution present in the range of 98.90 – 99.50% , which can be considered good analytical recovery. The accuracy of the method was assessed using the Fish Protein DORM-4 NRC certified standard. The mercury concentration determined for the DORM-4 NRC was $0.403 \pm 0.012 \text{ mg kg}^{-1}$ ($n = 6$). The concentration value determined is close to the certified value (DORM-4 NRC – $0.410 \pm 0.055 \text{ mg kg}^{-1}$). The precision of method (repeatability and reproducibility) also was evaluated by the relative standard

Table 2

Analytical results and of recoveries for total mercury determination in fish samples.

Samples	Determined Concentration in samples ^a (mg kg ⁻¹)	Determined Concentration in spikes ^{a,b} (mg kg ⁻¹)	Recovery (%)
Dourada	0.331 ± 0.007	0.429 ± 0.01	99.50 ± 2.30
Pacu	0.081 ± 0.002	0.179 ± 0.005	98.90 ± 2.7
Jaraqui	0.132 ± 0.004	0.230 ± 0.006	99.10 ± 2.60

^a Average value ± standard deviation ($n = 6$).^b Determination after adding 0.100 mg kg⁻¹.

deviation obtained in the mercury concentration determined for the DORM-4 NRC. In this calculus was used the HORRAT value (McClure & Lee, 2003), which was calculated dividing the RSD_R obtained of collaboratively ($RDS_R = 3.92\%$) by $PRSD_R$ calculated from the HORWITZ equation ($PRSD_R = 2.30$), (Horwitz & Richard, 1997). The precision of the method determined using these calculus conditions was 1.70%. The (LOD) and (LOQ) determined in relation to certified standard, using 0.01 g of Fish DORM-4 NRC and the method of analysis proposed were 0.014 and 0.047 mg kg⁻¹, respectively. It can be observed that the mercury values determined for samples of fish were all higher than the method's LOQ. Moreover, the digestion method proposed has the advantage of allowing the complete mineralization of the muscle tissue samples without the use of high-temperature heating and the time of determination of mercury by GFAAS is lower than the other methods described in the literature (Bermejo-Barrera et al., 1999; Gallignani et al., 1998; Moreda-Piñeiro, López-Mahía, Muniategui-Lorenzo, Fernández-Fernández, & Prada-Rodríguez, 2002; Zhang & Adeloju, 2012; Bermejo-Barrera et al., 1994;). These advantages strengthen the use of GFAAS in the determination of mercury in biological samples.

4. Conclusions

The proposed acid digestion procedure using an ultrasonic water bath enabled the complete mineralization of the fish muscle tissue samples for the determination of the total mercury concentration by GFAAS. The combination of copper nitrate as a chemical modifier and tungsten carbide as a permanent modifier thermally stabilized the mercury up to the atomization temperature of 1600 °C, enabling the determination of mercury concentrations in ppb. Therefore, the proposed method can be used to monitor the levels of mercury in fish muscle tissue samples.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of FA-PESP/Brazil (Processes 2010/51332-5 and 2009/54856-8) and ANEEL.

References

- Bermejo-Barrera, P., Moreda-Piñeiro, J., Moreda-Piñeiro, A., & Bermejo-Barrera, A. (1994). Palladium as a chemical modifier for the determination of mercury in marine sediment slurries by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 296, 181–193.
- Bermejo-Barrera, P., Verdura-Constenla, E. M., Moreda-Piñeiro, A., & Bermejo-Barrera, A. (1999). Rapid acid leaching and slurry sampling procedures for the determination of methyl-mercury and total mercury in human hair by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 398, 263–272.
- Bidone, E. D., Castilhos, Z. C., Santos, T. J. S., Souza, T. M. S., & Lacerda, L. D. (1997). Fish contamination and human exposure to mercury in Tartarugalzinho River, Amapá state, Northern Amazon, Brazil. A screening approach. *Water, Air and Soil Pollution*, 97, 9–15.
- Currie, L. A. (1999). Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Analytica Chimica Acta*, 391, 105–126.
- Gallignani, M., Bahsas, M. H., Brunetto, M. R., Burguera, M., Burguera, J. L., & Petit de Peña, Y. (1998). A time-based flow injection-cold vapor-atomic absorption spectrometry system with on-line microwave sample pre-treatment for the determination of inorganic and total mercury in urine. *Analytica Chimica Acta*, 369, 57–67.
- Horwitz, W., & Richard, A. (1997). The concept of uncertainty as applied to chemical measurements. *Analyst*, 122, 615–617.
- McClure, F. D., & Lee, J.-K. (2003). Computation of HORRAT Values. *Journal of AOAC International*, 86, 1056–1058.
- Mondal, B. C., & Das, A. K. (2003). Determination of mercury species with a resin functionalised with a 1,2-bis(o-aminophenylthio)ethane moiety. *Analytica Chimica Acta*, 477, 73–80.
- Moreda-Piñeiro, L., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Fernández-Fernández, E., & Prada-Rodríguez, D. (2002). Direct mercury determination in aqueous slurries of environmental and biological samples by cold vapour generation-electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 460, 111–122.
- Neves, R. C. F., Moraes, P. M., Saleh, M. A. D., Loureiro, V. R., Silva, F. A., Barros, M. M., et al. (2009). FAAS determination of metal nutrients in fish feed after ultrasound extraction. *Food Chemistry*, 113, 679–683.
- Pfeiffer, W. C., Lacerda, L. D., Salomons, W., & Malm, O. (1993). Environment fate of mercury from gold mining in the Brazilian Amazon. *Environmental Reviews*, 1, 26–37.
- 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. (2007). 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.
- Silva, F. A., Padilha, C. C. F., Pezzato, L. E., Barros, M. M., & Padilha, P. M. (2006). 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.
- Torres, A. P., Vieira, M. A., Ribeiro, A. S., & Curtius, A. J. (2005). Determination of inorganic and total mercury in biological samples treated with tetramethylammonium hydroxide by cold vapor atomic absorption spectrometry using different temperatures in the quartz cell. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20, 289–294.
- Zhang, Y., & Adeloju, S. B. (2012). Speciation of mercury in fish samples by flow injection catalytic cold vapour atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 721, 22–27.

APÊNDICE 3

CÁLCULOS ESTEQUIOMÉTRICOS: RELAÇÃO DE ÁTOMOS DE MERCÚRIO POR MOLÉCULAS DE PROTEÍNA

Exemplo de cálculos para o Spot D1

Dados Spot D1:

$$M_m = 18,1 \text{ kDa} = 18100 \text{ Da}$$

$$m_{\text{proteína}} = 0,9 \mu\text{g} = 0,9 \times 10^{-6} \text{ g}$$

$$[\text{Hg}]_{\text{spot D1}} = 33,3 \text{ mg g}^{-1}$$

$$M_m_{\text{Hg}} = 200,59 \text{ g mol}^{-1}$$

$$n^{\circ} \text{ Avogadro} = 6,022 \times 10^{23}$$

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

- CÁLCULO DO NÚMERO DE MOLÉCULAS DE PROTEÍNA NO SPOT

$$\left. \begin{array}{l} 1 \text{ Da} \text{ ————— } 1,661 \times 10^{-24} \text{ g} \\ 18100 \text{ Da} \text{ ————— } x \text{ (g)} \end{array} \right\} x = 3,00641 \times 10^{-20} \text{ g}$$

$$\left. \begin{array}{l} 3,00641 \times 10^{-20} \text{ g} \text{ ————— } 1 \text{ molécula} \\ 0,9 \times 10^{-6} \text{ g} \text{ ————— } y \text{ (moléculas)} \end{array} \right\} y = 29,936 \times 10^{12} \text{ moléculas de proteína}$$

- CÁLCULO DO NÚMERO DE ÁTOMOS DE MERCÚRIO

$$\left. \begin{array}{l} 33,3 \text{ mg de mercúrio} \text{ ————— } 1 \text{ g de proteína} \\ z \text{ (mg)} \text{ ————— } 0,9 \times 10^{-6} \text{ g (m}_{\text{proteína}}) \end{array} \right\} z = 2,997 \times 10^{-5} \text{ mg} = 2,997 \times 10^{-8} \text{ g}$$

$$\left. \begin{array}{l} 200,59 \text{ g (Mm}_{\text{Hg}}) \text{ ————— } 6,022 \times 10^{23} \\ 2,997 \times 10^{-8} \text{ g} \text{ ————— } w \text{ (átomos)} \end{array} \right\} w = 89,974 \times 10^{12} \text{ átomos de Hg}$$

- RELAÇÃO DE ÁTOMOS DE MERCÚRIO POR MOLÉCULA DE PROTEÍNA

$$\frac{n^{\circ} \text{ de átomos de mercúrio}}{n^{\circ} \text{ de moléculas de proteína}} = \frac{89,974 \times 10^{12}}{29,936 \times 10^{12}} = \boxed{3,005 \text{ átomos de Hg por molécula de proteína}}$$