

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

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA
AVALIAÇÃO DE CÁLCIO, FERRO E ZINCO LIGADOS A
PROTEÍNAS DE TECIDO HEPÁTICO DE TILÁPIA DO NILO
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*)**

PAULA MONTEIRO DE LIMA

Dissertação apresentada como parte
das exigências para obtenção do
Título de Mestre em Zootecnia pelo
Programa de Pós-graduação em
Zootecnia da FMVZ – UNESP
Câmpus de Botucatu

BOTUCATU – SP
Junho – 2010

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

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA
AVALIAÇÃO DE CÁLCIO, FERRO E ZINCO LIGADOS A
PROTEÍNAS DE TECIDO HEPÁTICO DE TILÁPIA DO NILO
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*)**

PAULA MONTEIRO DE LIMA
Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

BOTUCATU – SP
Junho – 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO UNESP -FCA - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

L732d Lima, Paula Monteiro de, 1983-
Desenvolvimento de metodologias analíticas para avaliação de cálcio, ferro e zinco ligados a proteínas de tecido hepático de Tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*) / Paula Monteiro de Lima. - Botucatu : [s.n.], 2010.
xii, 48 f. : il., color., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2010.

Orientador: Pedro de Magalhães Padilha
Inclui bibliografia.

1. Metaloproteínas. 2. Spots protéicos. 3. Eletroforese. 4. Fluorescência de raios -X. 5. Tilápia do Nilo. I. Padilha Pedro de Magalhães. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

*Aos meus pais Sérgio e Olga,
Pelo exemplo de união, dedicação, amor
e por todos os sonhos compartilhados e realizados!
minha eterna gratidão, admiração, respeito...*

*À minha irmã Thaís,
Pelo eterno companheirismo, acolhimento
e confiança.*

*Ao meu irmão Lucas,
Pelos momentos de distração, aprendizagem
e cuidado.*

*Obrigada por serem a minha família!
Amo vocês.*

*À minha Tia Léo,
Pelas conquistas não compartilhadas,
Mas pelos sonhos vividos intensamente.
In memoriam*

Dedico

“Na profissão, além de amar tem de saber.

E o saber leva tempo para crescer”

(Rubem Alves)

Agradecimentos

A Deus, por permitir o dom da vida e a graça de poder desfrutá-la com amor, esperança e responsabilidade. Agradeço por mais uma conquista.

Aos meus pais Sérgio e Olga, que se doaram e renunciaram muitas vezes aos seus sonhos, para que pudessem realizar os meus. Obrigada pelo eterno acolhimento.

Aos meus irmãos Thaís e Lucas, por me trazerem força, alegria e inspiração para minha vida!

A minha família de Pira pelo amor, cuidado e torcida.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/UNESP, Botucatu, pelo privilégio que tive em realizar a Graduação e o Mestrado em Zootecnia nesta instituição.

Ao Professor Dr. Pedro de Magalhães Padilha, pela intensa dedicação, atenção, confiança, incentivo, amizade, pelo exemplo profissional, acolhimento e ensinamentos.

Ao Professor Dr. Luiz Edivaldo Pezzato, pela grande amizade, oportunidade e confiança e a sua equipe de trabalho do Laboratório de Nutrição de Peixes, pelo oferecimento das amostras.

Aos meus amigos do laboratório: Renato e Felipe, pelo super companheirismo, bom humor e dedicação total a este trabalho; Fábio Arlindo, pelos ensinamentos; Paula Martin e Bárbara, pela amizade e incentivo.

Aos funcionários do Departamento de Química: Maria, pela grande dedicação, amizade e contribuição para a realização do trabalho; Vânia, pela amizade e incentivo; Lourdes, Fábio e Elaine, pela amizade e colaboração.

Ao Professor Marco Aurélio Zezzi Arruda e seus orientados Marcelo e Hebert do Departamento de Química da Universidade Estadual de Campinas, pela disponibilização do laboratório, auxílio e ensinamentos.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), pelo suporte dado para a execução do experimento na linha de fluorescência de Raios-X.

À CAPES inicialmente e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa de estudo.

Aos grandes amigos da 27^a turma de Zootecnia: Berne, Fozzi, Sofia, Thaila, K-Xú e Porta, pelo apoio, torcida e eterno carinho.

E a todos aqueles que contribuíram de certa forma para a realização deste trabalho,

Muito obrigada!

Homenagem ao orientador

“Nossa ciência não é ilusão. Ilusão seria imaginar que aquilo que a ciência não nos pode dar, podemos conseguir em outro lugar”.

(Freud)

Agradeço por te me incentivado e orientado na pesquisa, contribuindo na realização de um sonho!

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO	02
1.1. Considerações iniciais e justificativas	02
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1. Tilápia do Nilo	03
2.2. Proteínas	04
2.2.1. Preparo de amostras para extração das proteínas	05
2.3. Proteômica	06
2.4. Metalômica	07
2.5. Nutrição Mineral	08
2.6. Eletroforese Bidimensional	09
2.6.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em uma dimensão (1D-PAGE).....	10
2.6.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida em duas dimensões (2D-PAGE).....	11
2.7. Revelação de proteínas totais.....	12
3. Tratamento da imagem do gel de poliacrilamida	13
4. Fluorescência de Raios-X com Radiação Síncrotron	13
5. Espectrometria de absorção atômica (FAAS)	14
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16

CAPÍTULO II

Resumo.....	25
Abstract	26
1. INTRODUÇÃO	27
2. PARTE EXPERIMENTAL	28

2.1. Equipamentos	28
2.2. Reagentes e soluções	29
2.3. Coleta e preparo das amostras.....	30
2.4. Preparação das amostras para corrida eletroforética	30
2.4.1. Extração das proteínas	30
2.4.2. Precipitação e Ressolubilização das proteínas	30
2.4.3. Determinação da concentração de proteína total	31
2.4.4. Separações eletroforéticas	32
2.5. Determinações qualitativa de cálcio, ferro e zinco por SR-XRF nos spots.....	34
2.6. Determinação quantitativa de cálcio, ferro e zinco por FAAS nos spots protéicos	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1. Determinação da concentração de proteína total nos extratos	35
3.2. Otimização das separações eletroforéticas	35
3.3. Determinação qualitativa de cálcio, ferro e zinco por SR-XRF nos spots protéicos das amostras de fígado	37
3.4. Avaliação quantitativa de cálcio, ferro e zinco nos spots protéicos das amostras de fígado	40
4. CONCLUSÕES	42
5. AGRADECIMENTOS	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
CAPÍTULO III	
Implicações	47
7. ANEXO	48

LISTA DE ABREVIATURAS

1D	Uma Dimensão
1D – PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em uma dimensão
2D	Duas Dimensões
2D – PAGE	Eletroforese em Gel Poliacrilamida em duas dimensões
IEF	Focalização Isoelétrica
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MM	Massa Molar
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
pI	Ponto Isoelétrico
SDS -PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
DTT	1,4-ditiotreitol
<i>spot</i>	Banda 2D de proteínas
SR	Radiação Síncrotron
SR-XRF	Fluorencência de Raios-X com Radiação Síncrotron
kDa	KiloDalton (1 Da = $1,661 \times 10^{-24}$ g)
TEMED	N,N',N,N'-tetrametiletenodiamina
CHAPS	3-[(3- cloroamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
PMSF	Felimetilsulfonil Fluoreto

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO I**

Tabela 1. Proteínas Conjugadas	05
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Massa molar (MM) e ponto isoelétrico (pI) de proteína das amostras de fígado de tilápia do Nilo separadas por 2D PAGE que apresentaram cálcio, ferro e zinco ligados em suas estruturas	39
--	----

Tabela 2. Concentração de cálcio, ferro e zinco e estimativa das massas de proteínas determinadas nos spots protéicos das amostras de tecido hepático, nos quais foi detectada a presença desses elementos por SR-XRF	40
--	----

Tabela 3. Estimativa do número de moléculas de proteínas contendo cálcio e/ou ferro e/ou zinco ligados e do número de átomos desses analitos por spot protéico.....	41
--	----

LISTA DE FIGURAS**CAPÍTULO I**

- Figura 1.** Níveis de estrutura nas proteínas 04
- Figura 2.** Sequência das etapas que envolve a separação de proteínas por eletroforese em primeira e segunda dimensões 12

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Gel de poliacrilamida com proteína de amostras de tecido hepático de tilápia do Nilo 36
- Figura 2.** Exemplo de espectro de SR-XRF obtido de spot protéico de amostra de fígado de tilápia do Nilo 37
- Figura 3.** Spots protéicos em três dimensões de amostras de fígado de tilápia do Nilo 38

Capítulo - I

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações iniciais e justificativas

Nos últimos anos ocorreu um considerável aumento na demanda de pescado, o que tem levado os pesquisadores que trabalham com aquicultura a desenvolverem trabalhos relacionados ao comportamento, fisiologia, produção, genética e nutrição de peixes. É consenso entre esses pesquisadores a fundamental importância dos íons metálicos como componentes estruturais e funcionais dos peixes, como por exemplo, no aspecto estrutural o cobre e o zinco presente nas metalotioninas e no aspecto funcional o papel catalisador que esses íons exercem nos sistemas enzimáticos. Os íons metálicos ligados às proteínas e metaloproteínas representam grande porção do número total de proteínas. Estima-se que aproximadamente 40% de todas as proteínas e enzimas necessitam a presença de um íon metálico para realizar alguma atividade biológica [1-3].

É de fundamental importância o desenvolvimento de metodologias analíticas que permitem uma avaliação segura das metaloproteínas e/ou proteínas ligadas a metais presentes no sangue e em tecidos de animais. Isto, principalmente, em relação aos macros e micronutrientes minerais 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. O estudo da metalômica das diferentes espécies de peixes poderá fornecer informações valiosas sobre como um íon metálico está distribuído e coordenado às proteínas, como também da concentração individual da espécie metálica, contribuindo assim para elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais dessas biomoléculas [3,4].

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Tilápia do Nilo

A aquicultura é o setor da agropecuária brasileira com maior expansão nos últimos anos e segundo dados do levantamento da Food and Agriculture Organization [1], o crescimento da atividade no Brasil superou a média mundial, sendo apontada como um mercado estratégico para o desenvolvimento sustentável, produção de alimentos e ampliação de fronteiras inexploradas no país. O grupo de peixes que mais cresce em comercialização mundial, especialmente pelo aumento da produção destas espécies na China e outros países em desenvolvimento, como o Brasil é o grupo das tilápias [5].

Tilápia é o nome comum de aproximadamente 70 espécies de peixes taxonomicamente classificadas, da família Cichlidae, nativas da África tropical, que se espalharam pelo mundo nos últimos 50 anos e hoje são produzidas em mais de 100 países em diversos climas e sistemas de produção. Devido à sua variada fisiologia adaptativa, biologia reprodutiva, plasticidade genética, fácil domesticação e comercialização, podendo se tornar o mais importante grupo de espécies aquícolas neste século [6,7].

Esse grupo é composto por dois gêneros (*Tilápia* e *Oreochromis*), 80% das tilápias produzidas no mundo são acinzentadas “nilóticas” ou “do Nilo”, *Oreochromis niloticus*. Estas apresentam crescimento mais rápido e rendimento de filé superior quando comparada às demais características zootécnicas das mais desejadas. No Brasil a tilapicultura segue a tendência mundial, com predominância de 80% de tilápias nilóticas e 20% de tilápias vermelhas (híbridas) [7].

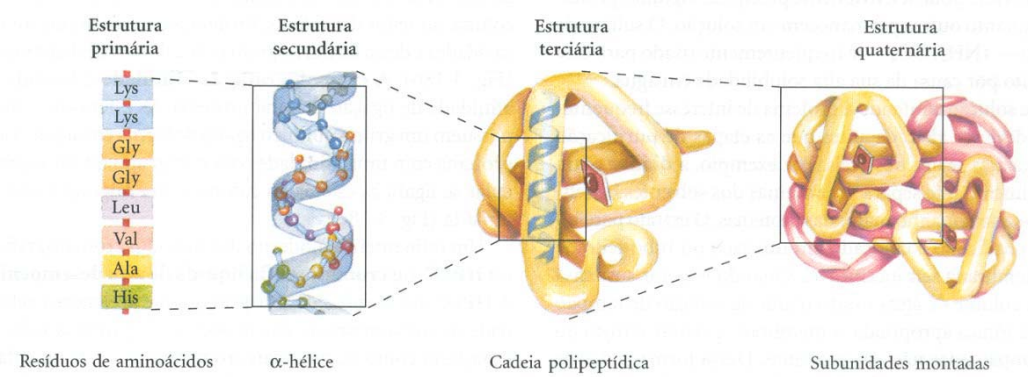
Atualmente, as tilápias são os peixes de cultivo mais importantes das regiões tropicais no mundo. São rústicos, de crescimento rápido, não necessitam de tecnologia sofisticada, possuem alta prolificidade, aceitam grande variedade de alimentos, e têm boa conversão alimentar, são resistentes a muitas doenças e desovam durante todo o ano, além de possuírem excelente sabor e textura. Sua importância como fonte de proteína animal nos países subdesenvolvidos é amplamente reconhecida [8].

2.2 Proteínas

As proteínas são as moléculas orgânicas mais abundantes nas células, sendo fundamentais para a estrutura e função celular [9]. Possuem estruturas bastante complexas formadas por unidades monoméricas denominadas aminoácidos, agrupados por ligações peptídicas, contendo a informação necessária para formar uma molécula protéica com estrutura tridimensional única [10,11].

A complexidade da estrutura protéica é melhor analisada considerando-se a molécula em termos de quatro níveis de organização, denominados primário, secundário, terciário e quaternário [12,13]. Uma descrição de todas as ligações covalentes, principalmente ligações peptídicas e ligações dissulfeto, unindo resíduos de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica é sua estrutura primária. O mais importante elemento da estrutura primária é a sua seqüência de resíduos de aminoácidos. A estrutura secundária refere-se a arranjos particularmente estáveis de resíduos de aminoácidos dando origem a padrões estruturais recorrentes. A estrutura terciária descreve todos os aspectos do enovelamento tridimensional de um polipeptídeo. Quando uma proteína possui duas ou mais subunidades polipeptídicas, seu arranjo no espaço é referido como estrutura quaternária [13]. A Figura 1 mostra esquematicamente os níveis de estruturas das proteínas.

Figura 1 – Esquema dos níveis estruturais das proteínas [13]



Muitas proteínas contêm apenas resíduos de aminoácidos e nenhum outro constituinte químico, essas proteínas são consideradas proteínas simples. Entretanto, algumas proteínas contêm permanentemente associados outros componentes químicos além dos aminoácidos. Essas proteínas são chamadas de proteínas conjugadas. A parte não-aminoácido de uma proteína conjugada é usualmente chamada de seu grupo

prostético. Usualmente o grupo prostético desempenha papel importante na função biológica da proteína. Proteínas conjugadas são classificadas com base na natureza química de seus grupos prostéticos. Por exemplo, as lipoproteínas contêm lipídios, as glicoproteínas contêm grupos açúcar, e as metaloproteínas um metal específico [13]. A Tabela 1 mostra alguns exemplos de proteínas conjugadas.

Tabela 1: Proteínas conjugadas [13]

<i>Classe</i>	<i>Grupo Prostético</i>	<i>Exemplo</i>
Lipoproteínas	Lipídios	β_1 -lipoproteína do sangue
Glicoproteínas	Carboidratos	Imunoglobulina G
Fosfoproteínas	Grupos fosfato	Caseína do leite
Hemoproteínas	Heme (porfirinas de ferro)	Hemoglobina
Flavoproteínas	Nucleotídios de flavina	Desidrogenase succínica
	Ferro	Ferritina
	Zinco	Desidrogenase alcoólica
Metaloproteínas	Cálcio	Calmodulina
	Molibdênio	Dinitrogenase
	Cobre	Plastocianina

Para realizar estudos protéicos, se faz necessário separar as proteínas das demais substâncias, por meio de suas características físico-químicas, onde as principais propriedades usadas são: carga iônica, tamanho, conformação e especificidade de ligação com outras moléculas biológicas. Para esta, a separação das proteínas se dá pela técnica de cromatografia e para as demais propriedades também se utiliza a eletroforese [9,11].

2.2.1 Preparo de amostras para extração das proteínas

O preparo de amostras é um grande desafio, uma vez que há grande complexidade das amostras biológicas. É necessário conhecer a determinada amostra para otimização da metodologia a ser aplicada [9], pois o melhor método de extração, precipitação e solubilização das proteínas varia de uma amostra para outra [14].

Um método eficiente de preparação de amostras protéicas precisa considerar os seguintes fatores: a) as proteínas devem ser extraídas da amostra biológica, b) as substâncias interferentes devem ser removidas ou reduzidas, c) as proteínas devem ser mantidas em solução até que o processo de separação esteja finalizado, d) deve-se evitar a agregação e modificação química das proteínas [14].

A escolha pelo método de extração e do rompimento celular, está relacionado com estado físico da amostra, onde esta pode ser submetida a processos mecânicos ou por tratamento enzimático. Porém, no estado sólido, geralmente emprega-se a maceração manual e no líquido, utiliza-se ultra-som para homogeneizar o material e romper as células [15].

Na maioria das amostras a presença de substâncias endógenas (interferentes), como sais, ácidos nucleicos, lipídeos e polissacarídeos, devem ser inativadas, minimizadas ou removidas, pois podem interagir com as proteínas causando problemas na separação eletroforética [16–18]. Após o rompimento celular e a retirada dos interferentes, as proteínas devem ser reduzidas, solubilizadas e desnaturadas (modificações das estruturas protéicas) [19].

No processo de solubilização das proteínas adiciona-se uma solução-tampão contendo: a) Dodecil sulfato de sódio (SDS), Triton X-100 e sulfonato de 3-[(3-cloroamidopropil)dimetilamonio]-1-propano (CHAPS), detergentes para extração integral de proteínas e solubilização de proteínas pouco solúveis, b) 1,4 ditiotretol (DTT) e β -mercaptoetanol, agentes redutores para manter os resíduos de cisteína reduzidos, c) felimetilsulfonil fluoreto (PMSF), pepstatina e leupeptina, inibidores de proteases para inibir as proteases dos aminoácidos, serina, aspárticas e cisteína, respectivamente, d) uréia e tiuréia, agentes caotrópicos, para quebrar as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas e evitar agregações indesejáveis e formação de estrutura secundária [18].

2.3 Proteômica

A Proteômica tem como objetivo estudar as propriedades das proteínas, níveis de expressão, funções, modificações pós-traducionais, interações entre proteínas e mecanismos regulatórios [20]. Uma descrição completa do proteoma de um organismo pode fornecer não apenas um catálogo do conjunto de proteínas que está sendo expresso pelo genoma, mas também dados de expressão celular sob condições definidas e a distribuição dessas proteínas na célula [21].

Proteoma é o conjunto de todas as proteínas que intervêm no processo biológico de uma espécie. Este termo foi utilizado pela primeira vez em 1993 por Mark Wilkins e Keith Williams para descrever o complemento protéico total do genoma [20,22]. Analisando o proteoma de um organismo é possível obter uma visão de todas as

proteínas existentes em seu fenótipo molecular específico, sendo altamente dinâmico e dependente do estado da célula [23]. Um mesmo genoma pode, potencialmente, originar número infinito de proteomas e, desta maneira, o proteoma é ferramenta que vem complementar o estudo do genoma [24].

Um organismo, para a sua homeostase, deve regular a transcrição, tradução, boa assimilação e incorporação do metal. Portanto, a química de uma célula precisa ser caracterizada não só pela sua característica genômica no núcleo e teor de proteína, o proteoma, mas também pela distribuição dos metais e, entre as diferentes espécies e compartimentos celulares, metaloma. Este refere-se à totalidade das espécies de metal em uma cela individual e abrange os inorgânicos (livre e complexada) o conteúdo do elemento e do conjunto dos seus complexos com biomoléculas, especialmente com as proteínas, metaloproteoma [25].

2.4. Metalômica

O termo metaloma foi inventado por Williams, que se refere como um elemento de distribuição, as concentrações de equilíbrio dos íons metálicos livres ou, como um elemento de conteúdo livre em um compartimento celular, célula ou organismo [26]. Este último seria, portanto, caracterizado não só pelo seu genoma ou proteoma, mas também pelo metaloma e seus complementos inorgânicos. O significado do termo metaloma foi, então, proposto para ser estendida aos metais e de espécies metalóides inteiras presentes na célula ou no tecido [24]. O campo de pesquisa que lida com o estudo de metalomas e suas correlações com genomas e proteomas foi referido como metalômica [27].

Metalômica é o estudo de um metaloma, interações e conexões funcionais de íons metálicos e suas espécies com genes, proteínas, metabólitos e outras biomoléculas dentro dos organismos e dos ecossistemas. É área de pesquisa transdisciplinar, com impacto sobre a geoquímica, patologia clínica e farmacologia, fisiologia vegetal e animal e nutrição. Seu objetivo final é fornecer compreensão global e sistemática da captação de metais, o transporte, papel e excreção em sistemas biológicos [4].

A metaloproteína é definida como proteína cuja função é conferida por um metal (a proteína deve ligar um metal para a sua função). A função pode ser, por exemplo, atividade catalítica, implicação na transferência de elétron-reação de íons metálicos redox-ativos ou estabilização da proteína terciária ou de estrutura quaternária. O metal é

normalmente ligado a um íon hidratado ou um metal contendo um cofactor (metilcobalamina, por exemplo) [4].

As metaloproteínas são consideradas diferentes das proteínas ligadas a metais. 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 [19]. Fracamente ligados às proteínas, estão os íons monovalentes como o sódio e o potássio. De intensidade moderada se mostra o magnésio e o cálcio. Dentre os metais que apresentam forte ligação às proteínas, mais freqüentemente, estão os metais de transição, tais como o ferro, cobre, zinco, manganês, molibdênio e o cobalto. Devido às suas propriedades (densidade, pequeno raio atômico e interação via eletromagnética e forças eletrostáticas), estão ligados à maioria das metaloproteínas [28, 19, 29, 30, 31, 32]. 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 [19, 29, 30, 31, 32]

Na nutrição o papel essencial de muitos elementos traço, suas implicações na prevenção de uma série de doenças e os baixos níveis de alguns desses elementos na dieta de muitos países estão na origem do interesse crescente na suplementação de alimentos e com elementos minerais [4].

2.5. Nutrição Mineral

Os elementos minerais são importantes em diversos aspectos do metabolismo dos peixes. Dentre estes, destaca-se a resistência e rigidez dos ossos, manutenção do equilíbrio osmótico com o meio aquático e manutenção do sistema nervoso e endócrino. São ainda componentes de enzimas envolvidas nos processos metabólicos [2].

Os sete principais minerais e os quinze elementos traços considerados essenciais para os animais terrestres são também exigidos pelos peixes. Entretanto, apenas sete (Ca, P, Mg, Fe, Zn, I e Se) têm sido mais estudados. Diferentemente dos demais animais, os peixes apresentam a importante particularidade de ter fonte de suprimento dos minerais, tanto a dieta como o meio em que vive [2].

O íon cálcio está relacionado para todos os sistemas biológicos e participa de numerosas reações enzimáticas. É componente vital no mecanismo da secreção

hormonal, está envolvido na neurotransmissão, na contração muscular e coagulação sanguínea, constituindo o principal cátion da estrutura cristalina dos ossos, além de participar do metabolismo da vitamina D, influir sobre a permeabilidade das membranas biológicas [33], no equilíbrio ácido básico e na ativação de várias enzimas [34].

O ferro é mineral intimamente envolvido nos processos respiratórios em função de sua atividade de transferência de elétrons [34], desempenha papel fundamental nos processos de divisões mitóticas e proliferações celulares [35]. Participa, também, da produção e funcionamento da hemoglobina, mioglobina, citocromos e outros sistemas enzimáticos.

Como ativo ou cofator para alguns importantes sistemas enzimáticos, o zinco é vital ao metabolismo de lipídeos, proteínas e carboidratos. Desempenha também papel importante na ação hormonal como a insulina, glucagon, corticotróficos, hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante [2].

2.6. Eletroforese Bidimensional

Embora esta técnica não seja nova, ela recentemente tornou-se método preferido na geração de mapas protéicos a partir de amostras complexas, atraindo os pesquisadores pelo seu alto poder de resolução, podendo separar teoricamente até 10.000 spots por gel [36].

A técnica de eletroforese (do grego: transporte pela eletricidade) baseia-se na migração de íons submetidos à corrente elétrica, de tal forma que moléculas com carga positiva migrem para o pólo negativo, e moléculas com carga negativa, migrem para o pólo positivo [37]. Na eletroforese de proteínas, a taxa de migração ou mobilidade eletroforética é influenciada pela carga protéica no meio eletroforético, assim como pela sua forma, tamanho e associação com outros compostos ionizáveis [9], permitindo separar simultaneamente centenas de proteínas diferentes, de acordo com seu ponto isoelétrico (pI) e massa molecular. Esta ferramenta possibilita a análise de amostras complexas, como extratos celulares, que apresentam grande diversidade de proteínas com características moleculares como ponto isoelétrico e massa molecular diferentes [38].

À medida que as moléculas migram no campo elétrico ocorre aumento da resistência. Durante a corrida eletroforética, parte da energia proveniente da corrente elétrica é transformada em calor, o que tende a desnaturar as proteínas. Entretanto, o

sistema eletroforético é mantido sob baixa temperatura por meio da utilização de uma coluna de água fria ou mesmo de câmara fria. As soluções-tampão estabilizam o pH do meio e permitem fluxo da corrente elétrica, devendo ter acentuada condutividade elétrica [37].

No fim da década de 1950 e início dos anos 60 surgiu a eletroforese em gel de poliacrilamida, que permitiu o desenvolvimento das eletroforeses descontínuas que apresentam alto poder de resolução e ganhou grande importância na avaliação da homogeneidade de preparações protéicas obtidas, normalmente, por sistemas cromatográficos [39].

Entre as técnicas eletroforéticas utilizadas no fracionamento de proteínas, a eletroforese em géis de poliacrilamida (PAGE) tem se mostrado mais bem-sucedida na separação dessas macromoléculas, por oferecer alto poder de resolução na separação das moléculas protéicas e, por permitirem controle de porosidade, por meio do teor de seus componentes: acrilamida e bisacrilamida. A solução de acrilamida polimerizada tem aspecto de líquido de alta viscosidade, já a adição da bis-acrilamida durante a polimerização liga as macromoléculas de poliacrilamida entre si, produzindo uma reticulação [9].

Géis de poliacrilamida são formados por copolimerização de acrilamida e Bis-acrilamida (Bis) na presença de persulfato de amônia e tetrametiletilenodiamina (TEMED), ou riboflavina e TEMED. Este catalisa a liberação de radicais livres de persulfato (SO_4^-) que, por sua vez, iniciam a polimerização. A polimerização para render géis, requer ligações entre as cadeias de poliacrilamida geradas por moléculas de Bis. O componente Bis por copolimerização, causa reticulação entre as cadeias de poliacrilamida [40]. O diâmetro dos poros do gel é função das concentrações de acrilamida e Bis, onde para separação de moléculas maiores, usam-se géis com menor teor de acrilamida.

2.6.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em uma dimensão (1D-PAGE)

Quando uma mistura protéica é aplicada a esse gel, cada proteína migra até atingir o pH que coincide com o seu pI. Proteínas com diferentes pIs são, por tanto, distribuídas diferentemente através do gel. Desta forma as proteínas migram em direção à sua carga até atingir posição neutra, denominada de repouso [9].

Na eletroforese em gel de poliacrilamida em uma dimensão pode-se analisar a proteína na forma nativa ou desnaturada, dependendo das condições empregadas na extração das proteínas. No sistema nativo ou não-dissociante as proteínas são separadas com base na sua carga, pelo método de focalização isoeletrica (IEF). Neste sistema é formado um gradiente de pH (estabelecido por meio da distribuição de uma mistura de moléculas orgânicas anfóteras (ácidos e bases) de baixo peso molecular, sob ação de um campo elétrico), no qual, as proteínas carregadas eletricamente irão mover-se até um pH específico, onde apresentarão carga efetiva nula, conhecido como o pI da proteína. Em sistemas desnaturantes ou dissociantes as proteínas são solubilizadas em tampão contendo um reagente desnaturante, sendo o SDS (dodecilsulfato de sódio), o mais empregado. Esse detergente aniônico interage com as cadeias peptídicas das proteínas, desnaturando-as e formando um complexo SDS-Proteína, fornecendo-lhes cargas negativas. Assim todas as proteínas migram em direção ao eletrodo positivo e são separadas somente pelas diferenças relacionadas às suas massas molares. Esse tipo de eletroforese é conhecido como SDS-PAGE. Agentes redutores, tais como β -mercaptoetanol e DTT (1,4-ditiotreitol), são adicionados para romper as pontes de dissulfetos (ligações-S-S-) presentes para facilitar o acesso do SDS às partes mais internas das proteínas [39, 41].

2.6.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida em duas dimensões (2D-PAGE)

Misturas complexas de proteínas não são bem resolvidas em eletroforese de apenas uma dimensão. Nesse caso, utiliza-se a eletroforese em géis bidimensionais, que combina dois métodos diferentes de separação (Figura 2). Nessa técnica, em uma primeira etapa, proteínas nativas são separadas em estreita fatia de gel num gradiente de pH imobilizado (gel de focalização isoeletrica). Cada proteína se deslocará até um ponto no gradiente que corresponde ao seu ponto isoeletrico, como nesse ponto sua carga líquida é zero, não ocorre mais migração da macromolécula. Atualmente essa etapa ocorre em fitas pré-fabricadas de gel de poliacrilamida onde os anfólitos estão imobilizados, formando assim um gradiente de pH. Após essa etapa a fita é incubada com um agente redutor e iodoacetamida, para se evitar a reoxidação dos grupos tióis. [39, 42].

Em uma segunda etapa, a fita contendo as proteínas separadas por IEF é colocada no topo de outro gel, e assim as proteínas presentes na fita serão separadas de

acordo com a massa molar por SDS-PAGE, em direção perpendicular a da primeira etapa. A associação destes dois tipos de eletroforese (IEF e SDS-PAGE) aumenta significativamente a resolução do método. Desta forma, cada ponto resultante observado no gel de 2D-PAGE corresponde a uma proteína específica, presente na amostra [39, 42].

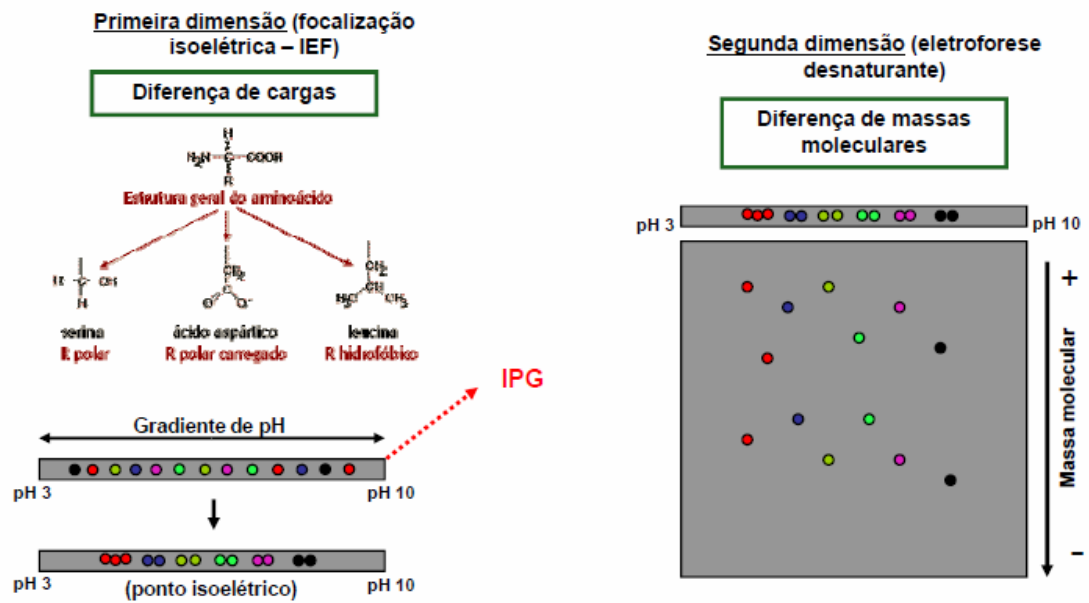


Figura 2. Sequência das etapas que envolve a separação de proteínas por eletroforese em primeira e segunda dimensões [43].

2.7. Revelação de proteínas totais

A revelação de proteínas em géis é frequentemente feita à base de coomassie. Após a eletroforese, os géis são imersos em fixador, a fim de imobilizar as proteínas e a seguir corados com coomassie. Posteriormente, o corante é removido por meio de lavagens do gel com a mesma solução fixadora, resultando em bandas azuis de proteínas que contrastam com a transparência do gel [40, 44].

Coomassie é reagente apreciado para identificação de proteínas graças à sua intensa capacidade de coloração, sua distinção entre proteínas e aminoácidos, sua facilidade de manejo, sua elevada solubilidade em géis de poliacrilamida e agarose e sua estabilidade em forma sólida. A coloração azul é o resultado da reação entre a função sulfona de coomassie com a função amina das proteínas [45, 46].

3. Tratamento da imagem do gel

Os géis de eletroforese bidimensionais corados são digitalizados com o auxílio de um scanner específico. As imagens geradas são analisadas através de programas desenvolvidos para a análise dos resultados obtidos em géis 2D [46].

No final dos anos 1970 e início de 1980 Garrels (1979) e Lemkin e Lipkin (1981) foram os primeiros a desenvolver programas de computador que a análise assistida de 2D géis [47, 48].

Vários softwares são utilizados no mercado como, Phoretix 2D, SaneSpots v2.0 (Non linear Dynamics), PDQuest (Biorad), Melanie (GeneBio), Decyder e ImageMaster Platinum (GE Healthcare). Este último foi desenvolvido pelo Instituto Suíço de Bioinformática em colaboração com GeneBio e GE Healthcare, permitindo a contagem do número de spots, a caracterização automática dos valores de pI e MM, a análise dos níveis de expressão, assim como diversos outros recursos para o melhoramento da qualidade da imagem [46]. Ele simplifica e melhora a análise de géis 2D e identifica os marcadores da proteína de interesse [49].

Por tanto, na eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) há possibilidade de se realizar estudos comparativos, os quais podem facilitar a identificação de candidatos a biomarcadores por meio da comparação entre os spots dos géis, uma vez que a técnica confere uma alta resolução, permitindo uma separação eficiente [50, 51].

4. Fluorescência de Raios-X com Radiação Síncrotron

A luz, ou radiação Síncrotron é uma designação ampla para todos os tipos de luz originados por partículas relativísticas em trajetórias curvas, sendo produzidas em um equipamento que acelera partículas (elétrons) a grandes velocidades, emitindo fótons (grãos de luz). Portanto a radiação Síncrotron é uma radiação eletromagnética produzida quando os elétrons (ou pósitrons), utilizando magnetos, são forçados a mudar de direção. A radiação é um milhão de vezes mais intensa (11 vezes mais) do que as fontes convencionais. Quando o feixe de raios X irradia a amostra, origina uma interação com os constituintes atômicos da mesma a partir de três processos principais: o efeito fotoelétrico, o efeito de dispersão elástica (Rayleigh) e o efeito inelástico [52, 53].

Desde a sua descoberta, em 1940, a Luz Síncrotron tem-se convertido numa excelente fonte de raios X, tendo, atualmente, grandes aplicações científicas em muitas disciplinas, incluindo: Biologia, Medicina, Física, Engenharias e Geociências. Atualmente, os equipamentos dos aceleradores de partículas Síncrotron já se encontram em sua terceira geração [54].

No Brasil, os primeiros estudos de inclusões fluidas em minerais transparentes foram desenvolvidos por Xavier et al., (1999), Alves et al., (2000a, b) e Rios et al. (2006), na Estação de Microfluorescência de Raios X Síncrotron (μ SXRF), instalada no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, SP [54].

O LNLS constitui-se no único laboratório desse tipo disponível na América do Sul. A estação está equipada com um capilar cônico ultrafino, que condensa o feixe de luz branca de 0,5 mm por 0,5 mm numa área de, aproximadamente, 20 μ m [55].

5. *Espectrometria de absorção atômica*

A espectrometria de absorção atômica (AAS) é hoje uma técnica largamente difundida e empregada para a determinação de elementos traço nas mais diversas amostras. A técnica utiliza basicamente o princípio de que átomos livres (estado gasoso) gerados em um atomizador são capazes de absorver radiação de frequência específica que é emitida por uma fonte espectral; a quantificação obedece desta forma, os princípios da lei de Beer [56].

Em instrumentos convencionais, usualmente uma fonte de radiação específica para cada elemento (fonte de linha) é utilizada, o que implica que apenas as linhas do próprio elemento são emitidas pela fonte [56].

Os dois tipos de atomizadores mais usados em AAS são a chama e o forno de grafite. A espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS - do inglês Flame Atomic Absorption Spectrometry) é a técnica mais utilizada para análises elementares em níveis de mg/L, enquanto que a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (ETAAS - do inglês Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry) é utilizada para determinações de baixas concentrações (μ g/L) [57-59]

Os primeiros espectrômetros de absorção atômica apresentavam uma chama como atomizador, uma lâmpada de cátodo oco como fonte de radiação específica para o elemento a ser determinado, que é ainda hoje a fonte de radiação mais utilizada em

absorção atômica, um monocromador para selecionar o comprimento de onda de interesse das linhas emitidas pela fonte de radiação, e uma válvula fotomultiplicadora, que transforma a energia da radiação eletromagnética não absorvida em um sinal elétrico (energia elétrica). Por tanto a lâmpada de catodo oco (HCL), emite radiação em comprimento de onda determinado e com intensidade inicial I_0 . Esta radiação está direcionada para a chama que contém os átomos no estado fundamental. A intensidade inicial de radiação (I_0) sofre decréscimo devido à absorção de parte desta energia pelos átomos que passaram do estado fundamental para o estado excitado. A radiação que chega até o sistema detector com diminuição de intensidade, denominada I , e a quantidade de radiação absorvida pelos átomos do analito na nuvem atômica é determinada pela comparação entre os valores de I e I_0 . A diferença de intensidade entre I e I_0 corresponde a concentração do analito dentro da amostra [57-59].

6. Referências Bibliográficas

1. FOOD AGRICULTURAL ORGANIZATION. **The state of world's fisheries and aquaculture 2002**. Rome, 10p, 2003.
2. PEZZATO, L. E. et al. Nutrição de peixes. In: CYRINO, J. E. C. et al. (Ed.) **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, p. 75-169, 2004.
3. GARCIA, J. S.; MAGALHÃES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. **Talanta**, v. 69, p. 1-15, 2006.
4. MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. Metallomics: the concepts and methodology. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 1119-1138, 2009.
5. HEMPEL, E. Tilapia, the new whitefish. *Seafood Internacional*, London, v. 17, n. 10, p. 16-20, 2002.
6. FITZSIMMONS, K. Tilapia: the most important aquaculture species in the 21st century. In: SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 5, 2000, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: ISTA, 2000. p. 3-8.
7. SHELTON, W. L. Tilapia culture in the 21st century. In: CYRINO, J.E.P. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2002.
8. MCCONNELL, S. K. J. et al. Microsatellite marker based genetic linkage maps of *Oreochromis aureus* and *O. niloticus* (Cichlidae): extensive linkage group segment homologies revealed. **Animal Genetics**, v. 31, p. 214-218, 2000.
9. ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.

10. CASCARDO, J. C. M. et al. Differential expression of the soybean BiP gene family. **Plant Science**, n.160, p. 273-281, 2001.
11. FEY, S. J.; LARSEN, P. M. 2D or not 2D. **Current Opinion in Chemical Biology**, n. 5, p. 26-33, 2001.
12. CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 544 p.
13. LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.
14. HERBERT, B. R. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 20, p. 660-663, 1999.
15. RABILLOUD, T. et al. Analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. Comparison of the proteins extracted from normal *Plasmodium falciparum*: infected erythrocyte ghosts. **Electrophoresis**, v. 20, p. 3606, 1999.
16. CHAN, L. L.; LO, S. C. L.; HODGKISS, I. J. Proteomics study of a model causative agent of harmful red tide, *Prorocentrum triestinum*: optimization of sample preparation methodologies for analyzing with two-dimensional electrophoresis. **Proteomics**, v.2, p. 1168, 2002.
17. CASTELLANOS-SERRA, L.; PAZ-LAGO, D. Inhibition of unwanted proteolysis during sample Preparation: evaluation of its efficiency in challenge experiments, **Electrophoresis**, v. 23, p. 1745, 2002.
18. GÖRG, A. et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 21, p. 1037, 2000.
19. GARCIA, J. Avaliação do desenvolvimento do girassol por meio de análise de proteínas e metaloproteínas. 2006. 150f. Tese (Doutorado em Ciências)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

20. BLACKSTOCK, W. P.; WEIR, M. P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Reviews: TIBTECH*, v. 17, p. 121-127, 1999.
21. BELIZÁRIO, J. E. Proteoma: o desafio tecnológico do século 21. **Ciência Hoje**, v. 27, n. 162, p. 78-81, jul. 2000.
22. LOPEZ, F. L. Proteome analysis: I. gene products are where the biological action is. **Journal of Chromatography**, n. 722, p. 191-202, 1999.
23. GODOVAC-ZIMMERMANN, J.; BROWN, L. R. Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 20, p. 1-57, 2001.
24. GRAVES, P. R.; HAYSTEAD, T. A. J. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, p. 39-63, Mar. 2002.
25. SZPUNAR, J. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 54-56, 2004.
26. WILLIAMS, R. J. P. Chemical selection of elements by cells. **Coord. Chem. Rev.**, v. 583, p. 216-217, 2001.
27. HARAGUCHI, H. Metallomics as integrated biometal science. **Journal Analytical Spectrometry**, v. 19, p. 5-14, 2004.
28. VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. *Fundamentals of biochemistry*. John Wiley, 2002. 931 p.
29. VALLEE, B. L. Metallothionein historical review and perspectives. In: KAGI, J. H. R.; NORDBERG, M. (Eds.). **Metallothionein**. Birkhauser: Basel, 1979. p. 19-40.
30. KAGI, J. H. R.; SCHAFFER, A. Biochemistry of metallothionein. **Biochemistry**, v. 27, p. 8509-8515, 1988.

31. STILLMAN, M. J.; SHAW, C. F.; SUZUKI, K. T. Metallothioneins. In: STILLMAN, M. J.; SHAW, C. F.; SUZUKI, K. T. (Eds.). **Metallothioneins**. New York: VCH, 1992. p. 1-13.
32. ARNESANO, F. et al. An Italian contribution to structural genomics: Understanding metalloproteins. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 250, p. 1419-1450, 2006.
33. BERNE, R. M. Fisiologia. Editora Guanabara, 2 ed, 1980. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v.66, p.39-63, 2002. **Journal of Biogical Chemistry**. v. 250, p.4007-4021, 1975.
34. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of fishes**. Washington, DC, 1993, 94p.
35. ROBBINS, E.; FANT, J.; NORTON W. Iron: its intracellular localization and possible role in cell division. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 66, p. 1244, 1972.
36. O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 250, p. 4007-4021, 1975.
37. WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. Part III: course manual, step 9: in-gel digestion. In: WESTERMEIER, T.; NAVEN, R. (Eds.). **Proteomics in practice: a laboratory manual of proteome analysis**. Germany: Wiley, 2004. p. 261.
38. SILVA JUNIOR, J. G. **Eletroforese de proteínas: guia teórico-prático**. Rio de Janeiro: Interciência, 2001. 125 p.
39. COOPER, T. G. **The tools of biochemistry**. New York: John Wiley, 1977. 423 p.
40. LANÇAS, F. M. ET al. A química analítica do proteoma. **Analytica**, v. 6, p. 60-67, 2003.
41. HAMES, B. D.; RICKWOOD, D. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. 2. ed. Oxford: IRL PRESS, 1990. 383 p.

42. HAMES, B.D. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. 3 ed. Oxford University Press, 1998, 351 p.
43. CHRAMBACH, A.; RODBARD, D. Polyacrylamide gel electrophoresis. **Science**, v. 172, p. 440-451, 1971.
44. DIEZEL, W.; KOPPENSCHLÄGER, G.; HOFMANN, E. An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of coomassie brilliant blue. **Anal. Biochem**, v. 48, p. 617-620, 1972.
45. REISNER, A. H.; NEMES, P.; BUCHOLTZ, C. The use of coomassie brilliant blue G 250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. **Anal. Biochem**, v. 64, p. 509-516, 1975.
46. ROCHA, T. L. ET al. **Eletroforese bidimensional e análise de proteomas**. Brasília, DF: EMBRAPA, 2005. (Comunicado técnico, 136). Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/cot136.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2010.
47. GARRELS, J. I. Two-dimensional gel electrophoresis and computer analysis of proteins synthesized by clonal cell lines. **J. Biol. Chem**, v. 254, p. 7961-7977, 1979.
48. LEMKIN, P. F.; LIPKIN, L. E. GELLAB: a computer system for two-dimensional gel electrophoresis analysis. III. Multiple two-dimensional gel analysis. **Comput. Biomed. Res.**, v. 14, p. 407-446, 1981.
49. GE HEALTHCARE. ImageMaster 2D Platinum: image analysis software. v. 7.0., 2009. 1 CD-ROM.
50. BANDOW, J. E. et al. Improved image analysis workflow for 2-D gels enables large-scale 2-D gel-based proteomics studies – COPD biomarker discovery study. **Proteomics**, v. 8, p. 3030-3041, 2008.

51. DOWSEY, A. W.; DUNN, M. J.; YANG, G. Z. The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoreses. **Proteomics**, v. 3, p. 1567-1596, 2003.
52. WINICK, H.; DONIACH, S. **Synchrotron radiation research**. New York: Plenum Press, 1980. 754 p.
53. LINDGREEN, E. S. X-Ray fluorescence analysis: energy dispersive. In: MEYERS, R.A. (Ed.). **Enciclopedia of analytical chemistry**. Chichester: John Wiley, 2000. chap. 1, p. 1-12.
54. RIOS, F.J.; FUZIKAWA, K.; ALVES, J.V.; GONÇALVES, R.M.; CHAVES, A.O.; SOUZA, A.M.; CHAVES, A.M.D.V.; PEREIRA, A.R.P.; LIMA, T.A.F.; NEVES, J.M.C.; PÉREZ, C.A.; GUILLOT, M.G.; MATTOS, E.C.; ROSIÉRE, C.A. Estudos por μ XRF-Sincrotron de fluidos mineralizadores detectados em minérios uraníferos, ferríferos e depósitos epitermais. *Geociências*, v. 59, n. 4, p. 373-377, 2006.
55. PÉREZ, C. A. et al. Synchrotron radiation x-ray fluorescence at the LNLS: Beamline Instrumentation and Experiments. **X-Ray Spectrometry**, v. 28, p. 320-326, 1999.
56. BORGES, D. L. G. et al. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**, v. 18, p. 58-66, ago./set. 2005.
57. WELZ, B.; SCHLEMMER, G.; VOELLKOPE, U. Influence of the valence state on the determination of selenium in graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 39, n. 1-2, p. 501-510, 1984.
58. JACKSON, K. W. **Electrothermal atomization for analytical atomic spectrometry**. Chichester: John Wiley, 1999.
59. KRUG, F. J. **Espectrometria atômica e abertura de amostras**. São Paulo: USP, CENA, 2003. 10f. Curso ministrado na Universidade de São Paulo, CENA.

Com base na revisão literária apresentada, objetivou-se, com o presente trabalho **“ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA METALÔMICA EM AMOSTRAS DE TECIDO HEPÁTICO DE TILÁPIA DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) POR SRXRF E FAAS APÓS SEPARAÇÃO POR 2D-PAGE: RESULTADOS PRELIMINARES”**:

- a) Otimizar métodos eletroforéticos em 2D para o fracionamento de proteínas nas amostras de tecido hepático para identificação dessas proteínas por análise das imagens obtidas nos géis de poliacrilamida.

- b) Mapear spots protéicos por SR-XRF para identificação qualitativa de íons cálcio, ferro e zinco

- c) Quantificar por FAAS cálcio, ferro e zinco nos spot protéicos

O trabalho foi redigido conforme as normas da revista *Talanta*.

Capítulo - II

Estratégias analíticas para metalômica em amostras de tecido hepático de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por SRXRF e FAAS após separação por 2D-PAGE: resultados preliminares

Paula M. Lima^a, Renato de C. F. Neves^a, Felipe A. dos Santos^a, Fábio A. Silva^a, Marcelo A. O. da Silva^b, Carlos A. Pérez^c, Marco A. Z. Arruda^{b,d}, Pedro M. Padilha^{d,e*}

^aFaculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNESP– Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, C. Postal 31, 15385-000 Botucatu, SP, Brasil

^bInstituto de Química/UNICAMP, Grupo de Espectrometria, Preparo de Amostras e Mecanização-GEPAM, C. Postal 6154, 13084-971 Campinas, SP, Brasil

^cLaboratório Nacional de luz Síncronon, Campinas, SP, Brazil.

^dInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica/UNICAMP, C. Postal 6154, 13084-971 Campinas, SP, Brasil

^eInstituto de Biociências/UNESP-Departamento de Química e Bioquímica, C. Postal 510, 18618-000 Botucatu, SP, Brasil

*Corresponding author: e-mail: padilha@ibb.unesp.br

Resumo

No presente trabalho foi feito uma análise qualitativa de cálcio, ferro e zinco em spots de proteínas de amostras de tecido hepático de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por Fluorescência de Raios-X de Radiação Síncrotron, após a separação das proteínas por Eletroforese Bidimensional em Gel de Poliacrilamida (2D-PAGE). Os espectros de fluorescência obtidos indicaram a presença de cálcio, ferro e zinco em doze, seis e oito spots protéicos das amostras de fígado, respectivamente. Os íons metálicos detectados nas amostras estão distribuídas principalmente em proteínas de massa molar menor que 45 kDa e com pI na faixa de 4,5 a 9,0. Além do cálcio, ferro e zinco foram detectados a presença de enxofre e fósforo, elementos não metálicos, que podem ser constituintes da estrutura das proteínas. As concentrações de cálcio, ferro e zinco ligados às proteínas foram determinadas por FAAS após a mineralização ácida dos spots protéicos, encontrando-se concentrações na faixa de 1,08 a 5,80 mg g⁻¹, 2,02 a 8,03 mg g⁻¹ e 1,60 a 8,55 mg g⁻¹, respectivamente.

Palavras-chaves: Metaloproteínas, spots protéicos, eletroforese em duas dimensões, Fluorescência de Raios-X de Radiação Síncrotron.

Abstract

An investigation was made into calcium, iron and zinc in protein spots in samples of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver tissue obtained after protein separation by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) and subsequent qualitative and quantitative evaluation by synchrotron radiation X-ray fluorescence (SRXRF) and graphite furnace atomic absorption spectrometry (FAAS). An analysis of the fluorescence spectra indicated the presence of calcium, iron and zinc in twelve, six and eight liver protein spots, respectively. The metal ions found were distributed mainly in proteins with a molar mass of less than 40.00 kDa and more than 12.00 kDa, with pI in the range of 4.70 to 9.40. The only exception was a spot presenting protein with a molar mass of 10.10 kDa. In addition to calcium, iron and zinc, sulfur and phosphorus – which are non-metals that may be part of the protein structure, were also detected. After microwave-assisted acid mineralization of the proteins spots, a FAAS estimation of the concentration of calcium, iron and zinc bound to these proteins indicated a range of 1.08 to 5.80 mg g⁻¹, 2.02 to 8.03 mg g⁻¹ e 1.60 to 8.55 mg g⁻¹, respectively.

Keywords: Metalloproteins, protein spots, two-dimensional electrophoresis, synchrotron radiation, X-ray fluorescence.

1. Introdução

Embora os íons metálicos constituam apenas cerca de 4% da porção do tecido corporal, são essenciais em muitos processos vitais. Os principais papéis desses íons metálicos podem ser descritos como estrutural e funcional. No aspecto funcional, destaca-se o papel catalisador nos sistemas enzimáticos, por meio da ligação desses íons a substratos, e a mediação nas reações de óxido-redução, por meio de mudanças reversíveis no estado de oxidação do íon metálico. No aspecto estrutural, destacam-se como integrantes de compostos orgânicos do corpo, o ferro na hemoglobina, iodo na tiroxina, cobalto na vitamina B₁₂ e o enxofre na tiamina e biotina. Esses elementos atuam na estabilização dessas biomoléculas, principalmente no balanço de cargas negativas [1-3]. Dependendo das proporções e quantidades presentes nos tecidos animais, os elementos inorgânicos são classificados em macronutrientes (elementos que os animais necessitam em grandes quantidades) e micronutrientes (elementos que os animais necessitam em pequenas quantidades). Dos elementos químicos presentes na tabela periódica, 25 podem ser classificados como essenciais, no entanto, em termos práticos, pode-se classificar os elementos essenciais em macroelementos, cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cloro e enxofre e, como microelementos o ferro, iodo, selênio, cobalto, manganês, zinco e cobre [1-5].

Na nutrição animal, mais especificamente na nutrição de peixes, a margem entre a demanda nutricional e limiar tóxico na quantidade de alguns microelementos, como por exemplo do selênio, na dieta é muito estreito. O mapeamento desses elementos em proteínas do sangue e dos tecidos corporais desses animais, pode fornecer informações interessantes para a genética, fisiologia e nutrição de peixes, particularmente na avaliação da eficiência relativa das quantidades desses micronutrientes para manter a atividade de várias enzimas [6,7].

As metaloproteínas e os íons metálicos ligados às proteínas representam grande porção do número total de proteínas. Estima-se que aproximadamente 40% de todas as proteínas e enzimas necessitam a presença de um íon metálico para realizar atividade biológica [8]. As metaloproteínas constituem grupo de proteínas que contêm um cofator metálico incorporado por meio de ligações específicas, caracterizando-se pela alta afinidade da interação metal-proteína. Já as proteínas ligadas a metais constituem grupo de proteínas onde os íons metálicos são incorporados por ligações não-específicas, caracterizando-se pela baixa afinidade da ligação metal-proteína, com isso essa ligação é facilmente quebrada [9,10]. Fracamente ligados às proteínas, estão os íons monovalentes como o sódio e o potássio. De intensidade moderada se mostra o magnésio e o cálcio. Dentre os metais que apresentam forte ligação às proteínas, mais freqüentemente, estão os metais de transição, tais como o ferro, cobre, zinco, manganês, molibdênio e o cobalto, devido às suas propriedades (densidade, pequeno raio atômico e interação via eletromagnética e forças eletrostáticas), estão ligados à maioria das metaloproteínas [11,12].

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo fazer investigação qualitativa e quantitativa de cálcio, ferro e zinco em spots de proteínas de amostras de fígado de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por Fluorescência de Raios-X de Radiação Síncrotron e Espectrômetria de Absorção Atômica, após separação por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida.

2. Parte Experimental

2.1. Equipamentos

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

2.2. Reagentes e soluções

Água ultrapura ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida pelo sistema Elga modelo PURELAB Ultra Ionic foi utilizada em todo o trabalho no preparo das soluções. Ácidos acético (J. T. Backer) e fosfórico (Mallinckodt) de pureza analítica, nítrico e clorídrico (Merck) de grau espectroscópico foram utilizados em todo o trabalho no preparo de soluções tampão e soluções eletroforéticas. Todos os solventes orgânicos utilizados (e.g. etanol, acetona, metanol) foram de pureza analítica e de procedência Merck. As soluções utilizadas nas separações eletroforéticas e padrões protéicos foram preparados com reagentes de pureza analítica de procedência Amersham Biosciences. Todas as soluções foram estocadas em frascos de polipropileno e/ou vidro, sendo as soluções utilizadas nas separações eletroforéticas foram guardadas em refrigerador a 4°C (e.g.) ou em freezer a -20°C . Todos os frascos de estocagem das soluções tampões, soluções extratoras, padrões protéicos, vidrarias foram lavados com ácido nítrico 10% v/v

durante 24 horas e em seguida enxaguados com água ultrapura e secos por jatos de ar puro antes da utilização.

2.3. Coleta e preparação das amostras

As amostras de fígado foram obtidas a partir de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, Botucatu/SP. Ao final do manejo alimentar, os peixes foram anestesiados, com solução de benzocaína (100 mg L⁻¹) e eutanasiados para retirada do fígado inteiro. As amostras de fígado foram então transferidas para frascos de polipropileno de 15 mL e armazenadas em freezer a -20 °C.

2.4. Preparação das amostras para as corridas eletroforéticas

2.4.1. Extração das proteínas

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

2.4.2. Precipitação e Ressolubilização das proteínas

Os extratos protéicos das amostras de fígado foram submetidos a processo de remoção de albumina por meio do uso de kit de remoção de albumina (Millipore), visto

que essas amostras apresentam altas concentrações de albumina. Após a etapa de remoção de albumina, a precipitação das proteínas contidas nos extratos protéicos foi feita com solução gelada de acetona 80% (v/v) na proporção de 1:4 (amostra:acetona). Essa precipitação foi conduzida durante três horas a -20°C , garantindo que a precipitação ocorresse de maneira quantitativa. Em seguida, o precipitado protéico foi centrifugado a 10.000 rpm em ultracentrífuga refrigerada (BioAgency) por 10 minutos e o sobrenadante foi retirado. Esse precipitado protéico foi lavado mais duas vezes com a solução de acetona gelada utilizada para a precipitação. Após estes procedimentos parte dos precipitados protéicos foi ressolubilizada em tampão Tris-HCl a 1 mol L^{-1} (pH 6,8), para quantificação do teor total de proteínas, e parte dos precipitados foi ressolubilizada em tampão contendo uréia a 7 mol L^{-1} , tiouréia a 2 mol L^{-1} , CHAPS a 2% (m/v), anfólitos de pH 3 a 10 a 0,5% (v/v) e azul de bromofenol a 0,002%, além disso 2,8 mg de DTT foram adicionados a este tampão, esta mistura foi utilizada nas separações eletroforéticas [13].

2.4.3. Determinação da concentração de proteína total

A concentração de proteínas totais nos extratos protéicos foi determinada de acordo com o método de Bradford. Curvas analíticas de calibração foram feitas na faixa de 25 a $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ a partir de solução padrão estoque de $500\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de Albumina de Soro Bovino, com o mesmo tampão utilizado na ressolubilização das proteínas. Quando necessário, as amostras foram diluídas com o mesmo tampão. Em cubetas de plástico foram adicionados $200\text{ }\mu\text{L}$ de padrão/amostra diluída apropriadamente, e $2,5\text{ mL}$ do reagente de Bradford. Após 5 min de reação, as leituras de absorvância foram medidas a 595 nm em espectrofotômetro [14,15].

2.4.4. Separações eletroforéticas

Antes do início das separações eletroforéticas uma massa de aproximadamente 250 µg de proteínas dos extratos protéicos de fígado foram aplicadas em fitas para focalização isoeletrica de 13 cm, que continham o gel pré-fabricado com os anfólitos imobilizados de pH 3 a 10. Essas fitas foram colocadas em aparato, sobre o qual permaneceu por 12h, a temperatura ambiente, para serem reidratadas com o extrato protéico. Além do extrato protéico foram adicionados, também, cerca de 900 µL de óleo mineral sobre essas fitas. Após este período, a fita reidratada foi levada ao sistema para focalização isoeletrica para corrida em primeira dimensão da eletroforese bi-dimensional, utilizando a seguinte programação de tensão: Etapa 1 = 500 V, com acúmulo de 500 Vh; Etapa 2 = 1000 V, com acúmulo de 800 Vh; Etapa 3 = 10000 V, com acúmulo de 11300 Vh; Etapa 4 = 10000 V, com acúmulo de 3000 Vh.

O programa de separação em primeira dimensão durou em média 4,5 h. Após o término da focalização isoeletrica, a fita com as proteínas separadas em função do pI, foi equilibrada em duas etapas. Na primeira etapa, foram utilizados 10 mL de solução contendo uréia 6 mol L⁻¹, SDS 2 % (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, azul de bromofenol 0,002% (m/v) e DTT 1% (m/v), sendo denominada etapa de redução, por manter as proteínas em suas formas reduzidas. Na segunda etapa utilizou-se uma solução de composição similar, porém, substituindo-se o DTT por iodoacetamida 2,5% (m/v), sendo denominada alquilação por alquilar os grupos tióis das proteínas, prevenindo que elas sejam reoxidadas durante o processo eletroforético. Cada uma destas etapas durou 15 min e foi realizada sob leve agitação em mesa agitadora [17].

Após a etapa de equilíbrio das fitas realizou-se a segunda dimensão do processo eletroforético (SDS-PAGE). A fita de proteínas de fígado foi aplicada em gel de

poliacrilamida 12,5%, previamente preparados em placa de vidro de 180x160x1,5 mm. Os géis de poliacrilamida foram preparados a partir das seguintes soluções: Acrilamida, N,N'-metilenobisacrilamida, Tris-hidroximetil amino metano, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), N,N',N,N'-tetrametilenodiamina (TEMED), Ácido Clorídrico (HCl) e Persulfato de Amônio. Foi colocado sobre o gel de poliacrilamida, ao lado da fita, um pedaço de papel de filtro, ao qual foi aplicado 10 µL de padrão de massa molar contendo as proteínas β-fosforilase (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactoalbumina (14,4 kDa). A fita e o papel de filtro foram vedados com solução quente de agarose 0,5% (m/v) em tampão adequado, de modo a garantir o contato destes com o gel de poliacrilamida. Em seguida, a corrida eletroforética em segunda dimensão foi feita em sistema para eletroforese 2D-PAGE, em duas etapas, utilizando a seguinte programação: Tensão (V) – Etapa 1 = 90, Etapa 2 = 250; Corrente elétrica (mA) – Etapa 1 = 25, Etapa 2 = 25; Potência (W) – Etapa 1 = 100, etapa 2 = 100; Tempo (h) – Etapa 1 = 0,5, Etapa 2 = 5.

Após o período de corrida (aproximadamente 5,5 h) as proteínas foram reveladas empregando-se o corante Coomassie coloidal, que consiste em uma solução de sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 1,6% (v/v), azul de coomassie G-250 0,08% (m/v) e metanol 25% (v/v). Antes da revelação, as proteínas foram fixadas durante 1 h, empregando-se solução contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v). O corante ficou em contato com o gel durante 72 h e depois foi removido por sucessivas lavagens com água ultrapura [17,18].

Os géis obtidos, feitos em triplicatas, foram escaneados e as imagens foram tratadas, para análises de correlação entre as repetições de géis, bem como a contagem de spots dos mesmos, utilizando o programa *ImageMaster platinum 7.0* [17,18].

2.5. Determinação qualitativa de cálcio, ferro e zinco por SR-XRF nos spots protéicos

As determinações qualitativas de cálcio, ferro e zinco nos spots protéicos foram feitas em linha de Fluorescência de raios-X com radiação Síncrotron, disponível no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, localizado na cidade de Campinas-SP/Brasil. Os spots de proteínas foram retirados do gel com o auxílio de ponteira de pipeta, secos com lâmpada de infravermelho durante 20 min e fixados em plataforma de alumínio. Após estabelecidas as condições de análise, o mapeamento foi realizado por irradiação do spot por 200s em dois pontos. Os espectros coletados foram processados por meio do programa AXIL, que permite corrigir a variação da intensidade do feixe da radiação síncrotron fazendo-se a normalização da área dos picos das espécies químicas detectadas pela contagem do pico de argônio [19].

2.6. Determinação quantitativa de cálcio, ferro e zinco por FAAS nos spots protéicos

A quantificação de cálcio, ferro e zinco nos spots protéicos das amostras de fígado foi feita por espectrometria de absorção atômica em chama após a mineralização das amostras. Nessas determinações utilizou-se espectrômetro de absorção atômica SHIMADSU modelo AA-6800, equipado com corretor de absorção de fundo com lâmpada de deutério e sistema self-reverse (SR). Foi utilizada lâmpada de cátodo oco de cálcio, ferro e zinco SHIMADZU, operada com 10 mA de corrente. O comprimento de onda utilizado foi de 422,7 nm, 248,3 nm e 213,8 nm respectivamente para o cálcio, ferro e zinco, com resolução espectral de 0,5 nm. Os sinais de absorbância foram medidos em de área de pico [18].

3. Resultados e Discussão

3.1. Determinação da concentração de proteína total nos extratos protéicos

O teor de proteína total nos extratos das amostras de fígado foi determinado conforme descrito no item 2.4.3., com objetivo de determinar a massa de proteína a ser aplicada na corrida eletroforética por 2D-PAGE, considerando a concentração do gel. O resultado desta determinação indicou que o extrato das amostras de fígado contém $25 \pm 0,3 \text{ g kg}^{-1}$ de proteína total. Com base nesse resultado, volumes de 50 μL de extrato foram aplicados nas tiras contendo géis pré-fabricados para focalização isoeétrica, a fim de se ter uma massa de aproximadamente 250 μg de proteína [18].

3.2. Otimização das separações eletroforéticas

Na tentativa de obter géis de eletroforese com boas resoluções testaram-se sistemas de separação 2D-PAGE, visto que o sistema de separação eletroforética somente em uma dimensão não apresentaria boa resolução e sim bandas de um grupo de proteínas com massas molares semelhantes. Na eletroforese 2D-PAGE cada mancha no gel, ou mais comumente denominado “*spot*” representa uma única proteína [17]. Todos os experimentos de separação das proteínas por 2D-PAGE foram feitas em triplicata. Análises de correlação e a contagem do número de spots também foram feitas entre as repetições dos géis. A Figura 1 mostra o gel obtido para as amostras de fígado, com os spots protéicos nos que foram detectados o cálcio, ferro e zinco por SR-XRF destacados com um círculo.

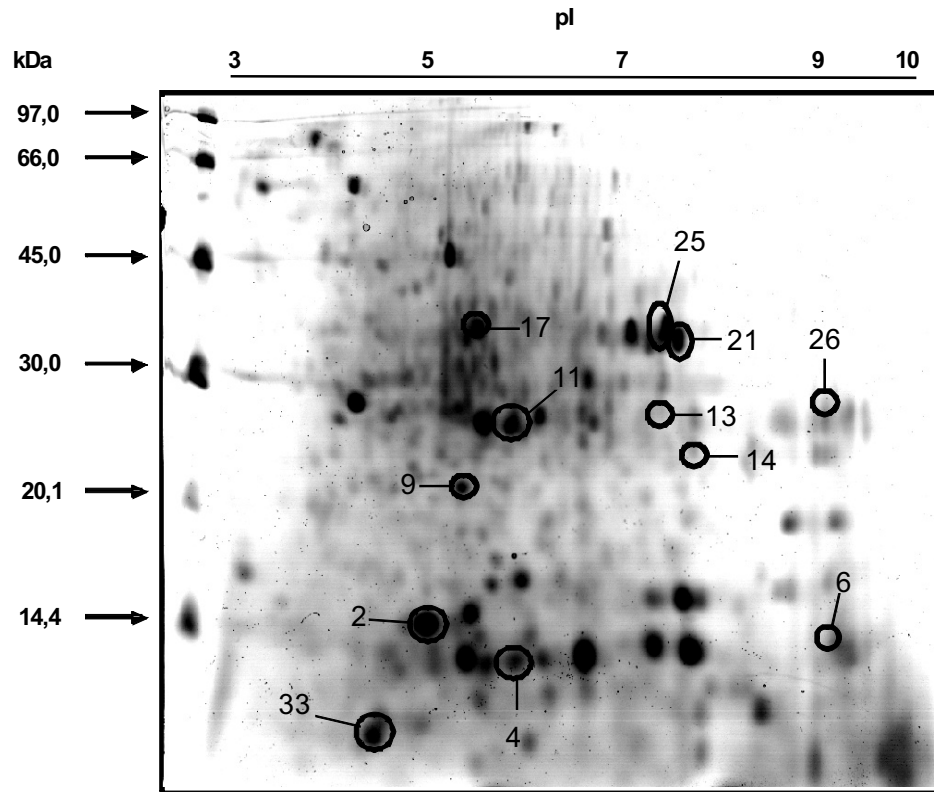


Figura 1. Gel de poliacrilamida com proteínas de amostras de tecido hepático de tilápia do Nilo.

Em relação ao gel da amostra de Fígado (Figura 1), observou-se boa resolução e separação eficiente das proteínas, apresentando grande diversidade das mesmas com pI entre 3,50 e 9,00 e massa molar entre 14,00 e 45,00 kDa. Alguns spots protéicos com massa molar menor que de 14,00 kDa e maior que 45,00 kDa, apresentam-se com significativa intensidade. A análise de correlação entre os três géis demonstrou que 66,4% das proteínas estavam presentes nos três géis, o que representa aproximadamente 335 spots de proteínas. O número médio de spots nos géis foi de 505 com desvio padrão de 12 spots.

3.3. Determinação qualitativa de cálcio, ferro e zinco por SR-XRF nos spots protéicos das amostras de fígado de tilápia do Nilo

A determinação qualitativa de cálcio, ferro e zinco ligados às proteínas dos spots protéicos foi feita considerando a sensibilidade da técnica SR-XRF e possibilidade de que os spots protéicos poderiam conter baixas concentrações dos íons metálicos [19-21].

A Figura 2 apresenta exemplos dos espectros de fluorescência obtidos nas análises por SR-XRF dos spots protéicos e a Figura 5 ilustra em três dimensões spots protéicos que foram detectados cálcio, ferro e zinco.

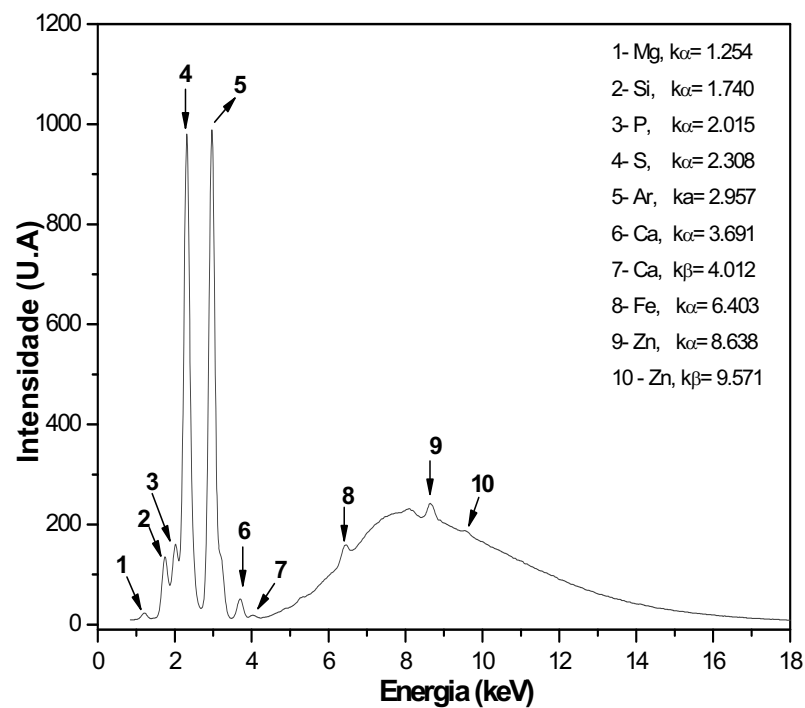


Figura 2. Exemplo de espectro de SR-XRF obtido de spot protéico de amostra de fígado de tilápia do Nilo.

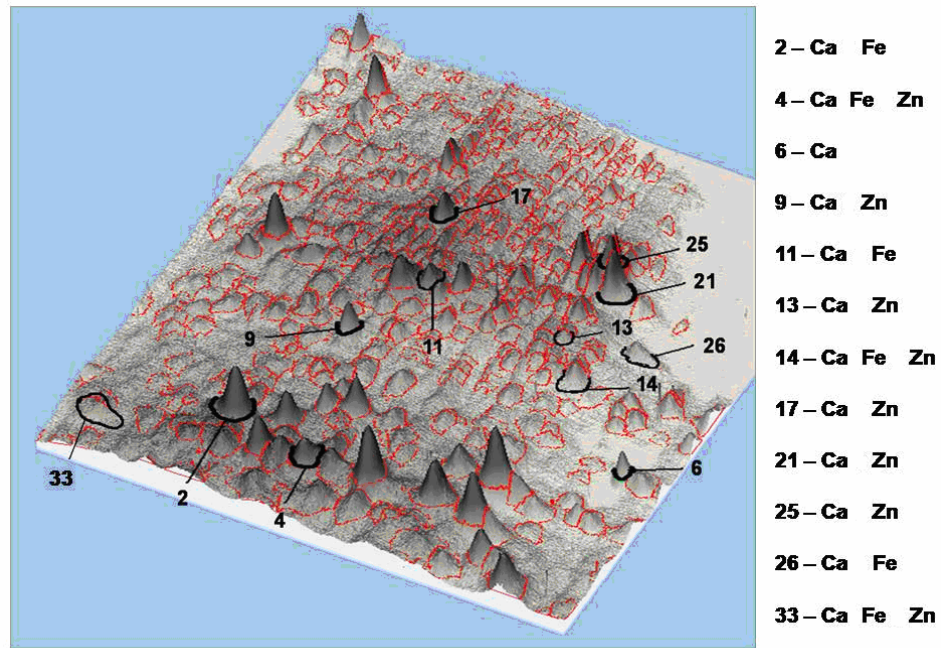


Figura 3. Spots protéicos em três dimensões de amostras de fígado de tilápia do Nilo. Os spots nos quais foram identificados a presença de cálcio, ferro e zinco por SR-XRF estão indicados com círculo.

Como pode ser visto nos gráficos da Figura 2, os espectros apresentam fundos contínuos. 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 [19]. Dessa forma, utilizando os valores das áreas dos picos normalizados (após desconto do branco analítico) dos espectros de SR-XRF, foi possível identificar o cálcio s ($k_{\alpha} = 3,621$, $K_{\beta} = 4,012$), ferro ($k_{\alpha} = 6,403$) e zinco ($k_{\alpha} = 6,638$, $k_{\beta} = 9,571$) ligados às proteínas dos spots destacados com um círculo, apresentados na Figura 3.

De forma geral, todos os espectros de fluorescência obtidos mostraram um perfil semelhante aos espectros mostrados na Figura 2. Nesta pode ser visto no espectro, além de cálcio, ferro e zinco foram detectadas a presença de enxofre e fósforo, não-metais que podem ser parte da estrutura da proteína do spot analisado. Outro íon metálico também detectado foi o magnésio. A presença de mais de um íon metálico em spots de

proteínas são aceitáveis, já que uma única metaloproteína ou proteína metal ligante pode ter vários sítios ativos formados por átomos de íons metálicos diferentes [21]. Os picos de grande intensidade relativos ao argônio ($k\alpha = 2,957$) e ao silício ($k\alpha = 1,740$), que aparecem em todos os espectros, são esperados, pois neste caso, o silício está presente na fita em que é fixada a amostra do spot protéico e o argônio está presente no ar ambiente a uma taxa constante de 0,934% v/v [20,21]. Na Tabela 1 são apresentados os spots nos quais foram identificados a presença de cálcio, ferro e zinco.

Tabela 1. Massa molar (MM) e ponto isoelétrico (pI) de proteínas das amostras de fígado de tilápia do Nilo separadas por 2D PAGE que apresentaram cálcio, ferro e zinco ligados em suas estruturas.

Spots protéicos	Proteínas MM (kDa)	pI	Íons metálicos
2F	13.90	5.20	Ca, Fe
4F	12.70	5.90	Ca, Fe, Zn
6F	13.60	9.30	Ca
9F	22.80	5.70	Ca, Zn
11F	28.80	5.90	Ca, Fe
13F	29.60	7.10	Ca, Zn
14F	25.90	7.30	Ca, Fe, Zn
17F	38.80	5.80	Ca, Zn
21F	37.70	7.40	Ca, Zn
25F	38.90	7.30	Ca, Zn
26F	29.90	9.40	Ca, Fe
33F	10.10	4.70	Ca, Fe, Zn

Com base nos resultados apresentados na Tabela 1 pode-se sugerir a presença de cálcio, ferro e zinco em doze, seis e oito spots protéicos do fígado, respectivamente. Os íons metálicos identificados por SR-XRF estão distribuídos, principalmente, em proteínas com uma massa molar menor do que 45 kDa e com pI na faixa de 4,5 a 9,0.

3.4. Avaliação quantitativa de cálcio, ferro e zinco nos spots protéicos das amostras de fígado de tilápia do Nilo

Após a identificação da presença de cálcio, ferro e zinco por SR-XRF nos spots protéicos das amostras de tecido hepático por 2D PAGE, realizou-se a quantificação desses elementos por FAAS após a mineralização ácida dos spots protéicos. As concentrações de cálcio, ferro e zinco nos spots protéicos foi feita considerando a estimativa da massa de proteína obtida por densidade óptica utilizando-se o programa ImageMaster 2D Platinum versão 7.0. Na Tabela 2 são apresentadas as concentrações desses analitos determinadas nos spots protéicos.

Tabela 2. Concentração de cálcio, ferro e zinco e estimativa das massas de proteínas determinadas nos spots protéicos das amostras de tecido hepático, nos quais foi detectada a presença desses elementos por FASS.

Spots	Cálcio mg g ⁻¹	Ferro mg g ⁻¹	Zinco mg g ⁻¹	Massa Protéica (µg)
2F	5.80	8.03	-	5.10
4F	5.30	7.25	8.55	4.64
6F	5.62	-	-	4.93
9F	4.75	-	7.01	4.20
11F	2.70	3.70	-	10.55
13F	1.30	-	2.02	5.40
14F	1.70	2.02	2.23	4.73
17F	1.10	-	1.60	7.04
21F	2.05	-	1.66	12.80
25F	1.08	-	1.80	13.18
26F	1.45	3.62	-	5.06
33F	3.33	5.53	6.82	3.20

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 2, observa-se que as concentrações de cálcio, ferro e zinco determinadas nos spots protéicos apresentam valores na faixa de 1,08 a 5,80 mg g⁻¹, 2,02 a 8,03 mm g⁻¹ e 1,60 a 8,55 mg g⁻¹, respectivamente. No entanto, os resultados apresentados na Tabela 2 não fornecem

muita informação porque não se sabe de quais proteínas se tratam. Dessa forma, realizou-se a conversão da estimativa das massas de proteínas e das massas dos analitos para quantidades de moléculas proteína e quantidade em mol de cálcio, ferro e zinco, considerando as massas molares das proteínas e dos três íons metálicos e que $1 \text{ Da} = 1,661 \cdot 10^{-24} \text{ g}$. Esses cálculos possibilitaram a estimativa de quantos átomos desses elementos estariam presentes por moléculas de proteína [21,22]. Os resultados obtidos nesses cálculos são mostrados na Tabela 3 em números de moléculas de proteínas contendo átomos de cálcio, ferro e zinco e do número de átomos de cálcio e/ou ferro e/ou zinco.

Tabela 3. Estimativa do número de moléculas de proteínas contendo cálcio e/ou ferro e/ou zinco ligados e do número de átomos desses analitos por spot protéico.

Spots	Número de Moléculas de Proteínas x 10^{14}	Número de Átomos de Cálcio x 10^{14}	Número de Átomos de Ferro x 10^{14}	Número de Átomos de Zinco x 10^{14}
2F	2.21	4.45	4.42	-
4F	2.19	3.70	3.60	3.65
6F	2.18	4.16	-	-
9F	1.04	2.99	-	2.70
11F	2.20	4.30	4.21	-
13F	1.10	1.05	-	1.00
14F	1.10	1.21	1.05	0.97
17F	1.09	1.16	-	1.04
21F	2.04	3.94	-	1.96
25F	2.04	2.14	-	2.18
26F	1.02	1.10	2.01	-
33F	1.90	1.60	1.94	2.01

Com base nos resultados apresentados na Tabela 3 é possível estimar a proporção de cálcio, ferro e zinco por molécula de proteína. Por exemplo, pode-se inferir que no spot 2F da amostra de tecido hepático que cada molécula de proteína tenha aproximadamente dois átomos de cálcio e de ferro. Utilizando-se esse raciocínio,

pode-se inferir que as demais proteínas dos spots tenham aproximadamente de um e dois átomos de cálcio, que as proteínas dos spots 4F, 11f, 14f, 26F e 33F contenham aproximadamente de um a dois átomos de ferro e as proteínas dos spots 4F, 9F, 13F, 14F, 17F, 21f, 25F e 33F contenham aproximadamente de um a três átomos de zinco, respectivamente.

4. Conclusões

A utilização da eletroforese 2D PAGE como a etapa inicial na investigação de metaloproteínas permitiu o fracionamento das proteínas presentes em amostras de tecido hepático de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). A boa correlação obtida nas repetições do gel indicaram que os procedimentos de extração da proteína total foram eficientes, preservando a estrutura metal-proteína, permitindo assim o mapeamento por SR-XRF de cálcio, ferro e zinco nos spots protéicos e a determinação quantitativa desses elementos por FAAS. A quantificação do cálcio, ferro e do zinco nos spots protéicos permitiu estimar que as proteínas dos spots protéicos estudados apresentaram proporções de um a dois átomos de cálcio e/ou de ferro e de um a três átomos de zinco por molécula de proteína, indicando assim, que se pode tratar de metaloproteínas ou proteínas de metal ligante.

5. Agradecimentos

Os agradecem à FAPESP (Processos 03/13362-6 e 07/59778-0) e ao CNPq (Processo 301123/2005-5) pelo suporte financeiro.

6. Referências Bibliográficas

1. HILTON, J.W. The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish. **Aquaculture**, 79, 223–244, 1989.
2. SA, M.V.C.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M. M.; PADILHA, P.M. Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles diets. **Aquaculture**, 238, 385–401, 2004.
3. WATANABE, T., KIRON, V.; SATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. **Aquaculture**, 151, 185–207, 1997.
4. SILVA, F.A., NEVES, R.C.F.; QUINTERO-PINTO, L.G.; PADILHA, C.C. F.; JORGE, S.M.A., BARROS, M.M. et al. Determination of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the bioavailability of this micronutrient in feed used in pisciculture. **Chemosphere**, 68, 1542–1547, 2007.
5. SYNTAYEHU, A.; MATHIES, E.; MEYER-BURFDORFF, K.H. Apparent digestibility and growth experiment with tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed soybean meal, cottonseed meal and sunflower seed meal. **Journal of Applied Ichthyology**, v.12, p.125-130, 1996.
6. LOUREIRO, V.R.; SALEH, M.A.D.; MORAES, P.M. ; NEVES, R.C.F. ; SILVA, F.A. ; PADILHA, C.C.F. ; PADILHA, P.M. Determination of manganese by GFAAS in feces and fish feed slurries. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 1235-1241, 2007.
7. NEVES, R.C.F.; MORAES, P.M.; SALEH, M.A.D.; LOUREIRO, V.R.; SILVA, F.A.; BARROS, M.M.; PADILHA, C.C.F.; JORGE, S.M.A., PADILHA, P.M. FAAS determination of metal nutrients in fish feed after ultrasound extraction. **Food Chemistry**, 113, p. 679-683, 2009.

8. VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. Fundamentals of biochemistry. Upgrade Edition, John Wiley & Sons, Inc., 931p, 2002.
9. FENTON, D.E. Biocoordination Chemistry. New York: Oxford Chemistry Primers, 96p, 1995.
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. 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 polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v.485, p.131-137, 2003.
12. ARNESANO F.; BANCI, L.; BERTINI, I.; CAPOZZI, F.; CIOFI-BAFFONI, S.; CIURLI, S.; LUCHINAT, C.; MANGANI, S.; ROSATO, A.; TURANO, P.; VIEZZOLI, M.S. An Italian contribution to structural genomics: Understanding metalloproteins. **Coordination Chemistry Reviews**. v.250, p.1419-1450, 2006.
13. HAMES, B.D.; RICKWOOD, D. Gel Electrophoresis of proteins: A practical approach. 2^a ed., New York: IRL Press, 383p, 1990.
14. BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
15. LANÇAS, F.M.; SILVA, J.C.R.; BICUDO, R.C.; NETO, M.B. A química analítica do proteoma. **Analytica**, v.6, p.60-67, 2003.
16. BERKELMAN, T.; STENSTEDT, T. 2-D Electrophoresis: Principles and Methods. Uppsala: Amersham Biosciences, 101p, 1998.
17. 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-259 staining for proteome analysis.

Electrophoresis, v.25, p.1327-1333, 2004.

18. GARCIA, J. S., SOUSA, G.H.M.F., EBERLIN, M.N., ARRUDA, M.A Z. Evaluation of metal-ion stress in sunflower (*Helianthus annus L.*) leaves through proteomic changes. **Metalomics**, v. 1, p. 107-113, 2009.

19. VERBI, F.M., ARRUDA, S.C.C., RODRÍGUEZ, A.P.M., PÉREZ, C.A., ARRUDA, M.A.M. Metal-binding proteins scanning and determination by combing gel electrophoresis, synchrotron radiation X-ray fluorescence and atomic spectrometry. **J. Biochem. Biophys. Meth.**, v. 62, p. 97-109, 2005.

20. WESELOH, G.; KUHbacher, M.; BERTELSMANN, H.; OZASLAN, M.; KYRIAKOPOULOS, A.; KNOCHEL, A.; BEHNE, D. Analysis of metal-containing proteins by gel electrophoresis and synchrotron radiation X-ray fluorescence. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, 259, 473, 2004.

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

22. WIND, M.; LEHAMANN, W.D. Element and molecular mass spectrometry – an emerging analytical team in the life sciences. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 19, p. 20-25, 2004.

Capítulo III

IMPLICAÇÕES

A metalômica é um novo campo de investigação que integra estudos de espécies metálicas com estudos de macromoléculas, mais especificamente de proteínas. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos que possam permitir a investigação segura das metaloproteínas, principalmente em relação aos macros e microminerais que são fundamentais para que essas biomoléculas produzam atividades biológicas. Neste contexto, o presente trabalho contribui para o start inicial de estudos metaloproteômicos em peixes. Os procedimentos analíticos otimizados irão contribuir para a caracterização de proteínas da espécie tilápia do Nilo, com a possibilidade de descobrimento de novas proteínas e, mais a frente, das funções específicas dessas biomoléculas, trazendo contribuições significativas para a área de fisiologia de peixe.

7. ANEXO:

Exemplo do cálculo para a estimativa da relação do número de átomos

Para o spot 2F e o Ca:

1) Determinação da massa de proteína:

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

$$13900 = X$$

$$X = 2,31 \cdot 10^{-20} \text{ g}$$

2) Determinação do número de moléculas de proteína no spot:

$$1 \text{ molécula} = 2,31 \cdot 10^{-20} \text{ g}$$

$$X = 5,10 \cdot 10^{-6} \text{ g}$$

$$X = 2,21 \cdot 10^{14} \text{ moléculas}$$

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

$$M = 5,80 \text{ mg g}^{-1} = 5800 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$$

$$5800 \text{ } \mu\text{g} - 1.106 \text{ } \mu\text{g}$$

$$X = 5,1 \text{ } \mu\text{g}$$

$$X = 0,02958 \text{ } \mu\text{g} = 2,96 \cdot 10^{-8} \text{ g de Ca}$$

$$40,08 \text{ g} = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ átomos}$$

$$2,96 \cdot 10^{-8} \text{ g} = X$$

$$X = 4,45 \cdot 10^{14} \text{ átomos de Ca}$$

4) Relação entre o número de átomos de Ca e moléculas de proteína

$$\frac{\text{No de átomos de Ca}}{\text{Moléc. de proteína}} = \frac{4,45 \cdot 10^{14}}{2,21 \cdot 10^{14}} = 2 \text{ átomos de Ca/ molécula de proteína}$$