

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

**CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE
MASSAS DE METALOPROTEÍNAS EM AMOSTRAS DE
TILÁPIA DO NILO**

BRUNA CAVECCI

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

Fevereiro – 2014

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

**CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE
MASSAS DE METALOPROTEÍNAS EM AMOSTRAS DE
TILÁPIA DO NILO**

BRUNA CAVECCI

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. Pedro de
Magalhães Padilha

BOTUCATU – SP

Fevereiro – 2014

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

C378c Cavecci, Bruna, 1983-
Caracterização por espectrometria de massas de metalo-
proteínas em amostras de tilápia do Nilo / Bruna Cavecci. -
Botucatu : [s.n.], 2014
xii, 60 f. : grafs., ils. color., fots. color., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu,
2014
Orientador: Pedro de Magalhães Padilha
Inclui bibliografia

1. Tilápia-do-Nilo. 2. Metaloproteínas. 3. Espectrome-
tria. I. Padilha, Pedro de Magalhães. II. Universidade Es-
tadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botu-
catu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III.
Título.

DEDICATÓRIA

***Ao meu Deus e Pai, Amigo Fiel, Consolador, que está comigo
em todo momento!***

***Meus pais (Claudio e Neide), se hoje sou o que sou é porque
vocês se dedicaram!***

Ao meu irmão (Matheus), meu parceiro de todas as horas!

***Aos meu Orientador (Pai Acadêmico), que sempre me
estimulou!***

A cada professor que passou por minha vida!

***Aos meus amigos e irmãos em Cristo de Botucatu e de tantos
outros lugares!***

A minha casa UNESP que aprendi a amar e representar!

Dedico

AGRADECIMENTOS

**Agradecimento em especial à FAPESP, Processo nº 2011/14902-0**

Agradeço a Deus, pela Vida, pelo Amor, pela Graça, Perdão e Misericórdia que me alcançam a cada dia!
Se estou viva hoje e podendo escrever essa dissertação é porque Ele me guardou e me guiou em cada momento da minha vida!

Agradeço aos meus pais, pessoas que me inspiram a cada dia, que foram e continuam sendo pessoas que me fazem cristã, humana, honesta, cidadã... Obrigada pelo amor, apoio e tudo mais que sempre fizeram por mim, desde que souberam que teriam mais uma integrante na família!

Agradeço ao meu irmão Matheus, um cara que sempre olhou pra mim e disse: “Você vai conseguir!”
Você é meu parceiro, você é tudo o que uma irmã gostaria de ter!

Ao meu Orientador, que sempre me apoiou e me inspirou.

A UNESP minha casa acadêmica, a FMVZ pela oportunidade de ser uma mestranda nesse programa, ao Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu que representa um dos locais onde existem pessoas que amo e respeito.

A todos do Laboratório AquaNutri, na pessoa da Prof^a. Dr^a Margarida e do Prof. Dr. Luis Edivaldo Pezzato.

Ao Laboratório de Bioquímica da FOB-USP Bauru, na pessoa da Prof^a. Dr^a. Marília Afonso Rabelo Buzalaf e da Bióloga e Ma. Aline Leite.

A cada amigo e colega de Laboratório (Paula Lima; Paula Martin; José; João; Camila; Felipe; Paulo Roldan; Cilene; Vânia; Mariana; Nubya; Carla – que tá lá em Brasília; Renato; Fábio e Mayra – a velha guarda), como esse trabalho iria existir sem a presença, conversas, amizades, confidências, risadas e tantas outras coisas que nos fazem uma equipe.

A cada amigo e irmão de Botucatu (não vou citar os nomes pra não cometer nenhum erro grave), minha família de Botucatu, ABU – Aliança Bíblica Universitária, vocês agregam valor!!!

Agradeço a cada profissional que me ajudou, Dr^a Helena, Fisio Felipe e a Psico Andreia!

É sempre ruim citar nomes, mas se você que está lendo não foi citado, você também faz parte de tudo isso!

HOMENAGEM AO ORIENTADOR

Agora vai PEDRO (já que o senhor sempre reclama que eu te chamo de “PROFESSOR”)...

Me lembro, até hoje do primeiro dia de aula, lá no ano de 2007, no segundo semestre, no período noturno às terças-feiras estávamos lá na central de aulas do IB para as Aulas de Química Analítica, aaaahhhhh como eram boas, me apaixonei pela disciplina, me apaixonei pela linda forma do professor, lá do Mato Grosso, falando da beleza da Química e de quanto ela era importante pra minha caminhada como Bióloga.

Hoje PEDRO, vejo o quanto suas aulas acrescentaram ao meu conhecimento, o quanto o seu profissionalismo (como meu orientador), caráter e paixão pelo que faz, estão a cada dia me fazendo ser uma profissional melhor e acreditar que quando trabalhamos com sinceridade, amor e seriedade há resultados e alegrias.

Obrigada por acreditar em mim, obrigada por ter sido meu orientador desde o meu primeiro ano de faculdade e ter me dado inúmeras oportunidades.

Como digo o senhor é meu PAI ACADÊMICO!

Obrigada por ter entendido o momento difícil que passei logo após o acidente.

“Entregue a sua vida para Deus; confie Nele, e ele Agirá.” (Salmos 37:5)

Deus é o nosso melhor amigo, confie Nele!

SUMÁRIO

PÁGINAS

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Considerações Iniciais e Justificativas.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Aquicultura e Tilápia do Nilo no Brasil.....	2
2.2. Proteínas.....	3
2.2.1. Proteínas e sua constituição.....	3
2.2.2. Estrutura Primária.....	4
2.2.3. Estrutura Secundária.....	4
2.2.4. Estrutura Terciária.....	5
2.2.5. Estrutura Quaternária.....	6
2.2.6. A Sequência de Aminoácidos de uma Proteína Determina sua Estrutura Tridimensional.....	6
2.3. Proteômica.....	7
2.4. Metalômica.....	7
2.5. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida 2D-PAGE.....	8
2.6. Preparo de amostra para a separação por 2D-PAGE.....	10
2.7. Revelação de proteínas em gel de poliacrilamida.....	12
2.8. Tratamento de imagens.....	12
2.9. Determinação da concentração protéica.....	13
2.9.1. Método de Biureto.....	13
2.9.2. Método de Lowry.....	14
2.9.3. Método de Bradford.....	14
3. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE METAIS.....	15
3.1. Fundamentos de Espectrometria de Absorção Atômica.....	15
3.2. Espectrometria de Absorção Atômica em Chama.....	18
3.3. Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite.....	20
4. DIGESTÃO TRÍPTICA.....	24
5. ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	25
5.1. ESI MS MS.....	26

6. REFERÊNCIAS.....	28
CAPÍTULO II	
Resumo.....	38
Abstract.....	39
1. Introdução.....	40
2. Parte Experimental.....	41
2.1.Alocação dos peixes e elaboração das dietas.....	41
2.2.Coleta das amostras.....	42
2.3.Preparação das amostras para eletroforese.....	42
2.4.Determinação da Concentração protéica.....	43
2.5.Separações Eletroforéticas.....	43
2.6.Mineralização dos spots para detecção dos elementos.....	44
2.7. Mapeamento de Ca, Fe e Zn por Espectrometria de Absorção Atômica com chama (FAAS).....	45
2.7.1. Soluções padrões para as curvas analíticas de Ca, Fe e Zn.....	45
2.8. Mapeamento de Cu e Mn por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS).....	46
2.8.1. Procedimentos Analíticos.....	46
2.8.2. Soluções padrões para as curvas analíticas de Cu e Mn.....	47
2.9. Digestão triptica dos spots proteicos para caracterização por ESI MS MS.....	47
2.10. Caracterização das proteínas por ESI MS MS.....	47
3. Resultados e Discussão.....	47
3.1.Determinação da concentração de proteínas totais nas amostras.....	47
3.2.Otimização das separações eletroforéticas.....	47
3.3.Spots proteicos.....	49
3.4.Caracterização dos spots proteicos por ESI MS MS.....	50
4. Conclusões.....	55
5. Agradecimentos.....	55
6. Referências	56
CAPÍTULO III	
IMPLICAÇÕES.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

2D-PAGE Eletroforese em Gel Poliacrilamida em duas dimensões

AAS Espectrometria de Absorção Atômica

CHAPS 3-[(3- cloroamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato

DNA ácido desoxirribonucleico

DTT 1,4-ditiotreitol

ESI Ionização por *Electrospray*

ESI MS MS Espectrometria de massas em sequência com ionização por electrospray

FAAS Espectrometria de Absorção Atômica com Chama

GFAAS Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização em Forno de Grafite

IEF Isoeletrofocalização

IEF PAGE Eletroforese com Focalização Isoelétrica

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

m/z Relação Massa Carga

MALDI Ionização por Desorção a Laser Assistida por Matriz

MALDI-TOF - MS Espectrometria de massas por tempo de voo com ionização por desorção a laser assistida por matriz

MM Massa Molar

MPA Ministério da Pesca e Aquicultura

pH Potencial de Hidrogênio

SDS Dodecil Sulfato de Sódio

spot Banda 2D de proteínas

TEMED N,N',N,N'-tetrametiletilenodiamina

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Principais substâncias utilizadas na solubilização de proteínas.....	12
Tabela 2. Razão N^*/N_0 e a dependência com a Temperatura e o comprimento de onda.....	17

CAPÍTULO II

Tabela 1. Parâmetro utilizado no ajuste do FAAS - SHIMADZU AA-6800, para o mapeamentos de Ca, Fe e Zn.....	45
Tabela 2. Programa de aquecimento utilizado na otimização das temperaturas de pirólise e atomização de cobre e manganês.....	46
Tabela 3. Análise de correlação entre os géis de músculo Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	48
Tabela 4. Massa molar (Mm), ponto isoelétrico (pI) e concentração de Cálcio, Cobre, Ferro, Manganês e Zinco nos spots proteicos obtidos por 2D-PAGE do tecido muscular de Tilápia.....	50
Tabela 5. Proteínas identificadas utilizando espectrometria de massas para amostras de tecido Muscular de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	51

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Produção da aquicultura comparada com demais culturas no Brasil.....	2
Figura 2. Estrutura geral de um aminoácido.....	3
Figura 3. Ligação peptídica.....	4
Figura 4. Exemplo de hélice α e a fita β	5
Figura 5. Exemplo de estrutura terciária de uma proteína.....	5
Figura 6. Exemplo de estrutura quaternária.....	6
Figura 7. Componentes da reação de polimerização do gel de poliacrilamida.....	10
Figura 8. Espectrômetro de Absorção Atômica em Chama e seus componentes.....	19
Figura 9. Representação do caminho da radiação eletromagnética.....	19
Figura 10. Chama do Espectrômetro de Absorção Atômica.....	20
Figura 11. Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite.....	21
Figura 12. Representação de corte de forno de grafite com aquecimento longitudinal VARIAN.....	21
Figura 13. A seta vermelha indica o forno de grafite de aquecimento longitudinal localizado no interior do eletrodo de grafite.....	22
Figura 14. Modelos de Forno de Grafite (nas laterais: tubos de grafite pirolíticos e ao centro: tubo de grafite com plataforma integrada).....	22
Figura 15. Etapa de secagem da amostra no programa de aquecimento para determinação de metais por GFAAS.....	23
Figura 16. Etapa de pirólise da amostra no programa de aquecimento para determinação de metais por GFAAS.....	23
Figura 17. Etapa de atomização da amostra no programa de aquecimento para determinação de metais por GFAAS.....	24
Figura 18. Etapas envolvidas no programa de aquecimento para atomização de um analito na espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS).....	24
Figura 19. Ilustração do processo de formação de íons numa fonte de <i>electrospray</i>	27

CAPÍTULO II

Figura 1. Gel de poliacrilamida 12,5% de músculo de Tilápia do Nilo com spots proteicos que foram identificados por ESI MS MS.....49

Capítulo – I

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Considerações Iniciais*

Nessa última década, a aquicultura mundial apresentou crescimento cinco vezes superior às atividades agrícolas tradicionais como a bovinocultura, a avicultura e a suinocultura. O aumento populacional mundial, e renda, a conscientização dos benefícios nutricionais trazidos pelo consumo de peixes, e o grande estoque nativo de peixes de água doce e marinhos, fundamentam o crescimento da demanda mundial e a ascensão da aquicultura [1].

Outra explicação a este fato foi apresentada por Farchimn [2], com as mudanças de hábitos alimentares e a procura por alimentos oriundos de animais que apresentassem maior teor proteico e baixos níveis de colesterol. Visando a vida mais saudável, buscase maior ingestão de fibras, diminuição do consumo de gordura saturada, e produtos que não contenham boa composição nutricional.

A tilápia do Nilo possui elevado valor protéico, baixos níveis de colesterol e a presença de ômega 3 [3]. Estima-se que aproximadamente 40% de todas as proteínas necessitam da presença de um íon metálico para realizar atividade biológica [4]. Embora os íons metálicos constituam pequena proporção do tecido corporal (4%), são essenciais como componentes estruturais e funcionais em processos vitais. No aspecto funcional atuam como catalisadores nos sistemas enzimáticos, e no aspecto estrutural como integrantes de compostos orgânicos do corpo, tal como o ferro na hemoglobina. 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 [5-8].

Os íons metálicos ligados às proteínas e metaloproteínas representam grande porção do número total de proteínas. Devido ao aumento na produção de peixes, pesquisadores que trabalham com aquicultura buscam desenvolver trabalhos relacionados ao comportamento, fisiologia, genética e nutrição desses animais [9]. Pensando nisso a proteômica e mais especificamente a metalômica são as vertentes usadas para desenvolver esses trabalhos, utilizando a eletroforese bidimensional, que auxilia na caracterização de proteínas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aquicultura e Tilápia do Nilo no Brasil

Atualmente o Brasil produz 1,25 milhões de toneladas de pescado, sendo 38% cultivados. A atividade gera um Produto Interno Bruto (PIB) pesqueiro de R\$ 5 bilhões, mobiliza 800 mil profissionais entre pescadores e aquicultores e, proporciona 3,5 milhões de empregos diretos e indiretos. O potencial brasileiro é enorme e pode se tornar um dos maiores produtores mundiais de pescado [10].

Segundo levantamento divulgado pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) em 2010, essa atividade apresentou significativo crescimento nos últimos anos, passando de 278 mil toneladas em 2003 para 415 mil em 2009, o que equivale a 35% de incremento em menos de uma década. Já a produção da piscicultura atingiu 60,2% de crescimento apenas entre 2007 e 2009. Isoladamente, a produção de tilápia aumentou 105% em apenas sete anos (2003-2009). Em conjunto, a aquicultura cresceu 43,8%, entre 2007 e 2009, tornando a produção de pescado a que mais cresceu no mercado nacional de carnes no período (Figura 1) [11].

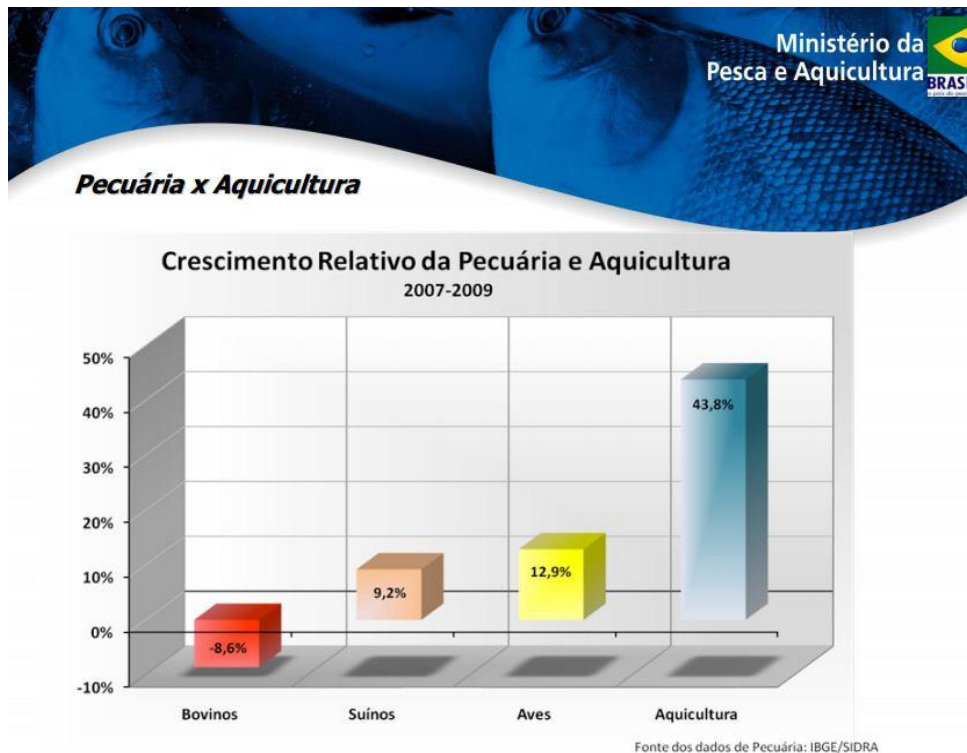


Figura 1. Produção da aquicultura comparada com a pecuária no Brasil [11].

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) se destaca, com produção que representava 18,4 % do total da aquicultura em 2000, passando para 38 % em 2004 [12]. As tilápias são metade da produção anual de peixes cultivados [13]. E na aquicultura mundial é a segunda espécie de maior importância [14].

2.2. Proteínas [15]

As proteínas são macromoléculas versáteis nos sistemas vivos e servem para funções essenciais em todos processos biológicos. Funcionam como catalisadores; transportam e armazenam outras moléculas, tais como oxigênio; fornecem apoio mecânico e proteção imunitária; geram movimento, transmitem impulsos nervosos, e controlam o crescimento e a diferenciação.

A estrutura das proteínas pode ser descrita em quatro níveis: a estrutura primária se refere a sequência de aminoácidos; a secundária é a conformação adotada por regiões locais da cadeia peptídica; a terciária descreve o enovelamento global da cadeia e a quaternária se refere à associação específica de várias cadeias peptídicas formando complexos com múltiplas subunidades.

2.2.1. Proteínas e sua constituição

As proteínas são construídas a partir de 20 aminoácidos.

As proteínas são polímeros lineares de aminoácidos, cada um destes é constituído de um átomo de carbono quaternário central ligado a um grupamento amina, uma carboxila, uma cadeia lateral diferenciada e um átomo de hidrogênio (Figura 2). Estes centros tetraédricos, com a exceção do da glicina, são quirais, existindo apenas o isômero L em proteínas naturais. As cadeias laterais destes 20 blocos de construção variam em tamanho e forma, e na presença de grupamentos funcionais.

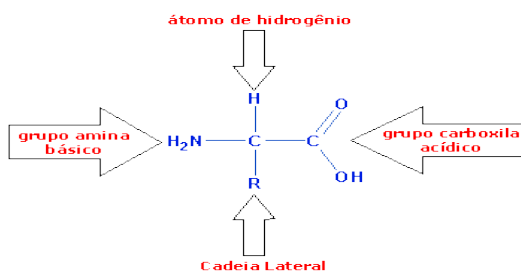


Figura 2. Estrutura geral de um aminoácido.(Extraído de <http://www.quimica.net/emiliano/fenilcetonuria.html>)

2.2.2. Estrutura Primária

Os aminoácidos em um peptídeo, são unidos por ligações amida formadas entre a carboxila de um aminoácido e a amina do seguinte. Esta união, chamada de ligação peptídica, tem propriedades importantes: a) é resistente a hidrólise, e assim as proteínas tem cinéticas notavelmente estáveis; b) o grupamento peptídico é plano, porque a ligação C-N tem considerável caráter de dupla ligação; c) cada ligação peptídica tem tanto um doador de ponte de hidrogênio (o grupamento NH) quanto um acceptor (o grupamento CO). As pontes de hidrogênio entre estes grupamentos da cadeia principal é característica distintiva da estrutura das proteínas (Figura 3). A ligação peptídica não tem carga elétrica, o que permite que as proteínas formem estruturas globulares firmemente acomodadas, com quantidades significativas do arcabouço imersas no interior da proteína. Como são polímeros lineares, as proteínas podem ser descritas como sequências de aminoácidos. Tais sequências são escritas do terminal amínico para o carboxílico.

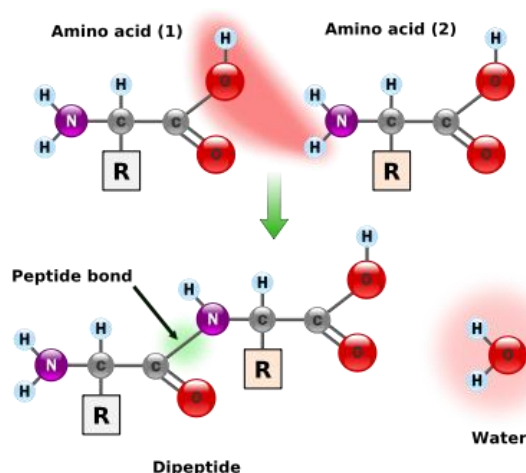


Figura 3. Ligação peptídica (Extraído de <http://pt.wikipedia.org/wiki/Amino%C3%A1cido>)

2.2.3. Estrutura Secundária

Dois elementos importantes da estrutura secundária são a hélice α e a fita β (Figura 4). Na hélice, a cadeia peptídica se retorce, formando um bastão firmemente compacto. Dentro da hélice, o grupamento CO de cada aminoácido forma pontes de hidrogênio com o NH a quatro monômeros adiante na cadeia peptídica. Na fita β , a cadeia é quase totalmente distendida. Duas ou mais fitas β conectadas por pontes de NH

2.2.5. Estrutura Quaternária

Proteínas constituídas de mais de uma cadeia peptídica apresentam estrutura quaternária; cada cadeia peptídica individual é chamada de uma subunidade. A estrutura quaternária pode ser bem simples, com duas subunidades idênticas, ou bem complexa, com dúzias de subunidades diferentes (Figura 6). Na maioria dos casos, as subunidades são mantidas juntas por interações covalentes.

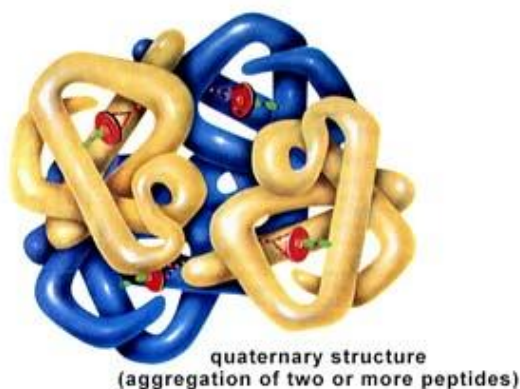


Figura 6. Exemplo de estrutura quaternária. (Extraído de http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2003/const_mi_croorg/proteinas.htm)

2.2.6. A Sequência de Aminoácidos de uma Proteína Determina sua Estrutura Tridimensional

A sequência de aminoácidos determina a estrutura tridimensional, e demais propriedades de uma proteína. Algumas proteínas podem ser completamente desnaturadas, e, no entanto, se renaturam com eficiência quando colocadas em condições em que sua forma enovelada for estável. A sequência de aminoácidos de uma proteína é determinada pela sequência de bases em uma molécula de ácido desoxirribonucléico (DNA). A informação unidimensional de sequência é estendida para o mundo tridimensional pela capacidade de as proteínas se enovelarem espontaneamente. O enovelamento de proteínas é um processo muito cooperativo; não se acumulam intermediários entre as formas desnaturada e enovelada.

A versatilidade das proteínas é ainda mais acentuada por modificações covalentes. Tais modificações podem incorporar grupamentos funcionais que não estão presentes nos 20 aminoácidos. Outras modificações são importantes para a regulação da

atividade de proteínas. Através de sua estabilidade estrutural, diversidade e reatividade química, as proteínas tornam possível a maior parte dos processos importantes associados à vida.

2.3. *Proteômica*

O termo proteoma foi cunhado por *Wilkins* e *Williams*, em 1993, para descrever o complemento proteico total do genoma [16].

O genoma de um organismo é essencialmente estático e o DNA, do qual pode ser extraído em princípios 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 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 se obter mais informação do organismo estudando-se o proteoma [17].

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 a estrutura tridimensional que a mesma possui, interferindo decisivamente no papel que ela realiza [17,18]. A análise de proteomas possui várias aplicações e a demanda de trabalhos nessa área tem crescido nos últimos anos [17].

2.4. *Metalômica*

Como definido, a proteômica envolve o estudo das propriedades das proteínas, tais como o nível de expressão, modificações pós-traducionais e interações, em ampla escala, de modo a obter uma visão global dos processos celulares [16,17].

Já a metalômica é campo de pesquisa que deve estar relacionada com a genômica e a proteômica, pois a síntese e funções metabólicas dos genes e proteínas não ocorrem sem a presença de íons metálicos ou metaloenzimas, que são metaloproteínas que atuam como catalisadores biológicos na regulação das reações biológicas e funções fisiológicas em células e órgãos [18].

A metalômica tem como objetivos a verificação da distribuição das espécies metálicas e metalóides, bem como a elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais

das biomoléculas que contenham íons metálicos em suas estruturas, tais como as metaloproteínas e as proteínas ligadas a metais [19]. Na metalômica, são definidos como “metalomas” os íons metálicos ou espécies metalóides presentes em um sistema biológico (células, tecidos, fluidos ou organismos), na forma livre ou complexado [20].

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 [18]. O estudo do metaloma pode fornecer informações tais como: (i) elemento (espécie metálica ou metalóide) distribuído entre os compartimentos celulares de determinado tipo de célula; (ii) seu meio de coordenação (qual biomolécula está incorporada ou a qual bioligante está complexada); (iii) as concentrações das espécies metálicas individuais presentes e (iv) a estrutura da biomolécula [20, 21].

2.5. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (2D-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida, técnica eficaz, por metodologia capaz de fracionar mais proteínas simultaneamente do que a mesma. Esta técnica possui ótima resolução, podendo ser empregada em caracterização de sistemas biológicos e seleção específicas de pontos (*spots*) proteicos 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 [22].

Na separação das proteínas, alguns fatores influenciam diretamente na velocidade de migração ao longo da corrida eletroforética, como por exemplo, a massa molar, carga e conformação. Nesta separação, o sistema de 2D-PAGE mostra-se 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 a propriedade massa molar (MM) das proteínas em condição denaturante, 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 [23].

Para compreender como ocorre a separação das proteínas por 2D-PAGE, faz-se necessário esclarecer que na eletroforese com focalização isoeletrica (IEF PAGE) 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 de rede 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 pI, quando não mais migraram [24-26].

Na eletroforese em condições denaturantes (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 (MM). Esta normalização se dá pelo aumento das cargas negativas nas proteínas, provenientes da transferência do SDS e pela presença de agentes redutores (DTT), os quais rompem ligações de sulfeto na estrutura proteica facilitando o acesso do SDS e conferindo forma similar ao conjunto de proteínas [23, 28]. Portanto, nota-se que a 2D-PAGE é a combinação da eletroforese IEF PAGE e SDS PAGE.

A poliacrilamida é uma matriz de gel muito comum nestes experimentos, pois possui características importantes como, por exemplo, ser material quimicamente inerte, transparente e estável em 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 [23]. A Figura 7 apresenta cada composto químico utilizado e a reação de copolimerização [29].

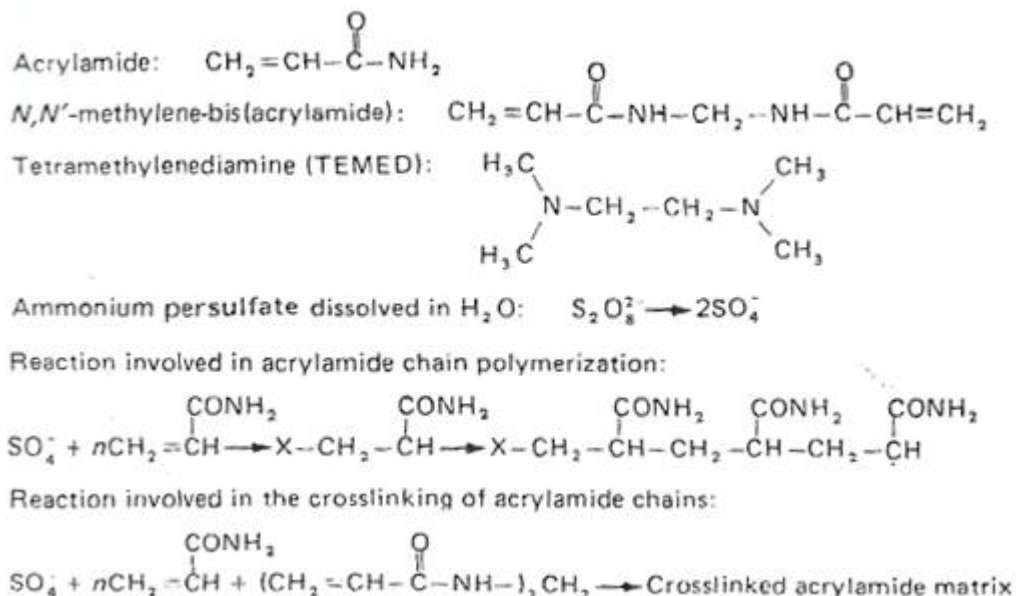


Figura 7. Componentes da reação de polimerização do gel de poliacrilamida.

[29]

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

2.6. Preparo de amostra para a separação por 2D-PAGE

As proteínas da amostra precisam ser desnaturadas, desagregadas, reduzidas e solubilizadas para que atinjam completo rompimento das interações moleculares de modo a garantir que cada “spot” presente no gel represente possivelmente moléculas de uma mesma proteína. Portanto, o preparo de amostra apropriado é necessário para a obtenção de boa resolução na separação das proteínas por 2D PAGE [28, 30]. Um procedimento deverá ser determinado para cada tipo de amostra, em função da grande diversidade de tipos de proteínas na amostra e origens [24].

Para que as proteínas intracelulares sejam analisadas, inicialmente devem ser rompidas as células do material biológico. O rompimento celular pode ser de três tipos, do tipo mecânico (maceração ou sonificação), químico (na presença de detergentes) e biológico (enzimático) [24]. Neste modo 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 [28, 30].

Alguns compostos interferentes, tais como proteases, sais, lipídios, ácidos nucleicos, polissacarídeos, pigmentos fenólicos e/ou proteínas muito abundantes, após ou durante o rompimento celular devem ser removidos ou inativados [28, 30]. 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 por prejudicarem o processo eletroforético em si [30].

As proteases devem 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 fenilmetilsulfonilflúor e o fluoreto de 4-(2-amino-etil)-benzenossulfonato [24, 28].

Os surfactantes e lipídios, considerados também interferentes na separação eletroforética, são separados seletivamente por meio do procedimento de precipitação das proteínas. A precipitação com solução de sulfato de amônio em metanol, com acetona ou com solução de TCA em acetona, geralmente são os métodos mais utilizados [24].

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 solubilizados, mantendo as propriedades de carga [28]. Portanto, a solubilização das proteínas deve ser conduzida em um tampão contendo surfactantes, agentes caotrópicos e redutores, como também os inibidores de protease.

A Tabela 1 apresenta os principais reagentes utilizados nesta finalidade com as respectivas funções [28, 30].

Tabela 1. Principais substâncias utilizadas na solubilização de proteínas [28].

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	Uréia e tiouréia	Quebrar as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Evitar agregações indesejáveis e formação de estrutura secundária.

2.7. Revelação de proteínas em gel de poliacrilamida

A revelação de proteínas em géis é frequentemente feita à base de coomassie blue. 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 [18, 31].

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, elevada solubilidade em géis de poliacrilamida e agarose e estabilidade em forma sólida. A coloração azul é o resultado da reação entre a função sulfona de coomassie com a função amina das proteínas [32, 33].

2.8. 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 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 [34].

O principal problema desses estudos comparativos é a alta variação que existe entre os géis. Isso ocorre devido a 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 um dos fatores mais relevantes é a polimerização do gel. No entanto, inúmeros fatores podem influenciar nesta etapa: a temperatura em que ocorre a polimerização, a pureza e 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 atenção, paciência e, essencialmente cuidado experimental [35, 37].

Nos estudos de Eravci *et al.* [38] e Choe *et al.* [34] as análises demonstram que variações quanto à expressão de proteínas no gel somente são consideradas relevantes se alcançarem diferenças da ordem de 100% (2 vezes) ou superiores.

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 possa se garantir que, realmente, haja significativa variação entre as expressões de proteínas no gel [32-37]. Portanto, devem ser tomados cuidados adicionais para realizar confiável análise comparativa, como por exemplo, uniformidade da densidade de fundo no gel, a qual deve ser baixa em relação à densidade dos spots.

2.9. Determinação da concentração proteica

Muitos métodos, ao longo dos anos, têm sido propostos para a determinação de proteínas totais, mas não existe uma metodologia considerada de uso universal para todos os meios. Os métodos mais utilizados são: Biureto [39], Lowry [40] e Bradford [41]. A seguir será descrito o princípio de cada um dos métodos citados.

2.9.1. Método de Biureto

As origens do método do biureto podem ser traçadas desde a proposta inicial de Autenrieth, em 1915; posteriormente diversos autores propuseram modificações do mesmo, sendo, atualmente, a proposta metodológica de Gornall [39] mais utilizada. O

método se baseia na reação do reativo do biureto, que é constituído de uma mistura de cobre e hidróxido de sódio com um complexante que estabiliza o cobre em solução, sendo o tartarato de sódio o recomendado por Gornall [39]. O cobre, em meio alcalino, reage com proteínas formando um complexo quadrado planar com a ligação peptídica. O produto de reação apresenta duas bandas de absorção, uma em 270 nm e outra em 540 nm. Apesar da banda na região de 270 nm aumentar em seis vezes a sensibilidade do método do biureto [42], a banda na região de 540 nm é a mais utilizada para fins analíticos, porque diversas substâncias, normalmente presentes na maioria dos meios analisados, absorvem na região de 270 nm causando muita interferência no método.

2.9.2. Método de Lowry

O método que atualmente conhecemos como de Lowry [40], para a determinação de proteínas totais, foi originalmente proposto por Wu [43], em 1922, sendo esta a metodologia mais utilizada para a determinação de proteínas. O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto com absorção máxima em 750 nm. Chou e Goldstein [44] e Legler [45] estudaram extensivamente o mecanismo de redução do reagente de Folin-Ciocalteu por proteínas, peptídeos ou aminoácidos. Estes autores [44,45] sugerem que esta redução ocorra diretamente através das cadeias laterais de alguns aminoácidos (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina), que contribuem com quatro elétrons, ou através da retirada de dois elétrons de cada unidade tetrapeptídica dos peptídeos e proteínas, que é facilitada pela formação do quelato entre o cobre (II) e peptídeos/proteínas.

2.9.3. Método de Bradford

O método de Bradford [41] é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250. Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o

deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm [46].

3. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE METAIS

3.1. Fundamentos de Espectrometria de Absorção Atômica [47 – 56]

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 é quantidade matemática que pode ser representado por:

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

Beer”, onde, I_0 a radiação inicial emitida em um determinado comprimento de onda e I a radiação final emitida pelo decaimento.

A espectrometria de absorção atômica (AAS) é utilizada para determinação quantitativa tanto de elementos metálicos e semimetálicos quanto de alguns elementos não metálicos. É aplicada a grande variedade de amostras, tais como, materiais biológicos (tecidos e fluídos), ambientais (águas, solos e sedimentos), alimentares, geológicos e tecnológicos, entre outros. Dentre os tipos de atomizadores mais usados em AAS estão a chama e o forno de grafite. A espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS - 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 em forno de grafite (GFAAS - Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry) é utilizada para determinações de baixas concentrações (µg/L). Assim a GFAAS apresenta maior sensibilidade que o FAAS devido a 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, enquanto que o 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.

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.

Quando os átomos se encontram no estado gasoso fundamental podem absorver energia sofrendo alterações e passando para 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 ($c=2,99792 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$) e (λ) é o comprimento de onda.

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).

Como todos os elementos possuem estrutura eletrônica única e o comprimento de onda da luz emitida é propriedade individual de cada elemento, pode-se determinar qualitativamente qual é o elemento, como “impressão digital do elemento”, sendo assim uma técnica que apresenta alta seletividade e relativamente poucas interferências.

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

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

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 ($k=1,38066 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta.

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

Com isso, chega-se á lei de Lambert-Beer, relacionando a absorbância (A) ou

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	$4,44 \cdot 10^{-4}$	$7,24 \cdot 10^{-3}$	$2,98 \cdot 10^{-2}$

densidade óptica com o número de átomos no estado fundamental (N).

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

Onde, $\Phi_0(\lambda)$ é a potência radiante emitida, $\Phi_{tr}(\lambda)$ 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 $k(\lambda)$ é o coeficiente de absorção atômica espectral.

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.

3.2. *Espectrometria de Absorção Atômica em Chama*

Na espectrometria de absorção atômica em chama, o sistema de atomização consiste em um queimador no qual a mistura gasosa, normalmente ar/acetileno, sofre ignição gerando a chama que é responsável pela geração de átomos gasosos no estado fundamental que irão absorver a radiação de comprimento de onda característico proveniente da fonte de radiação dada pela lâmpada de catodo oco e, conseqüentemente, a concentração do elemento de interesse será determinada.

No nebulizador, operando pela ação de fluxo de gás comprimido, a solução da amostra é aspirada do seu recipiente e nebulizada na forma aerossol (gotículas dispersas em gás) por uma pérola de vidro em uma câmara de nebulização. Essa névoa formada é direcionada ao queimador por arraste dado pela mistura dos gases combustível e oxidante. No ambiente da chama ocorre a evaporação do solvente das gotículas, etapa denominada dessolvatação, produzindo em seguida, um aerossol seco (suspensão de partículas sólidas ou fundidas do soluto). Sob elevadas temperaturas da chama, ocorre a volatilização destas partículas e logo em seguida, a atomização, isto é, a conversão da espécie volatilizada em átomos livres. Então, os átomos da nuvem atômica que se encontram no estado fundamental estão aptos para absorverem a energia dada pela fonte de radiação em um comprimento de onda específico e assim, gerarem íons ou moléculas no estado excitado.

Assim, por diferença do que está sendo emitido pela lâmpada de catodo oco e do que está sendo captado dessa radiação pela fotocélula do detector tem-se o quanto da radiação foi absorvida pela nuvem atômica e, portanto o equipamento, após amplificar o sinal e transformar o sinal térmico em sinal elétrico, fornece o resultado em absorbância e a concentração, em mg L^{-1} . No entanto, salienta-se que isso somente é possível se já tiver sido feita uma curva analítica, pois o equipamento é um comparador.

A Figura 8 mostra o esquema de um espectrômetro de absorção atômica com chama e seus principais componentes, a Figura 9 mostra a representação do feixe de radiação eletromagnética da fonte até o sistema detector e a Figura 10 mostra no detalhe, a chama do espectrômetro.

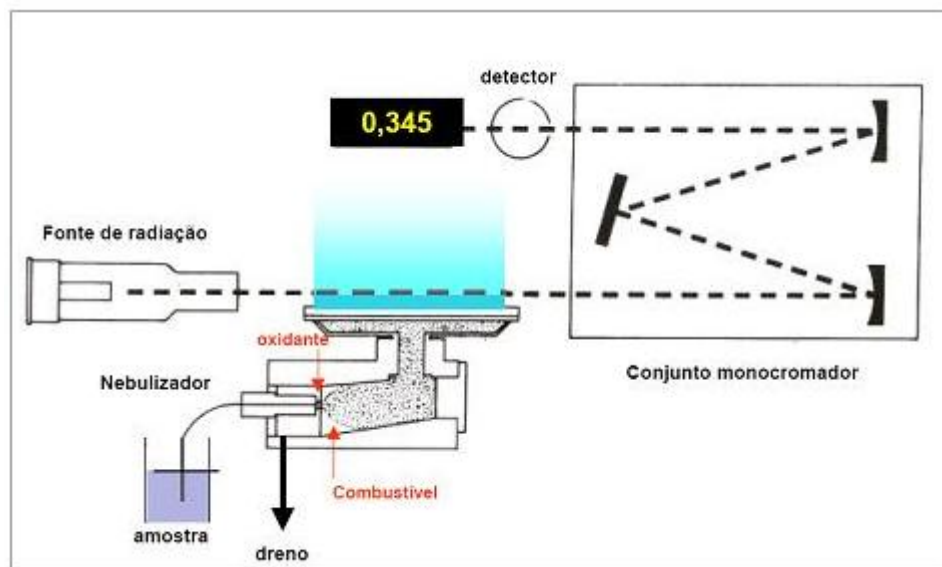


Figura 8. Espectrômetro de Absorção Atômica em Chama e seus componentes. (Fonte: Krug, F.J. / CENA – USP)

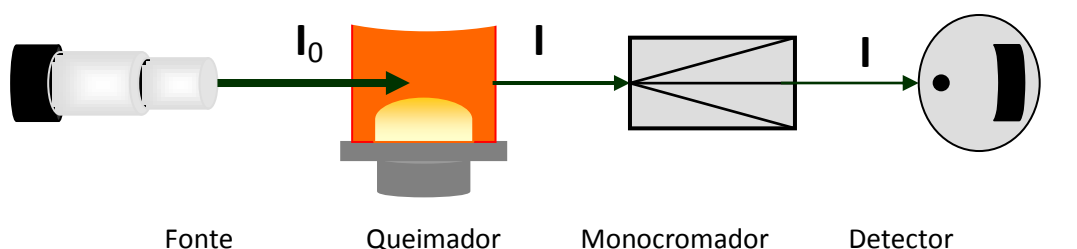


Figura 9. Representação do caminho da radiação eletromagnética. (Fonte: Krug, F.J. / CENA – USP)

Pela ilustração acima, pode-se observar a radiação que chega até o sistema detector com diminuição de intensidade I e a quantidade de radiação absorvida pelos átomos do analito na nuvem atômica é determinada pela comparação entre os valores de I e I_0 . A diferença de intensidade entre I e I_0 corresponde à concentração do analito dentro da amostra.



Figura 10. Chama do Espectrômetro de Absorção Atômica. (Foto SALEH, M. A. D.)

A chama tem a finalidade de transformar íons e moléculas em átomos no estado fundamental. O tipo de chama mais utilizado em AAS é a mistura ar/acetileno, numa proporção relativamente elevada de oxidante em relação ao combustível (chama azul).

3.3. Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite

O conceito de atomização eletrotérmica foi introduzido por L'vov em 1959, tornando-se conhecida mundialmente a partir de 1961. Neste trabalho, a amostra era depositada na superfície de um eletrodo móvel de grafite e em seguida, introduzida em um tubo de grafite revestido com uma folha de tântalo, o qual era aquecido eletricamente. Este sistema possibilitava a atomização da amostra numa única etapa, fornecendo uma nuvem atômica mais concentrada e, dessa maneira, uma melhor sensibilidade era alcançada, com menor consumo da amostra.

A técnica de espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS), apesar de ser geralmente monoelementar, é adequada para a determinação de baixas concentrações de metais e semi-metals. Esta técnica apresenta alta sensibilidade, uma vez que a alíquota da amostra colocada dentro de tubo de grafite (no forno) é atomizada em um curto período de tempo, sendo o tempo de residência média dos átomos no caminho óptico de aproximadamente um segundo (Figuras 11, 12, 13 e 14).

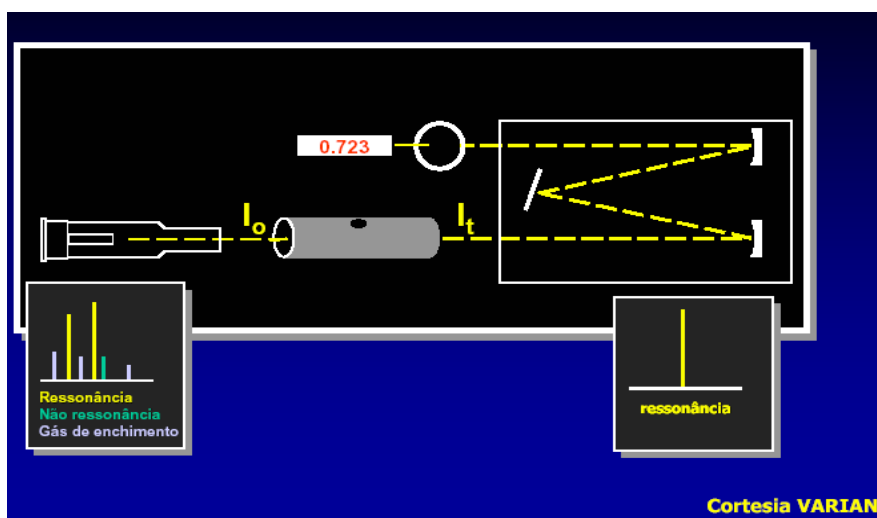


Figura 11. Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite.

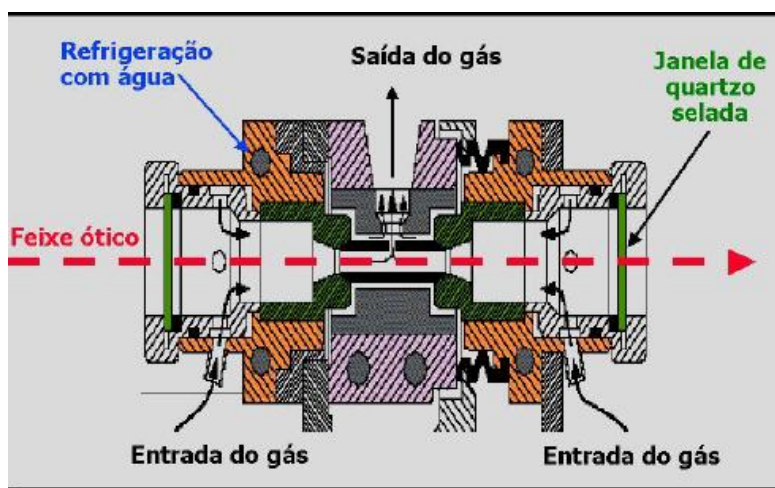


Figura 12. Representação de corte de forno de grafite com aquecimento longitudinal (Cortesia VARIAN).

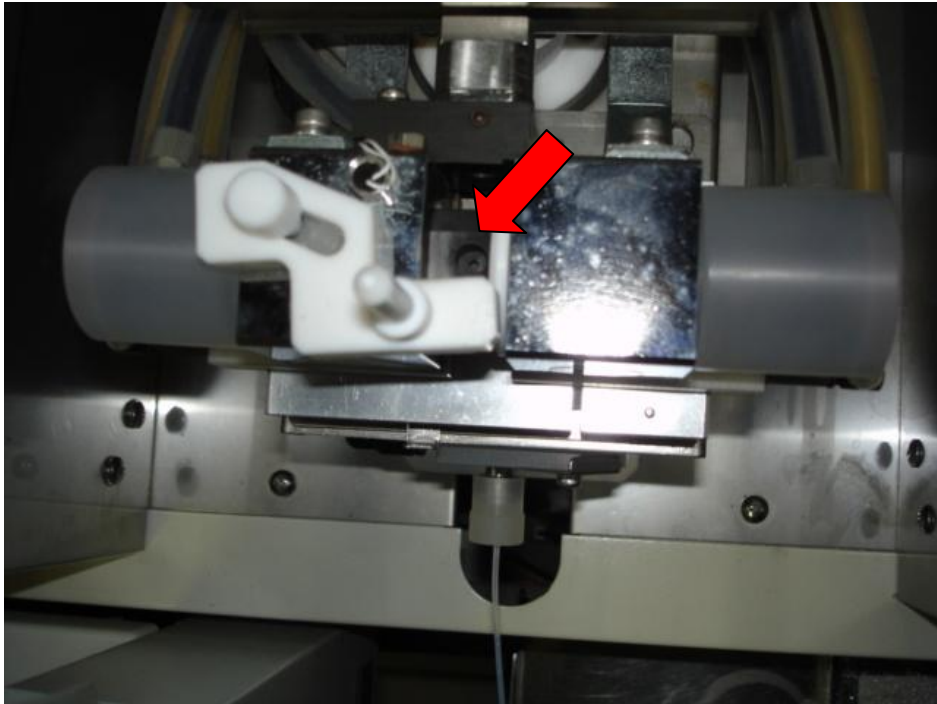


Figura 13. A seta vermelha indica o forno de grafite de aquecimento longitudinal localizado no interior do eletrodo de grafite. (Foto SALEH, M. A. D.)



Figura 14. Modelos de Forno de Grafite (nas laterais: tubos de grafite pirolíticos e ao centro: tubo de grafite com plataforma integrada). Foto SALEH, M. A. D.

Além disso, a técnica apresenta boa seletividade, requer pequenos volumes de amostra e possui limites de detecção, para a maioria dos elementos, em concentrações da ordem de ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$.

Na atomização eletrotérmica em forno de grafite, o solvente, ácido ou a mistura azeotrópica da amostra é evaporada em temperaturas da ordem de $200\text{-}250^\circ\text{C}$, etapa denominada de secagem (Figura 15).

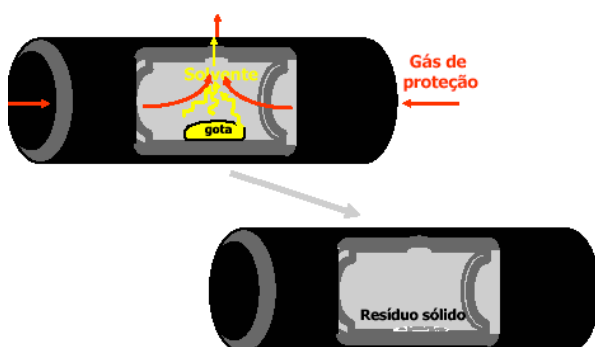


Figura 15. Etapa de secagem da amostra no programa de aquecimento para determinação de metais por GFAAS. (VARIAN)

Após a etapa de secagem, a matéria orgânica e outros concomitantes da amostra são incinerados em temperaturas da ordem de $450\text{-}1600^\circ\text{C}$, separando assim o analito (metal, semi-metal) dos outros componentes da matriz sólida. Esta etapa do processo é denominada de pirólise (Figura 16).

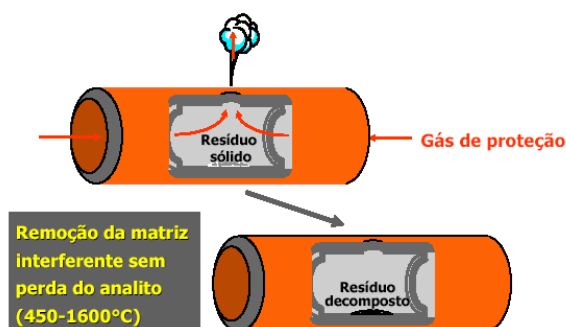


Figura 16. Etapa de pirólise da amostra no programa de aquecimento para determinação de metais por GFAAS. (VARIAN)

Após a etapa de pirólise, a corrente elétrica responsável pelo aquecimento do tubo de grafite aumenta rapidamente até uma amperagem que eleve a temperatura na ordem 2000°C a 3.000°C , provocando a formação de uma nuvem atômica dos analitos

metálicos. Esta etapa é denominada de atomização (Figura 17) e ocorre em um período de milissegundos até segundos. Nesta etapa, a medida de absorção da radiação é feita na região imediatamente acima da superfície do tubo.

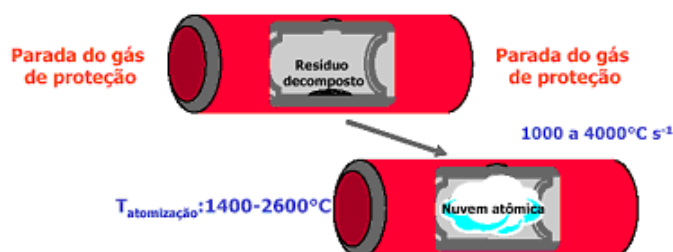


Figura 17. Etapa de atomização da amostra no programa de aquecimento para determinação de metais por GFAAS. (VARIAN)

Após a medida da absorbância do analito é feita então, uma etapa de limpeza, para remoção de traços do analito metálico evitando assim, o chamado “efeito de memória”. As etapas de secagem, pirólise e limpeza são assistidas por uma corrente de Argônio (fluxo de $\cong 1 \text{ L min}^{-1}$) para remover os componentes da matriz volatilizados em cada etapa. As quatro etapas envolvidas no processo de atomização para determinação de um analito por GFAAS estão sumarizadas no gráfico da Figura 18.

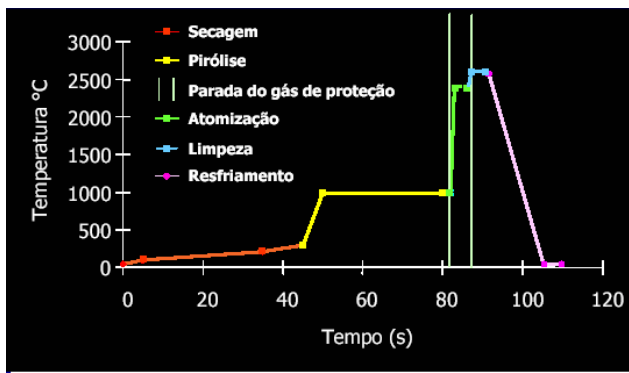


Figura 18. Etapas envolvidas no programa de aquecimento para atomização de um analito na espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS). (VARIAN)

4. DIGESTÃO TRÍPTICA

A digestão proteolítica é etapa crítica no seqüenciamento 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 custo de produção relativamente baixo, com o mesmo potencial de outras enzimas utilizadas, por possuir 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 [57].

A tripsina cliva as ligações peptídicas de proteínas após os grupos carbonila 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 [57, 58].

Existem dois tipos de digestão proteolítica: 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 [59].

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 relação direta entre as observações feitas pelos experimentos eletroforéticos e os peptídeos digeridos [58, 59]. Para a análise por espectrometria de massas, a mistura de peptídeos obtida pela digestão triptica é misturada com solução de matriz. Esta matriz é utilizada para proteger os peptídeos de uma possível fragmentação, causada pela incidência direta do feixe do laser [59].

5. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas tem se tornado 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 [60, 61].

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 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 desorção a laser assistida por matriz) e a ESI (ionização por electrospray) e os tipos básicos de analisadores de massas são o *ion trap* (IT), o quadrupolo (Q) e o tempo de voo (TOF) [62].

Na identificação de proteínas, dois diferentes métodos de ionização da amostra são comumente empregados. A MALDI-TOF MS (Espectrometria de massas por tempo de voo com ionização por desorção a laser assistida por matriz) é empregada na obtenção da “impressão digital” (*fingerprint*) de peptídeos e proteínas e ESI MS MS (Espectrometria de massas em sequência com ionização por electrospray), é utilizada na elucidação da sequência peptídica e identificação da proteína correspondente [62, 63].

5.1. ESI MS MS

Desde seu surgimento, a ESI MS MS tornou-se uma das técnicas analíticas mais poderosas e amplamente utilizadas. Dentre as vantagens da ESI MS 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 electrospray pode ser descrito com relativa simplicidade. A produção de íons 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 velocidade de fluxo da ordem de 1 a 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ 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 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. Pode-se presumir que a ESI envolve apenas o rompimento gradual de interações não covalentes, principalmente a remoção de moléculas de solventes [65-67]. A Figura 19 ilustra o processo que acontece em uma fonte ESI.

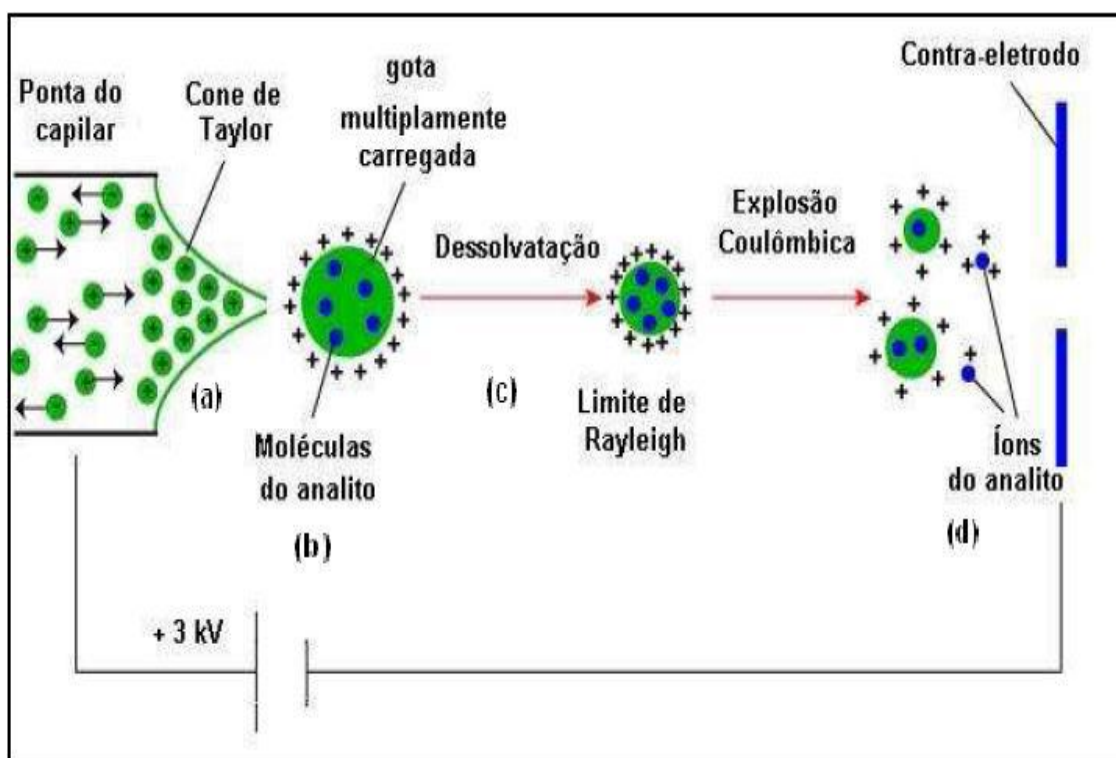


Figura 19. Ilustração do processo de formação de íons numa fonte de *electrospray* [64].

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 [61].

6. REFERÊNCIAS

- [1]. BORGHETTI, N.R.B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R. **Aquicultura**: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. Curitiba: Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais, 2003.
- [2]. FARCHIMN, G. **Inspección veterinária de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1969 p.630.
- [3]. SIMÕES, M. R.; RIBEIRO, C. F. A.; RIBEIRO, S. C. A.; PARK, K.; MURR, F.E.X. Composição físico-química, microbiológica e rendimento do filé de tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n. 3, p. 608-613, 2007.
- [4]. AMORIM, M.I.M.; MERGLER, D.; BAHIA, M.O.; DUBEAU, H.; MIRANDA, D.C.; LEBEL, J.; BURBANO, R.R.; LUCOTTE, M. Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. **An. Acad. Bras. Ci.**, v. 72, n. 4, p. 497-507, 2000.
- [5]. 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, 2007.
- [6]. SYNTAYEHU, A.; MATHIES, E.; MEYER-BURFDORFF, K.H., GUNTHER, K.D. Apparent digestibilities and growth experiments with tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed soybean, Cotton seed meal and sunflower seed meal. **J. Appl. Ichth**, v. 12, p. 125-130, 1996.
- [7]. 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. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, p. 1235, 2007.
- [8]. 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. **Sens. Instrum. Food Qual. Saf.**, v. 2, p. 279, 2008.

- [9]. SA, M.V.C.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; PADILHA, P.M. Relative bioavailability of zinc in supplemental inorganic and organic sources for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquacult Nutri.**, v. 11, p. 273-281, 2005.
- [10]. BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Participação da aquicultura no setor pesqueiro nacional.** Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/aquiculturampa/informacoes/producao>>. Acesso em: 20 dez. 2012.
- [11]. BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico do Ministério da Pesca e Aquicultura**, Brasília; 2012.
- [12]. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Estatística de pesca de 2004:** Grandes regiões e unidades de confederação. Brasília: IBAMA, 2005 p.136.
- [13]. LOVSHIN, L.L.; CYRINO, J.E.P. Status of commercial fresh water fish culture in Brazil. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 1998, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: CBNA, 1998 p. 1-20.
- [14]. ALCESTE, C.; JORY, D.E. Análisis de las tendencias actuales en la comercialización de tilapia en los Estados Unidos de Norteamérica y la Unión Europea. In: CONGRESSO SULAMERICANO DE AQUICULTURA, 1998, Recife. **Anais...** Recife: SIMBRAq, 1998 p. 349-364.
- [15]. BERG, J.M.; TYMOCKZO, J.L.; STYER, L. **Bioquímica** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara e Koogan, 2012.
- [16]. KAZMI, S.; KRULL, I.S. Proteomics and the current state of protein separations science. Part one. **Pharma Gennom.**, v. 2, p. 14-29, 2001.
- [17]. BELIZARIO, J.E. Proteoma: o desafio do século 21. **Ciênc. Hoje**, v. 27, n. 162, 78-81, 2000.
- [18]. 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.
- [19]. 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. **Quím. Nova**, v. 35, p. 493-498, 2012.

- [20]. BLACKSTOCK, W.P.; WEIR, M.P. Proteomics: quantitative and physical mapping cellular proteins. **Trends Biotechnol.**, v. 17, p. 121-127, 1999.
- [21]. 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.
- [22]. 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. **J. Proteom.**, v. 73, p. 1433-1440, 2010.
- [23]. SILVA, J.G. **Eletroforese de proteínas: guia teórico-prático**. Rio de Janeiro: Interciência, 2001.
- [24]. BERKLMAN, T.; STENSTEDT, T. **2-D Eletrophoresis using immobilized pH gradients: principles and methods**. Uppsala: Amersham Biosciences, 1998.
- [25]. MELVIN, M. **Electrophoresis**. London: John Wiley & Sons, 1987.
- [26]. COPELAND, R.A. **Methods for Protein Analysis**. New York: Chapman & Hall, 1994.
- [27]. GARCIA, J.S.; MAGALHÃES, C.S.; ARRUDA, M.A.Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. **Talanta**, v. 69, p. 1-15, 2006.
- [28]. GORG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, p. 3665-3685, 2004.
- [29]. DUNBAR, BONNIE S. **Two-dimensional electrophoresis and immunological techniques**. New York: Plenum Press. p.15, 1987
- [30]. MAGALHÃES, C.S.; GARCIA, J.S.; LOPES, A.S.; FIGUEREIDO, E.C.; ARRUDA, M. A. Z. Strategies for sample preparation focusing on biomolecules determination/characterization. In: ARRUDA, M.A.Z. **Trends in sample preparation**. New York: Nova Science Publishers, 2007. Cap. 9.
- [31]. 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.
- [32]. 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.

- [33]. ROCHA, T.L.; COSTA, P.H.A.; MAGALHÃES, J.C.C.; EVARISTO, R.G.S.; VASCONCELOS, E.A.R.; COUTINHO, M.V.; PAES, N.S.; SILVA, M.C.M.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. **Eletroforese bidimensional e análise de proteomas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 12p. (Comunicado Técnico, 136). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CENARGEN/26688/1/cot136.pdf>>. Acesso em 22 de nov. 2013.
- [34]. 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.
- [35]. GE HEALTHCARE Bio-Science AB **Manual do usuário - 11-0034-38, ImageMaster 2D Platinum 7.0 Edition AA**. Uppsala, 2007.
- [36]. 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.
- [37]. 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.
- [38]. 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.
- [39]. GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. J. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.**, v. 177, p. 751, 1949.
- [40]. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- [41]. BRADFORD, M.M.; Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

- [42]. ITZHAKI, R.F.; GILL, D.M. A Micro-biuret method for estimating proteins. **Anal. Biochem.**, v. 9, p. 401-410, 1964.
- [43]. WU, H. A New Colorimetric method for the determination of plasma proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 51, p. 33-39, 1922.
- [44]. CHOU, S.C.; GOLDSTEIN, A.; Chromogenic groupings in the Lowry protein determination. **Biochem. J.**, v. 75, p. 109-115, 1960.
- [45]. LEGLER, G.; MÜLLER-PLATZ, C.M.; MENTGES-HETTKAMP, M.; PFLIEGER, G.; JÜLICH, E. On the chemical basis of the Lowry protein determination **Anal. Biochem.**, v. 150, p. 278-287, 1985.
- [46]. COMPTON, S.J.; JONES, C.G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Anal. Biochem.**, v. 151, p. 369-374, 1985.
- [47]. WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic absorption spectrometry**. 3. ed. Weinheim: VCH, 1999. 941 p.
- [48]. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Principles of instrumental analysis**. 5. ed. New York: Saunders College, 1998. 848 p.
- [49]. KRUG, F.J.; NÓBREGA, J.A.; OLIVEIRA, P.V. Espectrometria de Absorção Atômica – Parte 1 – Fundamentos e Atomização com Chama. In: ESCOLA SUPERIOR DE AQUICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”. **Disciplina de Pós-Graduação Espectrometria de Absorção Atômica**. Piracicaba: ESALQ, 2004. 40 p. Apostila.
- [50]. RICHARD, D.B.; JACK, D.K. **Concepts, Instrumentation and techniques in atomic absorption spectrometry**. Norwalk, USA: The Perkin Elmer Corporation, 1993.
- [51]. BUTCHER, D.J.; SNEDDON, J. **A practical guide to graphite furnace atomic absorption spectrometry**. New York: John Wiley & Sons, 1998. 250 p.
- [52]. JACKSON, K.W. **Eletrothermal atomization for analytical atomic spectrometry**. Chichester: John Wiley, 1999. 470 p.
- [53]. PERKIN ELIMER. **Recommended conditions for THGA furnaces**. Uberlinguer, 1991.
- [54]. RADZIUK, B.; ROMANOVA, N.; THOMASSEN, Y. Evaluation of internal standardization in eletrothermal atomic absorption spectrometry. **Anal. Commun.**, v. 36, n. 1, p. 13-16, 1999.

- [55]. VOLYNSKY, A.B. Terminology for the modification of graphite tubes with high-melting carbides used in electrothermal atomic absorption spectrometry, **Spectrochim. Acta Part B: Atom Spectroscop.**, v. 50, n. 11, p. 1417-1419, 1995.
- [56]. CURIE, L.A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). **Anal. Chim. Acta**, v. 391, n. 2, p. 105-126, 1999.
- [57]. BERANOVA-GIORGIANNI, S. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. **Trends Anal. Chem.**, v. 22, n 5, p. 273-281, 2003.
- [58]. NAGELE, E.; MARTIN, V.; HORTH, P.; VAD, C. 2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures. **Expert Rev. Proteom.**, v. 1, n. 1, p. 38-46, 2004.
- [59]. DELAHUNTY, C.; YATES, J. R. Protein identification using 2D-LC-MS/MS. **Methods**, v. 35, p. 248-255, 2005.
- [60]. 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. **J. Proteome Res.**, v. 7, p. 5017-5027, 2008.
- [61]. PICARIELLO, G.; FERRANTI, P.; MAMONE, G.; ROEPSTORFF P.; 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.
- [62]. GIRON, P.; DAYON, L.; SANCHEZ, J. Cysteine tagging for MS-based proteomics. **Mass Spect. Rev.**, v. 30, p. 366-395, 2011.
- [63]. 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, n. 16, p. 2824-2837, 2003.
- [64]. GROSS, J. Electrospray Ionization. In: **Mass Spectrometry: a textbook**. 2. ed: Heidelberg, Springer, 2011 p.560-620.

- [65]. GROSS, J. Introduction. In: **Mass Spectrometry: a textbook**. 2. ed: Heidelberg, Springer, 2011 p.1-20.
- [66]. HOFFMAN, E.; STROOBANT, V. Ion Sources. In: **Mass Spectrometry: principles and applications** 3. ed: Chichester, John Wiley and Sons, 2007 p.15-84.
- [67]. GUERRERA, I.C.; KLEINER, O. Application of mass spectrometry in proteomics. **Biosc. Rep.**, v. 25, n. 1-2, p. 71-93, 2005.

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

“PERFIL METALOPROTEÔMICO DE AMOSTRAS DE MÚSCULO DE TILÁPIA DO NILO”

- a) Identificação e caracterização de metaloproteínas presentes em amostras de tecido muscular de tilápia do Nilo visando contribuir com estudos da fisiologia e nutrição desse espécie de peixe;
- b) Desenvolver e validar métodos analíticos visando o fracionamento/separação de proteínas por eletroforese 2D-PAGE de amostras de tecido muscular de tilápia do Nilo;
- c) Identificar e quantificar por FAAS e GFAAS a presença de Cálcio, Cobre, Ferro, Manganês e Zinco nos spots proteicos;
- d) Caracterizar as proteínas presentes nos spots nos quais foram identificados a presença de Ca, Cu, Fe, Mn e Zn por ESI MS MS;

O trabalho foi redigido de acordo com a revista *Microchimica Acta*

Capítulo II

PERFIL METALOPROTEÔMICO DE AMOSTRAS DE MÚSCULO DE TILÁPIA DO NILO

Bruna Cavecci^a, Paula M. Lima^a, José C. S. Vieira^b, Camila P. Braga^b, Luiz E. Pezzato^a, Pedro M. Padilha^{a,b,c*}

^aFaculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNESP – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, C. Postal 560, 18.618-970, Botucatu – SP – Brasil.

^bInstituto de Biociências/UNESP – Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, C. Postal 510, 18.618-970, Botucatu – SP –Brasil.

^cInstituto de Biociências/UNESP – Departamento de Química e Bioquímica, C. Postal 510, 18.618-970, Botucatu – SP –Brasil.

*Corresponding author: e-mail:padilha@ibb.unesp.br; telephone: + 55 (14) 3880-0581

Resumo

O trabalho avaliou o perfil metaloproteômico de amostras de tecido muscular de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Métodos eletroforéticos em segunda dimensão (2D PAGE) foram utilizados no fracionamento das proteínas e na identificação por análise de imagens obtidas nos géis de poliacrilamida. Foi feito mapeamento de cálcio, cobre, ferro, manganês e zinco nos spots proteicos por Absorção Atômica usando o módulo chama (FAAS) e forno de grafite (GFAAS). As proteínas dos spots nos quais foram identificados a presença de Ca, Cu, Fe, Mn e Zn foram caracterizadas por Espectrometria de Massas (ESI MS MS). Em média foram detectados 620 spots por gel, com desvio padrão de 11,3 e correlação média de 73% entre os géis. As determinações por FAAS/GFAAS indicaram a presença de cálcio em todos os spots, cobre em 2 spots, ferro em um único spot, manganês em 6 spots, e zinco em 3 spots. Dos 18 spots proteicos nos quais foram identificados a presença dos íons metálicos, 11 foram caracterizados por ESI MS MS, proteínas podem ser candidatas a biomarcadoras de Ca, Cu, Fe, Mn e Zn.

Palavras-chaves: Metaloproteínas, ESI MS MS, 2D-PAGE

Abstract

The study evaluated the metalon proteomic profile samples of muscle tissue of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Methods for second dimension electrophoresis (2D PAGE) has been used in the fractionation of proteins and identification by analysis of images obtained in polyacrylamide gels. Mapping of calcium, copper, iron, manganese and zinc in protein spots was done by Atomic Absorption using the module calls flame (FAAS) and graphite furnace (GFAAS). Were characterized by mass spectrometry (ESI MS MS) the protein spots were identified in which the presence of Ca, Cu, Fe, Mn and Zn. On average 620 spots per gel, with a standard deviation of 11.3 and average correlation of 73 % between the gels were detected. Determination by FAAS / GFAAS indicated the presence of all the spots calcium, copper in two spots of a single spot iron, manganese in 6 spots in 3 spots zinc. The 18 spots preteicos in which the presence of metal ions have been identified, 11 were characterized by ESI MS MS proteins may be candidates for biomarkers Ca , Cu, Fe , Mn and Zn.

Keywords: Metalloproteins ESI MS MS, 2D-PAGE

1. Introdução

Há consenso sobre a importância de íons metálicos como componentes estruturais e funcionais de peixes. Do ponto de vista estrutural o cálcio, cobre, ferro, manganês e zinco estão presentes em metalotioneínas e, do ponto de vista funcional, o papel catalisador destes íons sobre os sistemas enzimáticos [1].

Embora os íons metálicos constituam pequena proporção do tecido corporal (4%), são essenciais como componentes estruturais e funcionais em muitos processos vitais. No aspecto funcional, destaca-se 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, por meio de mudanças reversíveis no estado de oxidação do íon metálico. No aspecto estrutural, destaca-se o papel como integrantes de compostos orgânicos, tais como o ferro na hemoglobina, iodo na tiroxina, cobalto na vitamina B12 e enxofre na tiamina e biotina; estabilizando essas biomoléculas pela neutralização e/ou proteção de cargas negativas.

Existem funções nas quais o balanço de íons é importante 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 [2,3].

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 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 [4]. As metaloproteínas são consideradas diferentes das proteínas metal ligantes. 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 [5-7].

O estudo da metalômica nos organismos vivos fornece informações sobre como um íon metálico está distribuído e coordenado às proteínas; sua essencialidade e/ou toxicidade; como também, a concentração individual da espécie metálica, contribuindo para o melhor entendimento dos aspectos fisiológicos e funcionais dessas biomoléculas [8,9].

O presente trabalho teve como objetivos a obtenção do proteoma de amostras de músculo de tilápia do Nilo por meio do fracionamento das proteínas por 2D PAGE, o mapeamento quantitativo por espectrometria atômica dos íons cálcio, cobre, ferro, manganês e zinco nos spots proteicos e a caracterização dos spots nos quais foram identificados os íons metálicos estudados por ESI MS MS.

2. Parte Experimental

A determinação do teor total de proteínas nas amostras de músculo foi feita para se obter a massa protéica a ser aplicada nos géis das corridas eletroforéticas por 2D-PAGE, considerando a concentração do gel. Com base nesses resultados foi aplicada em cada fita, contendo gel pré-fabricado para IEF, $1,5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de proteína solubilizada numa solução contendo uréia a $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, tiouréia a $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, CHAPS a 2% (m/v), anfólitos de pH 3 a 10 a 0,5% (v/v), azul de bromofenol a 0,002% e 2,8 mg de DTT.

Na eletroforese 2D-PAGE cada mancha no gel, ou mais comumente denominado “spot” que possivelmente representa moléculas de uma única proteína [10-12]. Todas as corridas eletroforéticas dos extratos das amostras de músculo foram feitas em triplicata. Análises de correlações e a contagem do número de “spots” também foram feitas entre as repetições dos géis.

2.1. Alocação dos peixes e elaboração das dietas

Os animais provenientes do Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista (CAUNESP), Campus de Jaboticabal, SP foram trazidos até o Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (AquaNutri) UNESP Campus de Botucatu - Lageado, SP.

Foram utilizados cinco aquários de 250 L e cinco peixes foram alojados em cada aquário. Esses aquários fazem parte de um sistema de recirculação de água, dotado de filtragem mecânica e biofiltro. A aeração foi mantida por soprador de ar. Nesse sistema, a temperatura da água foi controlada eletronicamente, tendo sido ajustada para $27 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os animais utilizados foram adultos de tilápia do Nilo, com peso médio individual de 250 g, mantidos em gaiolas e alimentados com dieta extrusada formuladas de modo a apresentarem 32% de proteína digestível e 3400 kcal de energia digestível

[13]. Estas dietas apresentaram 1,0% de aminoácidos sulfurados, 1,6% de lisina, 4% de fibra bruta, 6% de extrato etéreo, 1,4% de Ca e 0,5% de fósforo disponível [14,15].

Os animais foram alimentados manualmente, até saciedade aparente, segundo o seguinte protocolo: às 8h:00, às 11h:00, às 15h:00 e às 18h:00. Esse experimento percorreu um tempo de 45 dias, sendo 15 dias de adaptação e 30 dias para que ganhassem o peso adequado para o abate.

2.2. Coleta de amostras

Após esse período os peixes de cada aquário foram eutanaziados, com solução de benzocaína (100 mg L^{-1}) para retirada das amostras de músculo. As amostras foram então transferidas para frascos de polipropileno de 15 mL e armazenadas a -80°C . Antes dos procedimentos analíticos, obteve-se um pool das amostras, (1g do pool de filé: 1mL de água deionizada) e após maceradas com auxílio de almofariz e pistilo. Em seguida, os extratos de músculo contendo as proteínas foram centrifugados em ultracentrífuga refrigerada (BioAgency) a 13.000 rpm durante 5 minutos a 4°C . Nos extratos proteicos obtidos foram feitas a quantificação de proteína total e, posteriormente, as corridas eletroforéticas [16, 17].

2.3. Preparação das amostras para eletroforese

Para quantificação do conteúdo proteico nas amostras procedeu-se a precipitação das proteínas utilizando-se solução gelada de acetona 80% (v/v) na proporção de 1:4 (amostra:acetona). A precipitação foi conduzida durante duas horas a 20°C , garantindo que a precipitação ocorresse de maneira quantitativa. Em seguida, o precipitado proteico foi centrifugado a 10.000 rpm em ultracentrífuga refrigerada (BioAgency) por 10 minutos e o sobrenadante retirado. Esse precipitado proteico foi lavado mais duas vezes com a solução de acetona gelada utilizada para a precipitação.

Após, o precipitado proteico foi ressolubilizado em tampão já descrito, sendo uma parte utilizada para a quantificação do teor total de proteínas utilizando-se o Kit 2D Quant GE Healthcare, e a outra parte utilizada nas corridas eletroforéticas [18].

2.4. Determinação da concentração proteica

A concentração de proteínas totais na amostra de músculo foi determinada com o 2-D Quant Kit - GE Healthcare [19]. Curvas analíticas de calibração foram feitas de acordo com as instruções do manual do kit e as leituras usando 480 nm como comprimento de onda no espectrofotômetro.

2.5. Separações eletroforéticas

Antes do início das separações eletroforéticas volumes 250 μ L dos extratos proteicos de músculo (obtidos pela ressolubilização da massa de proteína precipitada com acetona) foram aplicadas em fitas para focalização isoeletrica de 13 cm, que continham o gel pré-preparado com os anfólitos imobilizados de pH 3 a 10. Essas fitas foram colocadas em um aparato, sobre o qual permaneceram por 12 horas, a temperatura ambiente, para serem rehidratadas com o extrato proteico. Além do extrato proteico foram adicionados cerca de 900 μ L 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 = 1.000 V, com acúmulo de 800 Vh; Etapa 3 = 10.000 V, com acúmulo de 11.300 Vh; Etapa 4 = 10.000 V, com acúmulo de 3.000 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, utilizou-se 10 mL de solução contendo uréia 6 mol.L⁻¹, SDS 2 % (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹, azul de bromofenol 0,002% (m/v) e DTT 1% (m/v). Esta etapa denominada redução tem a finalidade de manter as proteínas nas formas reduzidas. Na segunda etapa utilizou-se 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 sejam reoxidadas durante o processo eletroforético. Cada etapa durou 15 min e foram realizadas sob baixa agitação em mesa agitadora [18].

Após a etapa de equilíbrio das fitas realizou-se a segunda dimensão do processo eletroforético (SDS-PAGE). A fita de proteínas de músculo foi aplicada em gel de poliacrilamida 12,5% previamente preparado em placa de vidro com dimensões

180x160x1,5mm. Os géis de poliacrilamida foram preparados a partir das seguintes soluções: Acrilamida, N,N'-metilenobisacrilamida, Tris-hidroximetil amino metano, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), N,N',N,N'-tetrametilenodiamina (TEMED), Ácido Clorídrico e Persulfato de Amônio. Colocou-se sobre o gel de poliacrilamida, ao lado da fita, um pedaço de papel de filtro, ao qual foi aplicado 10 µL de padrão de massa molar contendo as proteínas β-fosforilase (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactoalbumina (14,4 kDa). A fita e o papel de filtro foram vedados com solução quente de agarose 0,5% (m/v) em tampão adequado, de modo a garantir o contato destes com o gel de poliacrilamida. Em seguida, a corrida eletroforética em segunda dimensão foi efetuada em sistema para eletroforese 2D-PAGE, em duas etapas, utilizando a seguinte programação: 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 = 3.

Após o período de corrida (aproximadamente 3,5 h) as proteínas foram fixadas durante 1 h, empregando-se solução contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v) e 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). O corante ficou em contato com o gel durante 72 h e depois foi removido por sucessivas lavagens com água ultrapura. Os géis obtidos, feitos em triplicatas, foram escaneados em Scanner GE Healthcare. As imagens escaneadas foram analisadas para se obter a correlação entre as repetições de géis, bem como a contagem de “spots” dos mesmos, utilizando o programa *ImageMaster platinum 7.0*.

2.6. Mineralização dos spots para detecção dos elementos

Os spots proteicos obtidos nas corridas eletroforéticas foram mineralizadas utilizando-se o procedimento já descrito na literatura [20-23].

2.7. Mapeamento de Ca, Fe e Zn por Espectrometria de Absorção Atômica com chama (FAAS)

O Mapeamento de Ca, Fe e Zn por Espectrometria de Absorção Atômica com chama (FAAS) foi feito utilizando-se solução padrão Titrisol MERCK no preparo da curva de calibração. As condições operacionais e utilizadas foram as descritas no manual do fabricante do equipamento (COOKBOOK, SHIMADZU AA – 6800, 2000) [24] e constam na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetro utilizado no ajuste do FAAS - SHIMADZU AA-6800, para o mapeamento de Ca, Fe e Zn.

Elementos	Ca	Fe	Zn
Corrente da lâmpada	3 Ma	6 Ma	6 mA
Estequiometria da chama	Oxidante Ar-Acet	Oxidante Ar-Acet	Oxidante Ar-Acet
Fenda	0,5 nm	0,5 nm	0,50 nm
Comprimento de onda	324,7 nm	248,3 nm	213,9 nm
Fluxo de gás Combustível	0,70 L min ⁻¹	0,70 L min ⁻¹	0,70 L min ⁻¹

2.7.1. Soluções padrões para as curvas analíticas de Ca, Fe e Zn

Soluções padrão aquoso misto de Ca, Fe e Zn em meio de HCl 0,10 mol L⁻¹ e 10 g L⁻¹ de lantânio, utilizadas na construção das curvas analíticas, foram preparadas a partir da diluição de padrões Titrisol (Merck) contendo 1000 mg L⁻¹ dos analitos. As faixas ótimas de concentração das curvas analíticas foram as sugeridas no manual do equipamento [24]. Para cada curva analítica preparou-se um branco contendo todos os componentes das soluções padrão menos o analito de interesse, por exemplo: Branco da Curva Analítica do Cálcio – HCl 0,10 mol L⁻¹ + 10 g L⁻¹ de lantânio + 6mg L⁻¹ de Fe + 1 mg L⁻¹ de Zn, para determinações feitas pelo módulo de chama. As determinações de Cu e Mn foram feitas por GFAAS, não foi utilizado nesse caso solução padrão misto e sim padrões individuais desses elementos.

2.8. Mapeamento de Cu e Mn por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS)

Nas determinações de cobre e manganês utilizou-se espectrômetro de absorção atômica SHIMADZU modelo AA-6800, equipado com corretor de absorção de fundo com lâmpada de deutério e sistema self-reverse (SR), tubo de grafite pirolítico com plataforma integrada e amostrador automático ASC-6400. Foi utilizada lâmpada de cátodo oco de cobre e manganês SHIMADZU, operada com 12 mA de corrente. O comprimento de onda utilizado foi de 324,7 nm para o cobre e 279,5 nm para o manganês, a resolução espectral utilizada foi de 0,5 nm. Argônio foi utilizado como gás inerte, mantendo-se fluxo constante de 0,30 L min⁻¹ durante todo o programa de aquecimento, exceto na etapa de atomização, na qual o fluxo de gás foi interrompido. Os sinais de absorbância foram medidos em de área de pico.

2.8.1. Procedimentos analíticos

Após a etapa de preparo das amostras, um volume de 10 µL de amostra foi injetado para dentro do tubo de grafite pela micro pipeta do autoamostrador. As medidas foram feitas com três repetições. No programa de aquecimento do tubo de grafite, inicialmente fixou-se a temperatura de atomização (T_A), variando-se a temperatura de pirólise (T_P) em intervalos de 100 °C. Depois de fixada a T_P ótima, variou-se a T_A nos mesmos intervalos. O programa de aquecimento utilizado nesses estudos encontra-se descrito na Tabela 2 e em todas as medidas foi utilizado nitrato de paládio como modificador químico [21, 24]

Tabela 2. Programa de aquecimento utilizado na otimização das temperaturas de pirólise e atomização de cobre e manganês.

Etapas	Temperatura (°C)	Estágios		Fluxo de Argônio (L min ⁻¹)
		Rampa (s)	Aquecimento (s)	
Secagem	90	10	0	0,30
Secagem	150	10	5	0,30
Secagem	250	10	5	0,30
Pirólise*		10	20	0,30
Atomização*		1	5	0 (leitura)
Limpeza	2800	5	0	0,30

*Variável

2.8.2. Soluções padrões para as curvas analíticas de Cu e Mn

Soluções padrão aquosas, contendo $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido clorídrico suprapuro, 0,50 % de Triton - X 100 e 10 mg L^{-1} de Pd(II) preparadas por diluição de solução estoque contendo $250 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre e/ou manganês, foi utilizada no preparo de curva analítica na faixa de concentração de 1 a $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

2.9. Digestão trípica dos spots proteicos para caracterização por ESI - MS

Os spots proteicos foram extraídos dos géis utilizando-se bisturi, sendo cortados em segmentos de aproximadamente 1 mm^3 . Os seguimentos foram transferidos para microtubos de 2 mL contendo ácido acético 1% e mantidos em geladeira até os passos subseqüentes, descritos no Boletim Técnico da Waters, que se resume em 4 etapas: a) remoção do corante; b) redução e alquilação; c) digestão trípica das proteínas; d) eluição dos peptídeos.

2.10. Caracterização das proteínas por ESI - MS

As alíquotas das soluções contendo os peptídeos foram analisadas para obtenção dos espectros de massas utilizando Plataforma UPLC em espectrômetro de massa com fonte ionização por ESI e analisador de massas híbrido Xevo G2 Q-TOF (Waters, Milford, MA, EUA), acoplado com sistema nanoAcquity Ultra Performance LC (Waters, Milford, MA, EUA). A identificação das proteínas foi feita por meio de busca em banco de dados Uniprot (www.uniprot.org).

3. Resultados e Discussão

3.1. Determinação da concentração de proteínas nas amostras

O resultado indicou que o extrato das proteínas da amostras de músculo contém $14,28 \text{ mg.mL}^{-1}$.

3.2. Otimização das separações eletroforéticas

Os géis do extrato das amostras de músculo apresentaram boa resolução. Isso demonstra que a separação de proteínas ocorreu de forma eficiente. Observou-se grande número de spots proteicos, espalhados em todos os géis, com alguns mais intensos com pI entre 6 e 9 e massa molar em torno de 70,0 a 45,0 kDa. Devido a grande

concentração de proteínas nessa região optou-se por trabalhar com as partes inferiores dos géis onde os spots mostraram-se mais bem definidos. Para isso os spots foram recortados, mineralizados e posteriormente foram feitas as leituras por espectrometria atômica (FAAS e GFAAS) para a detecção de Ca, Cu, Fe, Mn e Zn. A análise de correlação entre os géis (Tabela 3) obtidos demonstrou que 73,5% dos spots proteicos estavam presentes nos quatro géis das amostras de tecido muscular. Além disso, o número médio de spots encontrados nos géis foi de 620 e apresentaram desvio padrão relativamente menor que 10%, o que é considerado muito bom no fracionamento de proteínas por 2D-PAGE [1].

Tabela 3. Análise de correlação entre os géis de músculo Tilápia (*Oreochromis noluticus*).

Gel	Nº de spots	Média ± Desvio Padrão (Nº de spots)	Correlação média entre os géis
A	604	620±11,3	73,5%
B	619		
C	628		
D	628		

3.3. Spots Proteicos

Abaixo (Figura 1) apresentam-se os spots que foram mapeados durante essa etapa do trabalho. Na tabela 4 apresentam-se a Massa Molar (kDa) e o Ponto Isoelétrico e a identificação de Cálcio, Cobre, Ferro, Manganês e Zinco, sendo apresentada a sua proporção.

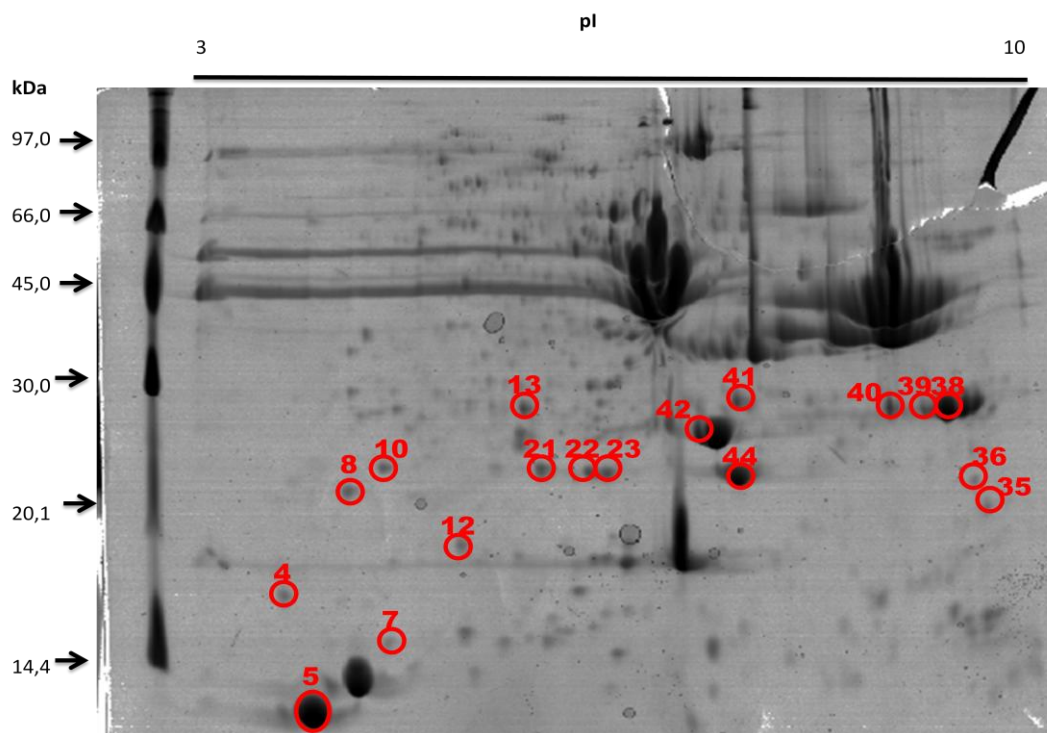


Figura 1. Gel de poliacrilamida 12,5% de músculo de Tilápia do Nilo com spots proteicos que foram identificados por ESI MS MS. (Representativo de 36 géis)

Tabela 4. Massa molar (Mm), ponto isoelétrico (pI) e concentração de Cálcio, Cobre, Ferro, Manganês e Zinco nos spots proteicos obtidos por 2D-PAGE do tecido muscular de Tilápia.

Spot Proteico	Massa Molar (Mm) (kDa)	PI	Ca (ppm)	Cu (ppb)	Fe (ppm)	Mn (ppb)	Zn (ppm)
4	17,2	3,74	2,7	-	-	-	4,6
5	11,8	3,98	7,4	-	-	-	6,7
7	14,7	4,60	17,1	-	-	-	7,2
8	24,1	4,27	10,3	-	-	-	-
10	25,9	4,58	12,4	-	-	4,4	-
12	20,3	5,22	7,4	-	-	5,8	-
13	30,8	5,72	7,0	-	-	4,9	-
21	25,6	5,88	5,6	-	-	4,1	-
22	25,6	6,27	11,7	-	-	3,2	-
23	25,5	6,42	15,3	-	-	4,1	-
35	23,1	9,55	33,23	-	-	-	-
36	24,9	9,45	12,1	-	-	-	-
38	31,4	9,37	16,7	2,7	-	-	-
39	31,0	9,12	21,0	-	-	-	-
40	31,0	9,01	35,8	0,01	-	-	-
41	31,6	7,49	30,0	-	-	-	-
42	28,8	7,17	19,6	-	-	-	-
44	25,2	7,50	2,6	-	0,06	-	-

3.4. Caracterização dos spots proteicos por ESI MS MS

18 spots foram caracterizados identificando-se 11 proteínas [25-29].

Na análise de caracterização de spots proteicos, encontrou-se mais de uma proteína na busca no banco de dados [30]. 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* (www.uniprot.org). A Tabela 5 apresenta os dados de caracterização obtidos na análise por ESI MS MS como a provável proteína identificada com base nas condições descritas acima. E posteriormente foi descrita de acordo com os dados do Uniprot cada proteína identificada.

Tabela 5. Proteínas identificadas utilizando espectrometria de massas para amostras de tecido Muscular de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Spot Gel	Proteína	Acesso	Score	pI/MM(kDa) experimental	MM(kDa) massas	MM(kDa) teórica	PI teórico	Cobertura (%)	Peptídeos sequenciados
4	Surfeit locus protein 1 (Fragment)	SURF1_TAKRU	9.2809	3.74/17.2	28.3	27.366	9.35	5.83	GQVEGEMEVVGVR
5	Parvalbumin-2	PRV2_DANRE	454.7477	3.98/11.8	12.253	11.622	4.46	24.77	LFLQNFSASAR
7	Hemoglobin subunit alpha-B	HBAB_SERQU	144.5561	4.60/ 14.7	16.549	15.948	9.58	5.56	VALALAER
8	Adenylate kinase isoenzyme 1	KAD1_CYPKA	168.1528	4.27/24.1	22.550	21.498		18.56	YGYTHLSSGDLLR GELVPLDTVLDMIK GYLIDGYPR
10	Myosin light chain 1_skeletal muscle isoform	MLE1_LIZRA	2597.485	4.58/25.9	20.582	20.067	4.54	36.02	AGFEDYVEGLR VAYNQIADIMR VEFSADQIEDYR LLGNPSADDMTNK EGNGTVMGAELR EAFGLFDR VAYNQIADIMR
12	Nucleoside diphosphate kinase B (Fragments)	NDKB_MERBI	425.2751	5.22/ 20.3	15.225	14.407	5.38	22.66	TFIAIKPDGVQR MMLGETNPADSKPGSIR
13	Triosephosphate isomerase B	TPISB_DANRE	412.9113	5.72/30.8	28.391	26.828	6.45	4.84	TNVSEAVANSVR LDEREAGITEK
21	Adenylate kinase isoenzyme 1	KAD1_CYPKA	775.5877	5.88/25.6	22.550	21.489	6.64	4.12	QLQAIMQK

22	Adenylate kinase isoenzyme 1	KAD1_CYPCA	108.0555	6.27/25.6	22.550	21.489	6.64	7.22	GELVPLDTVLDMIK
23	Adenylate kinase isoenzyme 1	KAD1_CYPCA	605.4806	6.42/25.5	22.550	21.489	6.64	13.4	QLQAIMQK GIVR AEVASGSR ADVSK
35	L-lactate dehydrogenase A	LDHA...	154.2966	9.55/23.1	37.761	36.183	6.67	6.34	VIGSGTNLDSAR VVVVTAGAR LSGFPR VVTAGAR
36	Homeobox protein HMX3-B	HMX3B_ORYLA	95.4789	9.45/24.9	33.624	32.606	6.42	8.97	LGDLSLPR SLPR NLLNIEDKPTKPK QLAAELEAANMSHAAAQR
38	Wnt inhibitory factor 1	WIF1_DANRE	216.1721	9.46/31.4	45.925	41.312	8.45	10.85	SPSVAAAK AQQR AVCEPSCGAHGTCVEPNR ANCSTTCLNGGTCFHPGK EAPETSQPSETNYVV
39	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_DANRE	144.2367	9.12/31.0	37.362	35.784	8.19	10.21	VPTPNVSVVDLTVR LVIDGHAITVYSERDPANIK
40	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_DANRE	696.6146	9.01/31.0	37.362	35.784	8.19	8.41	VPTPNVSVVDLTVR LVTWYDNEFGYSNR
41	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_DANRE	877.7529	7.49/31.6	37.362	35.784	8.19	8.71	VPTPNVSVVDLTVR TVDGPSGK LTGMAFR

Spot 4 Surfeit locus protein 1 (Fragment) é uma proteína de baixa massa molar, que tem localização subcelular (Membrana Interna da Mitocôndria) e está relacionada a biogênese do complexo COX. A Parvalbumin, encontrada no spot 5, 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 à 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 [31].

A metaloproteína Hemoglobina subunit beta (spot 7) esta envolvida no transporte de oxigênio a partir das brânquias para os vários tecidos periféricos no caso de peixes. Essa proteína apresenta o grupo ‘heme’ que é responsável pela complexação específica do íon Fe^{2+} configurando como um cofator metálico [32]. Nos spots 8, 21, 22, 23 e 44 foi identificada a Adenylate kinase isoenzyme 1 proteína de baixa massa molar (22kDa) que se localiza no citoplasma celular e tem a função de catalisar a transferência reversível do grupo fosfato terminal do ATP e entre AMP. Também exibe ampla atividade como nucleosídeo difosfato quinase. Desempenha papel importante na homeostase de energia celular e no metabolismo de nucleotídeos de adenina.

Myosin light chain 1_ skeletal muscle isoform encontrada no spot 10 é proteína com massa molar de 20kDa e pI de 4.5, a miosina é um hexâmero de duas cadeias pesadas e de quatro cadeias leves. A Nucleoside diphosphate kinase B (Fragments) é metaloproteína cujo co-fator é o Magnésio. Tem grande papel na síntese de ATP e de outros trifosfatos de nucleosídeos. É encontrada no citoplasma celular e membranas celulares.

A proteína Triosephosphate isomerase B identificada nos spots 12 e 42 possui massa molar de 28kDa e pI de aproximadamente 6.0, realiza atividade catalítica (D-gliceraldeído-3-fosfato = fosfato glicerone); gliconeogênese; degrada carboidratos; glicólise; D-gliceraldeído 3-fosfato a partir de fosfato glicerone. No spot 35 indentificou-se a L-lactate dehydrogenase A possui atividade catalítica: (S)-lactato + NAD (+) = piruvato + NADH. Realizando a Fermentação; fermentação piruvato a

lactato, (S)-lactato de piruvato. Se localiza no citoplasma celular. Já no spot 36 encontramos a Homeobox protein HMX3-B proteína com fator de transcrição envolvidos na especificação de tipos de células neuronais e necessárias para a orelha interna, e o desenvolvimento hipotálamo, provavelmente esta relacionada a linha lateral do peixe.

O spot 38 encontrou-se Wnt inhibitory factor 1 que se liga a proteínas WNT e inibe suas atividades. Podem estar envolvidos na segmentação mesoderme. E por fim nos spots 39, 40 e 41 a Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase de massa molar aproximadamente de 31kDa, todos esses spots estão ligados ao Cálcio e um deles ao Cobre. Essa proteína possui a função tanto de desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato e de atividades nitrosilase, desempenhando assim um papel na glicólise e em funções nucleares, respectivamente.

4. Conclusões

A eletroforese 2D-PAGE possibilita a obtenção do proteoma de amostras de músculo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). A correlação média obtida nas repetições dos géis mostra que os procedimentos de extração das proteínas foram eficientes, preservando a estrutura metal-proteína, permitindo o mapeamento e a quantificação de cálcio, cobre, ferro, manganês e zinco nos spots proteicos desses elementos por FAAS e/ou GFAAS. A análise dos spots proteicos, nos quais foram identificados a presença dos íons metálicos estudados por ESI MS MS, permitiu a caracterização de 11 proteínas que podem ser candidatas a biomarcadores cálcio, cobre, ferro, manganês e zinco. O estudo metaloproteômico desenvolvido traz contribuições significativas para elucidação do proteoma e metaloma da tilápia do Nilo, o que é de fundamental para estudos da área de fisiologia, genética e nutrição dessa espécie de peixe.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESP, processo nº: 2011/14902-0.



6. Referências

1. Lima PM, Neves RCF, Santos FA, Perez CA, Da 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
2. Johnson DW, Lindberg SE (1995) The biogeochemistry cycling of Hg in forests: alternative methods for quantifying total deposition and soil emission. *Water Air Soil Pollut* 80:1069-1077
3. Bahia MO (1997) Le potentiel génotoxique du mercure: mutations HPRTet effects cytogénétiques. Dissertação, Université du Québec à Montreal
4. Amorim MIM, Mergler D, Bahia MO, Dubeau H, Miranda DC, Lebel J, Burbano RR, Lucotte M (2000) Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. *An Acad Bras Cienc* 72:497-507
5. Roulet M, Lucotte M, Guimarães JRD, Rheault I (2000) Methylmercury in water, seston and epiphyton of an Amazonian river and its floodplain, Tapajós river, Brazil. *Sci Total Environ* 261:43-48
6. Wasserman JC, Hacon S, Wasserman MA (2001) o ciclo do mercúrio no ambiente amazônico. *Mundo Vida* 2:46-53
7. Aula I, Braunschweiler H, Malin I (1995) The watershed flux of mercury examined with indicators in Tucuruí reservoir in Para, Brazil. *Sci Total Environ* 175:97-107
8. Pfeiffer WC, Kato H (1995) Methylmercury pollution in the Amazon, Brazil. *Sci Total Environ* 175:85-95
9. Martinelli LA, Ferreira JR, Forsberg BR, Victoria RL (1988) Mercury contamination in the Amazon a gold rush consequence. *Ambio* 17:252-254
10. Cookbook Shimadzu (2000) Operation manual: atomic absorption spectrophotometer AA-6800 series. Shimadzu Corporation, Kyoto
11. Neves RCF, Moraes PM, Silva FA, Loureiro VR, Saleh MAD, Padilha CCF, Barros MM, Padilha PM (2008) Determination of copper in fish feed by graphite furnace atomic absorption spectrometry using slurry sampling. *Sens Instru Food Qual Saf* 2:274-279

12. Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG (2004) Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-259 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25:1327-1333
13. Furuya WM, Souza SR, Furuya VRB, Hayashi C, Ribeiro RP (1998) Dietas peletizadas e extruzadas para machos revertidos de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de terminação. *Cienc Rural* 28:483-487
14. Lahav E, Ra'nan Z (1997) Salinity tolerance of genetically produced tilapia (*Oreochromis*) hybrids. *Isr J Aquacult* 49:160-165
15. Hildsorf AWS (1995) Genética e cultivo de tilápias vermelhas, uma revisão. *Bol Inst Pesca* 22:73-78
16. Griffiths WJ, Jonsson A P, Liu S, Rai D K, Wang Y, (2001) Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochem. J.* 355: 545-561
17. Miranda EC, Pezzato AC, Pezzato LE, Furuya WM (2000) Disponibilidade aparente de fósforo em ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Sci* 22:669-675
18. Gómez-Ariza JL, Garcia-Barrera T, Lorenzo F, Bernal V, Villegas MJ, Oliveira V (2004) Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems. *Anal Chim Acta* 524:15-22
19. 2-D Quant Kit - GE Healthcare. 80-6486-22PS AE 04-2009
20. Silva FA, Padilha CCF, Pezzato LE, Barros MM, Padilha PM (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
21. Loureiro VR, Saleh MAD, Moraes PM, Neves RCF, Silva AF, Padilha CCF, Padilha PM (2007) Manganese determination by GFAAS in feces and fish feed slurries. *J Braz Chem Soc* 18:1235-1241
22. Neves RCF, Moraes PM, Saleh MAD, Loureiro VR, Silva FA, Barros MM, Padilha CCF, Jorge SM, Padilha PM (2009) FAAS determination of metal nutrients in fish feed after ultrasound extraction. *Food Chem* 113:679-683
23. Padilha CCF, Moraes PM, Garcia LA, Pozzi CM, Pereira GP, Valente JPS, Jorge SM, Padilha PM (2011) Evaluation of Cu, Mn and Se in vegetables using ultrasonic extraction and GFAAS. *Food Anal Methods* 4:319-325

24. Silva FA, Padilha CCF, Castro GR, Roldan PS, Nogueira ARA, Moraes PM, Padilha PM (2011) Selenium determination in tissue samples of Nile tilapia using ultrasound-assisted extraction. *Cent Eur J Chem* 9:119-125
25. Weseloh G, Kuhbacher M, Bertelsmann H, Ozaslan M, Kyriakopoulos A, Knochel A, Behne D (2004). Analysis of metalcontaining proteins by gel electrophoresis and synchrotron radiation X-ray fluorescence. *J Radioanal Nuclear Chem* 259:473.
26. 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* 173:43-49
27. Moraes PM, Santos FA, Padilha CCF, Vieira JCS, Zara LF, Padilha PM (2012) A preliminary and qualitative metallomics study of mercury in the muscle of fish from Amazonas, Brazil. *Biol Trace Element Res* 150:195-199
28. Neves RCF, Lima PM, Baldassini WA, Santos FA, Moraes PM, Castro GR, Padilha PM (2012) Fracionamento de cobre em proteínas do plasma, músculo e fígado de tilápia do Nilo. *Quím Nova* 35:493-498
29. Moraes PM, Santos FA, Cavecci B, Padilha CCF, Vieira JCS, Roldan PS, Padilha PM (2013) GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon, Brazil. *Food Chem* 141:2614-2617.
30. Rison SCG, Hodgman TC, Thornton JM (2000) Comparison of functional annotation schemes for genomes. *Funct Integr Genomics* 1:56-69
31. Berbel P, Marco P, Cerezo JR, Felipe J (1996). Distribution of parvalbumin immunoreactivity in the neocortex of hypothyroid adult rats. *Neurosci Lett* 204:65-68.
32. Edenber HJ, Dick AM, Xuei X, Tian H, Almasy L, Bauer LO, Crowe RR, Alison Goate A (2004) Variations in *GABRA2*, encoding the $\alpha 2$ subunit of the GABAA receptor, are associated with alcohol dependence and with brain oscillations. *Am J Hum Genet* 74:705-714

Capítulo – III

IMPLICAÇÕES

A metalômica cresce como um novo campo de investigação que integra estudos de espécies metálicas com estudos de macromoléculas, mais especificamente as proteínas. O aprimoramento de métodos analíticos que permitem a investigação segura das metaloproteínas, principalmente em relação aos macros e microminerais que são fundamental importância para que essas biomoléculas realizem as suas atividades biológicas. O presente trabalho contribui não apenas aprimorando as técnicas já conhecidas pelo grupo, mas também iniciou uma nova fase de estudos que é a caracterização de cada spot proteico dessa espécie de peixe. Permitindo assim conhecer inicialmente algumas proteínas presentes no músculo de tilápia do Nilo e também descrever suas funções fisiológicas.