

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

**DETERMINAÇÃO DE MANGANÊS E ZINCO EM SPOTS
PROTÉICOS DE PLASMA DE TILÁPIA DO NILO
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*) POR SR-XRF E GFAAS APÓS
SEPARAÇÃO POR 2D-PAGE**

FELIPE ANDRÉ DOS SANTOS

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

BOTUCATU – SP

Maiο – 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

**DETERMINAÇÃO DE MANGANÊS E ZINCO EM SPOTS
PROTÉICOS DE PLASMA DE TILÁPIA DO NILO
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*) POR SR-XRF E GFAAS APÓS
SEPARAÇÃO POR 2D-PAGE**

FELIPE ANDRÉ DOS SANTOS

Biólogo

ORIENTADOR: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

BOTUCATU – SP
Maio – 2010

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

Santos, Felipe André dos.

Determinação de manganês e zinco em spots protéicos de plasma de tilápia do Nilo (*oreochromis niloticus*) por SR-SRF e GFAAS após separação por 2D-PAGE / Felipe André dos Santos. – Botucatu, 2010

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

Orientador: Pedro de Magalhães Padilha

Assunto CAPES: 50701029

1. Metaloproteínas. 2. Tilápia (Peixe). 3. Eletroforese – Avaliação.

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

Dedico esta Dissertação de Mestrado aos meus pais Marilda e Ademir e minhas queridas irmãs Livia e Pâmela pela força confiança e carinho nas horas de dificuldade e alegria, pois muitos sacrifícios foram feitos para minha formação.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela Sua presença sempre iluminando os meus caminhos e tornando possível que chegasse até aqui.

À minha mãe Marilda, pelo carinho, amor, incentivo, preocupação e toda ajuda com livros na biblioteca da UNESP de Araraquara, TE AMO TICA.

Ao meu pai Ademir, pela paciência, força, incentivo, companheirismo e sábios conselhos, TE AMO NEGÃO.

À minhas queridas irmãs Livia e Pâmela, pelo amor, paciência e amizade sincera depositada ao longo destes anos.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda, por permitir a utilização de equipamentos sob a sua responsabilidade que foram importantes para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gustavo Rocha de Castro, por toda ajuda e conselho para o aperfeiçoamento da dissertação.

Ao Prof. Dr. Julio Cesar Rocha, pela amizade, conselhos importantes e pelas pescarias.

Aos meus amigos do laboratório: Barbara “Tonhão”, pela paciência; Renato “Nei” e Paula Lima “Omelete”, pelo companheirismo e ajudas eletroforéticas; Paula “Birra”, pelo bom humor; Tiago “Pikeno”; Amanda “Barrada”; Mayra; Bruna “Tatu”.

Aos colegas do Departamento de Química; Maria e Lurdinha, pelas risadas e ajudas administrativas; Fabinho, Vânia e Evaldi, pela ajuda em geral e aos Professores do Departamento.

À republica SAMU; Ricardo “Careca”; Guilherme “França”; Rafael “Lemão” e Murilo “Mira” pela ótimo convívio, força e camaradagem.

Ao programa de pós-graduação FMVZ especialmente Seila e Carlos, pela paciência e ajudas administrativas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio ao projeto financiado.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, a minha eterna gratidão.

HOMENAGEM AO ORIENTADOR

Prof. Pedro suas palavras são a linha mestra para a gente.

Sempre que nos encontramos na situação de aluno/orientando, nos sentimos um pouco desorientados, precisando que alguém nos dê o norte a seguir, que nos diga palavras que gerem os famosos "desequilíbrios", palavras que nos incentivem a seguir em busca de algo maior, novo e maior, e que nos mostre novos horizontes, ou eu diria que não necessariamente mostre estes horizontes, mas que nos diga que eles existem e, assim, a gente parte em busca deles, inicialmente tateando no escuro, mesmo não tendo muita certeza que eles existam, mas acreditando no que foi dito, portanto, eles devem existir, até que, num belo dia ... uma luz, como uma estrela a nos guiar, nos indica o caminho para este novo, lindo, curioso, instigante e surpreendente horizonte.

É incrível como as palavras de nosso mestre nos afeta e fazem nosso mundo interno dar cambalhotas.

(Rute)

Prof. Pedro, muito obrigada pela tua ajuda, mas acima de tudo, pelas tuas belas palavras.

Que não foram poucas, mas sim, o suficiente.

Prof. Pedro Padilha, você é uma estrela no horizonte a nos guiar

Do fundo do coração, MUITO OBRIGADO !!!!

Pela orientação profissional, confiança, paciência necessária para que pudesse passar seus conhecimentos durante estes anos, pela amizade, companheirismo, resultado desta convivência, nos momentos de trabalho e lazer.

VALEU PEDRÃO !!!!!!!!!!!

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	01
1. INTRODUÇÃO	02
1.1. Considerações iniciais e justificativas	02
2. Revisão Bibliográfica.....	04
2.1. Proteoma	04
2.2. Proteínas	05
2.2.1. Métodos para a determinação da concentração de proteínas totais	07
2.2.1.1. Método de Bradford	08
2.3. Metalômica	09
2.4. Metaloproteínas e proteínas ligadas a metais	11
2.5. Tipos de eletroforese	12
2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida – 2D PAGE	13
2.7. Preparo de amostra para a separação por eletroforese bidimensional	15
2.8. Tratamento de imagens dos géis	17
2.9. Espectrometria Atômica de Raios – X	18
2.9.1. Fluorescência de raios – X com radiação Síncroton	19
2.9.2. Radiação Síncroton	20
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO II	30
Resumo	31
Abstract	32
INTRODUÇÃO	33
EXPERIMENTAL	34

Equipamentos	34
Reagentes e Soluções	34
Coleta e preparo da amostra	35
Preparação da amostra para eletroforese	35
Determinação da concentração das proteínas totais	36
Separações Eletroforéticas	36
Determinação quantitativa de manganês e zinco por SR-XRF nos spots das amostras de plasma	38
Determinação quantitativa de manganês e zinco nos spots protéicos das amostras de plasma por GFAAS	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
Determinação da concentração de proteínas totais nas amostras	39
Otimização das separações eletroforéticas	39
Avaliação qualitativa de manganês e zinco por SR-XRF nos spots protéicos das amostras de plasma de tilápia do Nilo	41
Avaliação quantitativa de manganês e zinco nos spots protéicos das amostras de plasma de tilápia do Nilo	43
CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
CAPÍTULO III	50
Implicações	51

LISTA DE ABREVIATURAS

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

Capítulo I**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Proteínas Conjugadas	07
Tabela 2. Substâncias que interferem na determinação de proteínas totais pelo método de Bradford	09
Tabela 3. Substâncias utilizadas na solubilização de proteínas	16

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Níveis de estrutura nas proteínas	06
Figura 2. Estrutura do corante Azul de Coomassie, composto que compõe o reagente de Bradford	08
Figura 3. Seqüência das etapas que envolve a separação de proteínas por eletroforese em primeira e segunda dimensões	14

Capítulo II

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Massa molar (MM) e ponto isoelétrico (pI) de proteínas do pool de amostras de plasma de tilápia do Nilo separadas por 2D PAGE que apresentaram manganês e zinco ligados em suas estruturas..... 43
- Tabela 2.** Concentração de manganês e zinco e estimativa das massas de proteínas determinadas nos spots protéicos das amostras de plasma, nos quais foi detectada a presença desses elementos por SR-XRF..... 44
- Tabela 3.** Estimativa de porcentagens de moléculas de proteínas contendo manganês e/ou zinco ligados e do número de átomos de manganês e/ou zinco por spot protéico 45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Gel de poliacrilamida 10% (m/v) de plasma de tilápia do Nilo com pI situado na faixa de 4 a 7 e massa molar de proteína na faixa de 30,0 a 97,0 kDa..... 40
- Figura 2.** Exemplo de espectro de SRXRF obtido do spot protéico 18 do pool de amostras de plasma de tilápia do Nilo..... 41
- Figura 3.** Spots protéicos em três dimensões obtidos do pool de amostras de plasma de tilápia do Nilo. Os spots nos quais foram identificados a presença de manganês e zinco por SR-XRF estão indicados com círculo..... 42

Capítulo - I

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações iniciais e justificativas

A produção mundial de pescado procedente da aquicultura é estimada em 47 milhões de toneladas, das quais 28 milhões são decorrentes do cultivo em águas continentais, principalmente em países tropicais, como o Brasil. Das espécies ícticas criadas em ambientes tropicais de água doce destacam-se as tilápias com uma produção mundial que supera dois milhões de toneladas. Nos últimos anos no Brasil ocorreu um considerável aumento na produção de tilápias, o que tem levado pesquisadores que trabalham com aquicultura a desenvolverem trabalhos relacionados ao comportamento, fisiologia, genética e nutrição dessa espécie [1,2].

É consenso entre esses pesquisadores a fundamental importância dos íons metálicos, pois eles são essenciais como componentes estruturais e em processos vitais, pode atuar como agentes sinalizadores, catalisadores, ou ainda alterar a expressão gênica [3,5].

A concentração total desses íons metálicos em amostras biológicas ou ambientais tem sido determinada por métodos analíticos sensíveis, como a AAS (Espectrometria de absorção atômica), ICP (Plasma acoplado indutivamente), ICP-MS (espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente), XRF (Espectrometria de fluorescência de raios-X), entre outros. Porém, muitos processos envolvendo elementos em baixas concentrações ou em relação aos microminerais, quando se trata de nutrição animal, estão longe de serem bem entendidos. Isso porque a maioria das matrizes de interesse biológico, por exemplo, fluidos corporais, tecidos ou alimentos, apresentam-se na forma de complexos de alta estabilidade e, portanto, de difícil análise [6,7]. Assim, as conclusões sobre a importância do metal para biomoléculas, mais especificamente as proteínas, são muitas vezes fragmentadas [4].

A compreensão dos papéis que envolvem metais e proteínas dependem da qualidade da informação obtida após a análise metal-proteína [4]. Considerando o exposto, a determinação de íons metálicos ligados às proteínas, mais especificamente de

tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), poderá trazer informações importantes para a área de fisiologia, genética e nutrição de peixes.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Proteoma

Com a codificação do genoma humano, o qual consiste no conjunto de todos os genes, os cientistas voltaram suas pesquisas ao seqüenciamento de proteínas. Uma pesquisa está diretamente ligada à outra, pois são as proteínas que carregam as mensagens dos genes para controlar as funções do organismo [8,11].

Um dos grandes desafios do século 21, segundo o norte americano Walter Gilbert, será codificar as proteínas que os genes produzem e suas funções biológicas exercidas ao longo da vida, podendo assim viabilizar novas drogas e terapias (Proteoma) [10].

O termo proteoma foi cunhado por Wilkins e Williams em 1993, para descrever o complemento protéico total do genoma [9].

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 altamente dinâmico e dependente do estado da célula. Portanto, o proteoma não é estacionário mas muda com o desenvolvimento do organismo e com qualquer mudança no seu ambiente, uma vez que o proteoma muda mais que o genoma, é possível então obter-se mais informação do organismo estudando-se o proteoma [11].

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, indo interferir decisivamente no papel que ela realiza [12].

A análise de proteomas possui varias aplicações e a demanda de trabalhos nessa área certamente crescerá exponencialmente nos próximos anos. O atendimento dessa demanda vai depender do apoio continuado a grupos de pesquisa em proteínas e proteomas.

2.2. Proteínas

As proteínas são as moléculas orgânicas mais abundantes encontradas nas células, por serem essenciais a sua estrutura e função [13].

Dentre as funções das proteínas, pode citar o sistema de defesa, na qual age como anticorpos, a regulação de glândulas (função hormonal), catálises de reações, como no caso das enzimas e principal fonte de nitrogênio e enxofre no organismo. Isso nos mostra a importância biológica dessas moléculas, e o porquê de ser a classe mais complexa encontrada nos organismos [14,15].

Com relação a sua composição, todas as proteínas apresentam átomos de carbono, nitrogênio, oxigênio e hidrogênio [14,15]. São formadas por unidades monoméricas, chamadas de aminoácidos, onde apenas 20 tipos são encontrados em plantas e animais [16,17]. Estes apresentam um grupamento amina e um carboxílico, que são constantes de ionização. Por tanto, em solução aquosa, a carga líquida da proteína depende da constante de ionização dos aminoácidos e pH da solução. Em baixos valores de pH, o grupamento amina recebe prótons, enquanto que o carboxílico não é ionizado, resultando em carga líquida positiva. Já quando exposta a valores maiores de pH, o grupamento carboxílico é ionizado, mas o amina não é protonado, resultando em carga líquida nula, o que chamamos de ponto Isoelétrico (pI) da proteína (pH em que a molécula apresenta mesmo número de grupos carregados positivamente e negativamente) [18,19].

Os aminoácidos agrupam-se por ligações peptídicas, perdendo uma molécula de água; e por ligarem-se de inúmeras maneiras, geram uma gama de arranjos, possibilitando extensa variedade de moléculas protéicas [16,17]. Da estrutura central da proteína, projetam-se resíduos de aminoácidos, que conferem propriedades singulares a cada molécula [18]. A seqüência linear dos aminoácidos ligados contém a informação necessária para formar uma molécula protéica com estrutura tridimensional única. A complexidade da estrutura protéica é melhor analisada considerando-se a molécula em termos de quatro níveis de organização, denominados primário, secundário, terciário e quaternário [20,21]. Uma descrição de todas as ligações covalentes, principalmente ligações peptídicas e ligações dissulfeto, a união dos resíduos de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica é estrutura primária. O mais importante elemento da estrutura primária é sua seqüência de resíduos de aminoácidos. A estrutura secundária refere-se a

arranjos estáveis de resíduos de aminoácidos dando origem a padrões estruturais recorrentes. A estrutura terciária descreve todos os aspectos do enovelamento tridimensional do polipeptídeo. Quando uma proteína possui duas ou mais subunidades polipeptídicas, seu arranjo no espaço é referido como estrutura quaternária [21]. A Figura 1 ilustra esquematicamente os níveis de estruturas das proteínas.

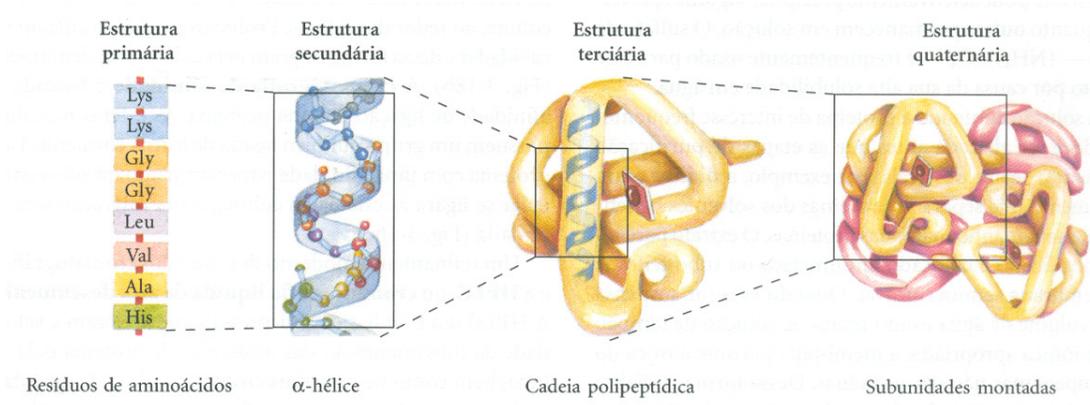


Figura 1: Níveis de estrutura e organização das proteínas [21].

Muitas proteínas contêm apenas resíduos de aminoácidos e nenhum outro constituinte químico, essas proteínas são consideradas proteínas simples. Entretanto, algumas proteínas contêm permanentemente associados outros componentes químicos além dos aminoácidos. Essas proteínas são chamadas de proteínas conjugadas. A parte não-aminoácido de uma proteína conjugada é usualmente chamada de seu grupo prostético. Usualmente o grupo prostético desempenha um papel importante na função biológica da proteína. Proteínas conjugadas são classificadas com base na natureza química dos grupos prostéticos. Por exemplo, as lipoproteínas contêm lipídios, as glicoproteínas contêm açúcares, e as metaloproteínas metais específicos [21]. Na Tabela 1 são apresentados alguns exemplos de proteínas conjugadas.

Tabela 1: Proteínas conjugadas [21].

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

2.2.1. Métodos para a determinação da concentração de proteínas totais

Muitas metodologias têm sido empregadas para a determinação da concentração de proteínas totais, porém não existe um método considerado universal para todos meios. Geralmente os métodos de maior utilização são o Biureto [22], Lowry [23], Bradford [24], BCA ou reagente de Smith [25] e de adsorção no ultravioleta [26].

A rapidez e alta sensibilidade o método de Bradford quando comparado aos outros possui um menor número de interferentes, sendo geralmente aplicado para amostras de tecidos vegetais, leite e plasma [27].

2.2.1.1. Método de Bradford

O método de Bradford [24] é uma técnica para a determinação de proteínas totais que baseia-se em interação entre corante Azul de Coomassie G-250 (CBBG) e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas (Figura 2).

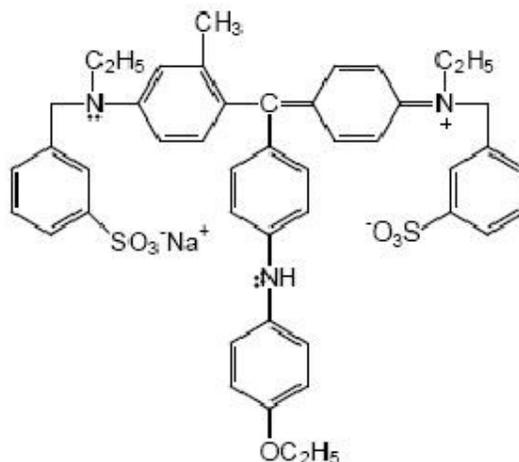


Figura 2. Estrutura do corante Azul de Coomassie, presente na composição do reagente de Bradford [28].

No pH de reação, a interação entre a proteína de alto massa molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante levando a molécula de CBBG, a princípio, para a forma neutra e, posteriormente, para a forma aniônica. Conseqüentemente, tem-se a supressão da absorção nos comprimentos de ondas de 465 e 645 nm e passa-se a formar um complexo azul bastante intenso que absorve fortemente em 595 nm, comprimento de onda no qual é realizada a leitura espectrofotométrica [28,29].

Existem poucas substâncias, citadas na literatura, que são interferentes no método de Bradford. Estes interferentes, normalmente, reagem com as proteínas impedindo a reação com o corante BG-250 ou reagem com o corante causando aumento

na absorvância. A Tabela 2 mostra os interferentes mais comuns ao método de Bradford [24]. Os métodos de eliminação destes interferentes variam conforme o caso, como discutido nas referências citadas na Tabela 2, no entanto, recomenda-se a precipitação das proteínas com ácido tricloroacético.

Tabela 2. Algumas substâncias que interferem na determinação de proteínas totais pelo método de Bradford.

Interferentes	Comentários	Referências
Tolbutamida	Provoca falso positivo.	[30]
Uréia	Fornecer resultado falso positivo, acima de 45 g/L.	[30,31,33]
Cloreto de sódio e de Potássio	Fornecem resultado falso negativo, acima de 1 M	[30,31,33]
Detergentes (Triton X-100, SDS, Tween-20)	A larga banda de absorção em 650 nm, devido a reação entre o corante e os detergentes, interfere na banda em 595 nm, resultando em falso positivo.	[34-36, 37,38]
Ciclodextrinas	Formam um complexo de inclusão com o corante BG-250, resultando em falso positivo.	[39]
Polifenóis e polifenóis	Reagem com as proteínas impedindo a formação dos oxidases complexo das mesmas com o corante BG-250.	[24, 40-42]
2-mercaptoetanol + Guanadina	Diminuem a absorção da amostra.	[24, 32]
Glicerol	Provoca falso positivo.	[24, 31,33]
Lipídios	Causam turbidez na amostra.	[33]
Cloropromazina	Provoca falso positivo.	[43]
Fluoreto	Diminui a absorção da amostra.	[44]

2.3. Metalômica

A proteômica envolve o estudo das propriedades das proteínas, tais como o nível de expressão, as modificações pós-translacionais e as interações, em ampla escala, de modo a obter uma visão global dos processos celulares [45].

Já a metalômica é um campo de pesquisa que deve estar relacionada com a genômica e a proteômica, pois a síntese e as funções metabólicas dos genes e das proteínas não ocorrem sem a presença de íons metálicos ou metaloenzimas, que são metaloproteínas que atuam como catalisadores biológicos na regulação das reações biológicas e das funções fisiológicas em células e órgãos [46]. 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 [46]. Na metalômica, são definidos como metalomas, os íons metálicos ou espécies metalóides presentes em sistema biológico (células, tecidos, fluidos ou organismos), na forma livre ou complexado [47].

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 [46].

O estudo de 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 incorporado ou a qual bioligante está complexado); (iii) as concentrações das espécies metálicas individuais presentes e (iv) a estrutura da biomolécula [46,47,48].

A informação metalômica pode ser classificada em (i) metalômica qualitativa, na identificação das espécies metálicas individuais; (ii) metalômica quantitativa determinação das concentrações destas espécies e (iii) metalômica comparativa monitoramento das alterações do metaloma de determinado organismo, sob a influência de estímulo externo. O estudo destas biomoléculas é denominado metaloproteômica [47].

Os estudos metalômicos, na visão analítica, consistem em três componentes principais: (i) a técnica de separação, isto é, a contribuição para o isolamento das espécies-alvo da matriz, denominada como componente de seletividade (ii) o detector específico para moléculas, objetivando a sua caracterização, denominado como

componente estrutural, e (iii) o detector sensível para a quantificação dos elementos, denominado como componente de sensibilidade [48].

2.4. Metaloproteínas e proteínas ligadas a metais

Embora os íons metálicos constituam pequena porção do tecido corporal (4%), são essenciais como componentes estruturais e em muitos processos vitais. Os papéis desses íons metálicos podem ser descritos como estrutural e funcional. No aspecto funcional, pode destacar seu papel de catalisador nos sistemas enzimáticos, através da ligação dos íons a substratos, orientando assim a reação, e a mediação nas reações de óxido-redução, através de mudanças reversíveis no estado de oxidação do íon metálico. No aspecto estrutural, desta-se o papel como integrantes de compostos orgânicos do corpo, tais como o ferro na hemoglobina, o iodo na tiroxina, o cobalto na vitamina B₁₂ e o enxofre na tiamina e na biotina, eles atuam na estabilização dessas biomoléculas, através da estabilização e ou proteção de cargas negativas. Existem funções nas quais o balanço de íons é importante, por exemplo, para a formação dos ossos, para a quantidade e a relação entre cálcio e fósforo, para a atividade muscular e para a relação entre cálcio e potássio no fluido extracelular. Os eletrólitos, dos quais os sais de sódio e potássio são os mais importantes, representam os principais fatores no controle osmótico do metabolismo da água [51-54].

As metaloproteínas e às proteínas ligadas a íons metálicos representam grande porção do número total de proteínas. Estima-se que aproximadamente 40% de todas as proteínas e enzimas requerem a presença de íon metálico para realizar atividade biológica [49,52]. Esses íons são responsáveis por muitos processos metabólicos, como conversão de energia na fotossíntese e respiração, expressão e regulação gênica, além de processos catalíticos, como ligação a substrato e ativação do mesmo, transporte e armazenamento [49].

As metaloproteínas são consideradas diferentes das proteínas ligadas a metais. As metaloproteínas constituem um grupo de proteínas que contêm um cofator metálico incorporado por meio de ligações específicas, caracterizando-se pela alta afinidade da interação metal-proteína. Já as proteínas ligadas a metais constituem um grupo de

proteínas onde os íons metálicos são incorporados por ligações não-específicas, caracterizando-se pela baixa afinidade da ligação metal-proteína, com isso essa ligação pode ser facilmente quebrada [49,50]. Fracamente ligados as proteínas, estão os íons monovalentes como o sódio e o potássio. De intensidade moderada temos o magnésio e o cálcio. Dentre os metais que apresentam forte ligação com as proteínas, mais frequentemente, estão os metais de transição, como o ferro, o cobre, o zinco, o manganês, o molibdênio e o cobalto, devido às suas propriedades (densidade, pequeno raio atômico e interação via eletromagnética e forças eletrostáticas), estão ligados à maioria das metaloproteínas [49,53,55-58].

Um outro grupo de metaloproteínas, de baixa massa molecular (6-7 kDa), são as chamadas metalotioneínas. As metalotioneínas apresentam alta afinidade não só com íons metálicos essenciais, como o cobre e o zinco, mas também com os metais potencialmente tóxicos, como o cádmio e o mercúrio. Estas metalotioneínas estão presentes em vertebrados, plantas, fungos, algas e até em bactérias metal-resistentes [48,49,55].

2.5. Tipos de eletroforese

Quando a eletroforese começou, há 60 anos, usava-se o método livre ou “moving boundary”. As proteínas eram separadas em meio líquido, sem quaisquer estabilizantes, sendo formado apenas pela solução tampão. Já entre as eletroforeses estabilizadas, separam-se dois grupos: aquelas que utilizam um suporte sólido (papel, gel de amido, acetato de celulose, poliacrilamida), e as estabilizadas em meio líquido por um gradiente, como a de sacarose [19,59].

Hoje, vemos o desenvolvimento da eletroforese em meios gelatinosos de poliacrilamida e agarose, a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) possibilitou o surgimento das eletroforeses descontínuas, que relacionam carga/massa molecular (PAGE-homogêneo e PAGE-gradiente), massa molecular (PAGE-SDS) e mobilidade líquida (PAGE-isotacoforese) [18,19,59].

2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida – 2D PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida, apesar de ser uma técnica de 1975, até o momento é a melhor método capaz de resolver mais proteínas simultaneamente. Esta técnica possui ótima resolução, podendo ser empregada em caracterização de sistemas biológicos e em seleção específica de pontos (spots) protéicos para posterior seqüenciamento ou identificação [19].

Esta técnica baseia-se na migração de partículas carregadas em determinado meio na presença de campo elétrico contínuo, sendo que a carga recebida por estas partículas pode resultar da ionização, dissociação ou associação com outras moléculas carregadas [19].

Na separação das proteínas alguns fatores influenciam na velocidade de migração ao longo da corrida eletroforética, por exemplo, a massa molar, a carga e a sua conformação. Nesta separação o sistema de 2D PAGE mostra-se eficiente, separando as proteínas em duas propriedades (Figura 3); na primeira etapa, uma primeira dimensão explora a propriedade da carga das proteínas, a qual se dá por meio da focalização isoelétrica (IEF), em que um gradiente de pH é formado no gel. Na segunda etapa, segunda dimensão, explora a propriedade massa molar (MM) das proteínas em condição desnaturante, ou seja, na presença do detergente docecil sulfato de sódio (SDS). Cada “spot” resultante no gel 2-D PAGE corresponde a única espécie protéica presente na amostra [60].

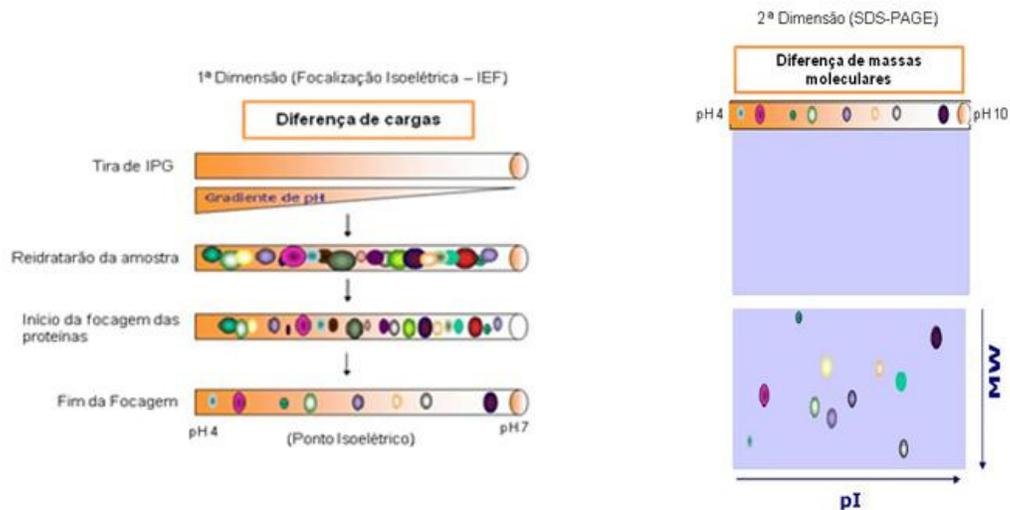


Figura 3. Sequência das etapas que envolve a separação de proteínas por eletroforese em primeira e segunda dimensões [61].

Para compreender melhor a separação das proteínas por 2D PAGE, faz-se necessário esclarecer que na eletroforese com focalização isoelétrica o objetivo é separar as proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos (pI), sendo que o pI é o pH no qual a molécula apresenta uma carga de rede igual a zero, ou seja, um gradiente de pH é formado durante a focalização isoelétrica e as partículas carregadas, sob a influência do campo elétrico, movem-se através do gel até alcançarem seu pI, quando não mais migrarão [18,49,62]. Na eletroforese em gel em condições desnaturantes (SDS-PAGE), o surfactante (SDS) atua de modo a igualar a carga e a forma das proteínas, de modo que o elemento de distinção entre elas passa a ser sua 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 protéica facilitando o acesso do SDS e conferindo uma forma similar ao conjunto de proteínas [19,60]. Portanto a 2D PAGE é a combinação da eletroforese IFE PAGE e SDS PAGE.

A poliacrilamida é uma matriz de gel que possui características importantes como, por exemplo, ser um material quimicamente inerte, transparente e estável em uma ampla faixa de pH, temperatura e força iônica. Esta matriz é formada pela

copolimerização de entre acrilamida e N,N'-metilenobisacrilamida, na presença de persulfato de amônio e TEMED [18,19].

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

2.7. Preparo de amostra para a separação por eletroforese bidimensional

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 uma proteína individual. Portanto, o preparo de amostra apropriado é absolutamente necessário para a obtenção de boa resolução na separação das proteínas por 2D PAGE [63,64]. Um procedimento deverá ser determinado empiricamente para cada tipo de amostra, em função, da grande diversidade de tipos de proteínas na amostra e origens [60].

Para que as proteínas intracelulares sejam analisadas, inicialmente devem ser rompidas as células do material biológico. O rompimento celular pode ser de três tipos, isto é, do tipo mecânico (maceração ou sonicação), químico (na presença de detergentes) e biológico (enzimático) [60]. 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 [63,64].

Alguns compostos interferentes, tais como proteases, sais, lipídios, ácidos nucléicos, polissacarídeos, pigmentos fenólicos e/ou proteínas muito abundantes, após ou durante o rompimento celular devem ser removidos ou inativados [63,64].

Por estarem ligados às proteínas que serão analisadas, os compostos interferentes afetam a solubilização e/ou o processo eletroforético (com isso prejudica a separação das mesmas) ou por prejudicarem o processo eletroforético em si [64].

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 [60,63].

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 [60].

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 [63]. 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 3 apresenta os principais reagentes utilizados nesta finalidade com as respectivas funções [63,64].

Tabela 3. Principais substâncias utilizadas na solubilização de proteínas [63].

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.

2.8. Tratamento de imagens dos géis

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

A alta variação que existe entre os géis é o principal problema nos estudos comparativos, decorrentes da variabilidade extrínseca de amostras biológicas e outros fatores, como, o método empregado para a marcação das proteínas no gel, o preparo de amostra, a quantidade de proteínas totais aplicada, e pode ser que um dos fatores mais relevantes seja a polimerização do gel. No entanto, inúmeros fatores podem influenciar como: a temperatura em que ocorre a polimerização, a pureza e a concentração dos reagentes, tempo de formação do polímero, e outros. Portanto, o processo de comparação entre géis, que é realizada pela comparação de imagens dos géis obtidas por registradores de imagens específicos, é um processo árduo, que exige bastante atenção, paciência e cuidado experimental [65].

Nos estudos de Eravci *et al* [66] e Choe *et al* [67] as análises afirmam que somente variações quanto a expressão de proteínas no gel são usualmente 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.

Portanto, devem ser tomados cuidados adicionais para realizar uma confiável análise comparativa, por exemplo, uniformidade da densidade de fundo no gel, a qual deve ser baixa em relação à densidade dos “spots”.

2.9. Espectrometria Atômica de Raio X

Originalmente o termo espectroscopia designava o estudo da interação entre radiação e matéria como uma função do comprimento de onda (λ) [68].

De fato, historicamente, muitos elementos químicos foram descobertos por meio da espectroscopia, que se refere ao uso de luz visível dispersa de acordo com o comprimento de onda. A amostra geralmente é excitada aplicando energia na forma de calor, energia elétrica, luz, partículas ou por uma ação química. O analito antes do estímulo encontra-se no estado de energia fundamental, o estímulo então faz com que algumas das espécies do analito sofram uma transição para um estado de maior energia ou estado excitado. Assim, obtemos informações sobre o analito medindo a radiação eletromagnética emitida quando este retorna ao estado fundamental ou a quantidade de radiação eletromagnética absorvida decorrente da excitação [68,69].

Os métodos espectroscópicos de análise são baseados na medida da quantidade de radiação produzida ou absorvida pelas moléculas ou pelas espécies atômicas de interesse [68]. Classificam-se métodos espectroscópicos de acordo com a região do espectro eletromagnético envolvida na medida, algumas regiões empregadas incluem os raios γ , os raios X, ultravioleta/visível, infravermelho, microondas e radiofrequência [68].

Os raios X constituem uma radiação eletromagnética de comprimento de onda curto produzida pela aceleração ou desaceleração de elétrons de alta energia ou pelas transições de elétrons dos orbitais internos dos átomos. O intervalo de comprimento de onda dos raios X está na faixa de 10^{-5} Å até 100 Å; a espectrometria convencional utiliza raios X na região de 0,1 Å até 25 Å ($1 \text{ Å} = 0,1 \text{ nm} = 10^{-10} \text{ m}$) [69].

É chamado de espectroscopia de raios X métodos utilizados para análises de elementos químicos presentes na estrutura química de compostos inorgânicos e/ou de grupos funcionais de uma substância orgânica utilizando radiação eletromagnética. Esta técnica baseia-se em cinco tipos de métodos: emissão, absorção, espalhamento, fluorescência e difração da radiação eletromagnética, pode ser destrutivos ou não destrutivos. Os métodos mais interessantes são os que não destroem as amostras [68,69].

Os métodos de absorção de raios X e de fluorescência de raios X são largamente usados para análises qualitativas e quantitativas dos elementos da tabela periódica que

possuem número atômico maior que do sódio. Com equipamentos especiais, também podem ser determinados os elementos com número atômico entre 5 e 10 [68].

A espectrometria de fluorescência de raios-X é uma técnica não destrutiva, na qual o preparo da amostra é simples e rápido. Esta técnica é multielementar, os elementos da amostra são excitados pela absorção de um feixe primário de raios-X e, então, emitem linhas características de fluorescência. A fluorescência emitida é detectada e identificada de acordo com sua energia usando um detector que separa cada componente do espectro por energia ou comprimento de onda [70,71].

Quando maior sensibilidade e resolução são necessários para a identificação dos elementos, emprega-se a fluorescência de raios X com radiação Síncrotron (SR-XRF).

2.9.1. Fluorescência de raios-X com radiação Síncrotron (SR-XRF)

A radiação síncrotron, como fonte de raios-X, apresenta alta intensidade (10³ a 10⁶ vezes mais intensa que as fontes convencionais), é altamente colimada e linearmente polarizada no plano orbital do elétron. Ela é formada a partir da radiação eletromagnética emitida por elétrons altamente energéticos, que circulam em um acelerador ou anel de armazenamento. Esta técnica permite atingir limites de detecção absolutos da ordem de 10⁻¹⁵ g e limites de detecção relativos com valores menores do que 10 ng g⁻¹, em amostras contendo alguns microgramas dos elementos a serem identificados [73].

Gao *et al.* empregaram fluorescência de raios X com radiação síncrotron (SR-XRF) para a detecção de íons metálicos nas proteínas de citosol de fígado humano para a determinação de ferro, cobre e zinco. O procedimento adotado incluía a separação das proteínas por cromatografia de filtração em gel e também por IEF. Em trabalho mais recente dos mesmos autores, a SR-XRF também foi empregada na análise de proteínas de citosol de fígado humano, porém, neste estudo, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE, sendo que o gel obtido foi imediatamente seco após a corrida eletroforética. Com o uso desta metodologia, foi possível distinguir 35 bandas de proteínas, além da identificação e comparação da distribuição dos íons Cu²⁺, Fe²⁺ e Zn²⁺ em várias metaloproteínas. Kühbacher *et al.* utilizaram a SR-XRF na determinação da distribuição de selênio em proteínas de testículos de ratos, previamente separadas por

SDS-PAGE e transferidas para uma membrana pelo processo de blotting. Neste trabalho, os autores utilizaram a mesma técnica para determinar a distribuição espacial de alguns íons metálicos em seções cerebrais de ratos infectados com “scrapie”, que é uma doença neurodegenerativa. Este método mostrou-se bastante adequado para a determinação dos padrões de distribuição de elementos em baixas concentrações em proteínas separadas por eletroforese e em preparações histológicas de tecidos. Recentemente, foi feito o mapeamento de proteínas provenientes de calos embriogênicos de *Citrus*, previamente separadas por SDS-PAGE, utilizando a microfluorescência de raios-X com fonte de radiação síncrotron. A quantificação dos íons metálicos Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , K^+ e Zn^{2+} foi realizada empregando-se a fluorescência de raio-X com reflexão total da radiação síncrotron (SR-TXRF), dos íons metálicos Mg^{2+} e Ca^{2+} empregando-se a Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS) e de Na^+ empregando-se a Flame Atomic Emission Spectrometry (FAES). As análises qualitativas e quantitativas mostraram concordância entre os resultados, sendo que o Fe^{2+} e o Mg^{2+} foram detectados em duas bandas de proteínas, indicando que estes íons metálicos tem papel importante em processos bioquímicos, nos quais proteínas participam. Desta forma os autores avaliaram a técnica como sendo promissora para a pesquisa de metaloproteínas bem como estudar os elementos traços relacionados a doenças [72-75].

2.9.2. Radiação de Síncrotron

A radiação de Síncrotron é formada a partir da radiação eletromagnética emitida por elétrons altamente energéticos, que circulam em um acelerador ou anel de armazenamento. Segundo Souza G.G.B. [70], a radiação Síncrotron é uma fonte de raios-X que possui elevada intensidade (103 a 106 vezes mais forte que a fonte de raios-X convencional), que abrange ampla faixa do espectro eletromagnético (desde o infravermelho até os raios-X), além de polarização linear altamente colimada.

Em Campinas – SP, o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) inaugurado em 1997, hoje é um complexo de laboratórios centrado em torno da fonte de luz síncrotron, os elétrons possuem uma energia de 1,37 GeV. Para produzir estes elétrons, utiliza-se canhão eletrostático, onde os elétrons são gerados e pré-acelerados a

energia de 80 mil eV, onde eles são acelerados em acelerador linear (LINAC), até atingir a energia de 120 megaelectronvolts (MeV). Em seguida, são transportados para um acelerador circular intermediário, o síncrotron injetor, onde adquirem a energia de 500 MeV. Para atingir a energia final, os elétrons são transportados para o anel de armazenamento onde, primeiro, são acelerados até atingir a energia de 1,37 bilhões de eV e ficam então armazenados por várias horas (aproximadamente 14 horas) [76].

A luz Síncrotron é resultado do desvio da trajetória do feixe de elétrons realizado pela ação de eletroímãs presentes no anel de armazenamento (quando ocorre com a luz sendo emitida tangencialmente à curvatura dos elétrons). Este anel, nada mais que, um poliedro, formado por seis seções retas e seis pontos de inflexão da trajetória, permitindo completar a circunferência. Para realizar os experimentos foram construídas linhas de luz que tem como função coletar a luz Síncrotron, selecionar o comprimento de onda de interesse e a focalizar. Para o tipo de pesquisa e do experimento a ser realizado depende da faixa da energia definida para cada linha de luz. No entanto, luz Síncrotron pode ser utilizada em estudos de várias áreas, tais como; química, biologia, medicina, física e outras. [76,77]

As linhas de luz são selecionados e focalizados nos comprimentos de onda de interesse. No seu final são acopladas estações experimentais, que permitem então a análise do material desejado [77]. Considerando todas as linhas disponíveis, isto é, as onze linhas destaca-se a linha de fluorescência de raios-X - XRF (D09B – implementada em 1998) empregada neste trabalho.

Na estação experimental da linha XRF do LNLS, o feixe de luz é focalizado, que permite a criação de feixe com diâmetro da ordem de μm . Assim tornando possível verificar áreas microscópicas conseguindo ter informações sobre a distribuição de espécies químicas presentes [78]. Portanto, a amostra é colocada em plataforma que controla o seu posicionamento por meio de um sistema de controle remoto que a movimenta nos eixos X, Y e Z. Ainda, na estação experimental há uma câmera acoplada a um microscópio óptico convencional que possibilita monitorar a amostra antes e durante o processo de aquisição de dados. [79]. Geralmente são utilizados filtros de alumínio (com a finalidade de diminuir a intensidade do feixe de luz) para que não danifiquem os componentes da linha. Com isto, na linha da fluorescência do LNLS

somente é possível detectar espécies químicas que possuam números atômicos maiores que do alumínio.

O sistema de detecção é formado por detectores de Ge ou Si/Li, na posição de 90° no feixe de luz. Estes detectores são usados para converter a energia de fótons de raios-X em pulsos de voltagem [77,79].

3. Referências Bibliográficas

- [1] GONÇALVES, S.G.; PEZZATO, L.D.; PADILHA, P.M.; BARROS, M.M. Disponibilidade aparente do fósforo em alimentos vegetais e suplementação da enzima fitase para tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p.1473-1480, 2007.
- [2] SA, M.V.C.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; PADILHA, P.M. Relative bioavailability of zinc in supplemental inorganic and organic sources for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Nutrition**, v.11, p.273-281, 2005.
- [3] ANDERSON, L.; DEBBLE, M.V.; TURKKI, P.R.; MITCHELL, H.S.; RYNBERGEN, H.J. **Nutrição**. 17ª ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1988. 737p.
- [4] GARCIA, J.S.; MAGALHÃES, C.S.; ARRUDA, M.A.Z. Trends in metal-binding ad metalloprotein analysis. **Talanta**, v.69, p.1-15, 2006.
- [5] SZPUNAR, J. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.378, p.54-56, 2004.
- [6] HARAGUCHI, H. Metallomics as integrated biometal science. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v.19, p.5-14, 2004.
- [7] JAKUBOWSKI, N.; LOBINSKI, R.; MOENS, L. Metallobiomolecules. The basis of life, the challenge of atomic spectroscopy. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.19, p.1-4, 2004.
- [8] ESCOBAR, H.; MIRANDA, L. Depois do genoma, a corrida pelo proteoma. **O Estado de São Paulo**, 13/02/2001.
- [9] KAZMI, S.; KRULL, I. S. Proteomics and the current state of protein separations science, Part one. **Pharma Gennomics**, p. 14-29, August, 2001.
- [10] BELIZARIO, J. E. Proteoma: o desafio do século 21. **Ciências Hoje**, v. 27, n. 162, p. 78-81, junho, 2000.
- [11] LANÇA, F. M.; SILVA, J. C. R.; BICUDO, R. C.; NETO, B. M. A química analítica do proteoma. **Analytica**, n. 6, p. 60-66, 2003.

- [12] <http://www.waldolar.triang.net.Proteoma.Acesso> em 10/03/2003.
- [13] LEHNINGER, A. B.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995.
- [14] LEHNINGER, A. B.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- [15] BLOOMFIELD, M. M. **Chemistry and the living organism**. 5.ed. New York: John Wiley & Sons, 1992.
- [16] VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentals of biochemistry**. London: John Wiley & Sons, 1999.
- [17] HOLME, D. J.; PECK, H. **Analytical biochemistry**, New York: Longman, 1998.
- [18] MELVIN, M. **Electrophoresis**. Chichester: John Wiley & Sons, 1987. p. 130-150.
- [19] SILVA JÚNIOR, J. G. **Eletroforese de proteínas – guia teórico-prático**. Rio de Janeiro: Interciência, p. 125, 2001.
- [20] CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 544.
- [21] LEHNINGER, A. B.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2006.
- [22] GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal Biological Chemistry**, v. 177, p. 751-751, 1949.
- [23] LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenon reagent. **Journal Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- [24] BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

- [25] SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C.; **Analytical Biochemistry** p. 150, 76, 1985.
- [26] STOSCHECK, C. M.; In *Methods in Enzymology*; Deutscher, M. P., Ed.; **Academic Press Inc.**; New York, 1990.
- [27] ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J.; Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes, **Quim. Nova**, p. 787-793, v. 21, 1998.
- [28] COMPTON, S. J.; JONES, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay, **Anal. Biochem.**, p. 369-374, 1985.
- [29] SPLITTGERBER, A. G.; SOHL, J.; Non linearity in protein assays by the coomassie blue dye-binding method, **Anal. Biochem.** p. 198-201, 1989.
- [30] LOTT, J. A.; STEPHAN, V. A.; PRITCHARD JR., K. A.; **Clin. Chem.**, 29, 1946; 1983.
- [31] STOSCHECK, C. M.; **Anal. Biochem.**, p. 184, 111; 1990.
- [32] GOTHAM, S. M.; FRYER, P. J.; PATERSON, W. R.; **Anal. Biochem.**, p. 173, 353; 1988.
- [33] PANDE, S. V.; MURTHY, M. S. R.; **Anal. Biochem.** p. 220, 424; 1994.
- [34] COMPTON, S. J.; JONES, C. G.; **Anal. Biochem.**, p. 151, 369; 1985.
- [35] GOGSTAD, G. O.; KRUTNES, M. B.; **Anal. Biochem.**, p. 126, 355; 1982.
- [36] FANGER, B. O.; **Anal. Biochem.**, p. 162, 11; 1987
- [37] ROSENTHAL, K. S.; KOUSSALE, F.; **Anal. Chem.**, p. 1115; 1983
- [38] FRIEDENAUER, S.; BERLET, H. H.; **Anal. Biochem.** p. 178, 263; 1989.
- [39] XU, P. P.; TROUPE, C. M.; SHARMA, A.; **Microchem. J.**, p. 49, 85; 1994.

- [40] MARKS, D. L.; BUCHSBAUM, R.; SWAIN, T.; **Anal. Biochem.**, p. 147, 136; 1985.
- [41] MATTOO, R. L.; ISHAQ, M.; SALEEMUDDIN, M.; **Anal. Biochem.**, p. 163, 376; 1987.
- [42] GODSHALL, M. A.; **J. Food Sci.**, p. 48, 1346; 1983
- [43] MARSHALL, T.; WILLIAMS, K. M.; **Anal. Biochem.**, p. 198, 352; 1991.
- [44] CHEUNG, C. K.; CHAN, K. W.; CHAN, A. Y. W.; **Clin. Chem.** p. 36, 2011; 1990.
- [45] BLACKSTOCK, W.P.; WEIR, M.P. Proteomics: quantitative and physical mapping cellular proteins, **Trends Biotechnology**. v. 17, p. 121-127, 1999.
- [46] HARAGUCHI, H. Metallomics as integrated biometal science, **J. Anal. At. Spectrom.** v. 19, p. 5-14, 2004.
- [47] SZPUNAR, P. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry, **Anal. Bioanal. Chem.** v. 378, p. 54-56. 2004.
- [48] GÓMEZ-ARIZA, J.L.; GARCIA-BARRERA, T.; LORENZO, F.; BERNAL, V.; VILLEGAS, M.J.; OLIVEIRA, V. Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems, **Anal. Chim. Acta.** n. 524, p. 15-22, 2004.
- [49] GARCIA, J. S.; MAGALHÃES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. **Talanta**, v. 69, p. 1-15, 2006.
- [50] GAO, Y.; CHEN, C.; ZHANG, P.; CHAI, Z.; HE, W.; HUANG, Y. Detection of metalloproteins in human liver cytosol by synchrotron radiation X-ray fluorescence after sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 485, p. 131-137, 2003.
- [51] ANDERSON, L.; DEBBLE, M. V.; TURKKI, P. R.; MITCHELL, H. S.; RYNBERGEN, H. J. **Nutrição**. 17. ed., Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 737 p.
- [52] ROMANOWSKI, S. M. M.; MANGRICH, A. S.; NEVES, A. Síntese e caracterização de novos compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes não-

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

[53] VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentals of biochemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2002. 931 p.

[54] FENTON, D. E. **Biocoordination chemistry**. New York: Oxford Chemistry Primers, 1995. 96 p.

[55] VALLEE, B. L. Metallothionein historical review and perspectives. In: KAGI, J. H. R.; NORDBERG, M. (Eds.). **Metallothionein**. Switzerland: Birkhauser, p.19-40, 1979.

[56] KAGI, J. H. R.; SCHAFFER, A. Biochemistry of metallothionein. **Biochemistry**, v. 27, p. 8509-8515, 1988.

[57] STILLMAN, M.J.; SHAW, C.F.; SUZUKI, K.T. **Metallothioneins**. (Eds.). New York: VCH, 1992. p. 1-13.

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

[59] NAOUM, P. C. **Eletroforese**. São Paulo: Editora Santos, 1990. 174 p.

[60] BERKLMAN, T.; STENSTEDT, T. 2-D Eletrophoresis using immobilized pH gradients: principles and methods. **Amersham Biosciences**, Uppsala 1998.

[61] Eletroforese bidimensional e análise proteomas, disponível em < <http://www.e-escola.pt/ftema.asp?id=116&canal=5> > acesso em 07 de janeiro 2010.

[62] COPELAND, R. A. **Methods for protein analysis**. New York: Chapman & Hall, 1994.

[63] GORG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, p. 3665-3685, 2004.

- [64] 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, no prelo, cap.IX..
- [65] BERTH, M.; MOSER, F.M.; KOLBE, M.; BERNHARDT, J.. The state of the air in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images, **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 76, p. 1223-1243, 2007.
- [66] 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.
- [67] 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.
- [68] SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos da Química Analítica**, 8. ed., p. 796-826, 2006.
- [69] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. , p. 252-274. 2002.
- [70] SOUZA, G. G. B.; SANTOS, A. C. F.; ROCCO, M. L. M.; LUCAS, C. A., BOECHAT-ROBERTY, H. M.; BRITO, A. N. Fragmentação de moléculas pela luz Síncrotron e por elétrons rápidos. **Química Nova**, n. 3, p. 311, 2001.
- [71] LAKOWICZ, J. R., **Principles of Fluorescence Spectrometry**. New York: Kluwer Academic, 1999.
- [72] VAN LANGEVELD, R. D. Trace-element determinations using a 15-keV synchrotron X-ray microprobe. **Anal. Chem.**, v. 63, p. 2253-2259, 1991.
- [73] GAO, Y., CHEN, Z., ZHAO, J., HUANG, Y. Detection of metalloproteins in human liver cytosol by synchrotron radiation X-ray fluorescence combined with gel filtration chromatography and isoelectric focusing separation. **Analyst**, v. 127. p. 1700-1704, 2002.
- [74] KUNBACHER, M., WESELOH, G., THOMZIG, A., BERTELSMANN, H., BEHNE, D. Analysis and localization of metal and metalloid-containing proteins by synchrotron radiation X-ray fluorescence spectrometry. **X-Ray Spectrom.**, v. 34, 112-117, 2005.

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

[76] IVANISSEVICH, A. Nova luz sobre a matéria. **Ciência Hoje**, n. 32, p. 44, 2003.

[77] BRUM, J. A. A pesquisa em nanociências e nanotecnologia no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. **Nanociências e Nanotecnologia**, 2002. Disponível no site <http://www.comciencia.br/reportagens/nanotecnologia/nano18.htm>, acesso em 18/11/09.

[78] PEREZ, C. A.; RADTKE, M.; SANCHEZ, H. J.; TOLENTINO, H.; NEUENSHWANDER, R. T.; BARG, W.; RUBIO, M.; BUENO, M. I.; RAIMUNDO, I. M.; ROHWEDDER, J. J. R., Synchrotron radiation x-ray fluorescence at the LNLS: Beamline instrumentation and experiments. **X-Ray Spectrometry**, n. 28, p. 320, 1999.

[79] PEREIRA FILHO, E. R.; PEREZ, C. A.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z., Metals distribution and investigation of L'vov platform surface using principal component analysis, multi-way principal component analysis, micro synchrotron radiation X-ray fluorescence spectrometry and scanning electron microscopy after determination of Al in a Milk slurry sample. **Spectrochimica Acta Part B**, n. 57, p. 1259, 2002.

Com base na revisão literária apresentada, objetivou-se, com o presente trabalho **“DETERMINAÇÃO DE MANGANÊS E ZINCO EM SPOTS PROTÉICOS DE PLASMA DE TILÁPIA DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) POR SR-XRF E GFAAS APÓS SEPARAÇÃO POR 2D-PAGE”**

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

- b) Mapear “spots” protéicos por SR-XRF para identificação qualitativa de íons Mn e Zn

- c) Quantificar Mn e Zn por GAAFS nos “spots” protéicos

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

Capítulo - II

Determinação de manganês e zinco em “spots” protéicos de plasma de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por SR-XRF e GFAAS após separação por 2D-PAGE

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo investigar a presença de manganês e zinco em “spots” protéicos de amostras de plasma de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) obtidos após separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida em segunda dimensão (2D-PAGE) para posterior avaliação qualitativa e quantitativa utilizando fluorescência de raios-X com radiação síncrotron (SR-XRF) e espectrometria de absorção atômica em chama e em forno de grafite (FAAS/GFAAS). As análises dos espectros de fluorescência indicaram a presença de manganês e zinco em quatro e seis “spots” protéicos de plasma, respectivamente. Observou-se que os íons metálicos estão ligados em proteínas com massa molar na faixa de 19 a 70 kDa e com pI na faixa de 4,7 a 6,30. A concentração de manganês e zinco ligados a essas proteínas foi determinada por GFAAS após a mineralização ácida dos spots protéicos, encontrando-se concentrações na faixa de 3,40 a 4,20 mg g⁻¹ e 2,30 a 13,90 mg g⁻¹, respectivamente.

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

Abstract

The aim of the present study was to investigate the presence of manganese and zinc in protein spots in samples of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) plasma obtained after protein separation by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D PAGE) and subsequent qualitative and quantitative determination by synchrotron radiation X-ray fluorescence (SRXRF) and graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). An analysis of the fluorescence spectra indicated the presence of manganese and zinc in four and six plasma protein spots, respectively. It was observed that the metal ions are bound in proteins with molecular weight ranging from 19 to 70 kDa and pI ranging from 4.7 to 6.30. The manganese and zinc concentrations bound to these proteins were determined by GFAAS after acid digestion of protein spots, finding concentrations ranging from 3.40 to 4.20 mg g⁻¹ and 2.30 to 13.90 mg g⁻¹, respectively.

Keywords: Metalloproteins, two-dimensional electrophoresis, synchrotron radiation, X-ray fluorescence, graphite furnace atomic absorption spectrometry, tilapia Nilo.

Introdução

A produção mundial de pescado procedente da aquicultura é estimada em 47 milhões de toneladas, das quais 28 milhões são decorrentes do cultivo em águas continentais, principalmente dos países tropicais, como o Brasil. Das espécies ícticas criadas em ambientes tropicais de água doce destacam-se as tilápias com produção mundial que supera dois milhões de toneladas [1]. Nos últimos anos no Brasil ocorreu considerável aumento na produção de tilápias, o que tem levado os pesquisadores em aquicultura a desenvolverem trabalhos relacionados ao comportamento, fisiologia, genética e nutrição dessa espécie de peixe [1-3]. É consenso entre os pesquisadores a fundamental importância dos íons metálicos como componentes estruturais e funcionais dos peixes, como por exemplo, no aspecto estrutural o cobre e o zinco presentes nas metalotioninas e no aspecto funcional o papel catalisador que esses íons exercem nos sistemas enzimáticos [4-7]. Os íons metálicos ligados às proteínas e metaloproteínas representam grande porção do número total de proteínas. Estima-se que aproximadamente 40% das proteínas e enzimas requerem a presença do íon metálico para realizar alguma atividade biológica [8].

Atualmente, o desenvolvimento de metodologias analíticas que permitam avaliação segura das metaloproteínas e/ou proteínas ligadas à metais presentes no sangue e em tecidos de animais é de fundamental importância, principalmente considerando que alguns nutrientes metálicos apresentam faixa de essencialidade e toxicidade próximas e que são transportados em nível celular por diferentes proteínas [9,10]. Devido à importância que essas biomoléculas exercem sobre as atividades biológicas dos seres vivos, uma nova área científica, denominada metalômica foi proposta e permitiu a integração de estudos analíticos integrados com estudos inorgânicos e bioquímicos [11]. O estudo da metalômica das espécies de peixes poderá fornecer informações valiosas sobre como um íon metálico está distribuído e coordenado às proteínas, como da concentração individual da espécie metálica, contribuindo para elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais dessas biomoléculas [8,11-13].

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo investigar manganês e zinco em “spots” protéicos de amostras de plasma de tilápia do Nilo

(*Oreochromis niloticus*) obtidos após separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida em segunda dimensão (2D-PAGE) e posterior avaliação qualitativa e quantitativa utilizando fluorescência de raios-X com radiação síncrotron e espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.

Experimental

Equipamentos

Além de vidrarias convencionalmente utilizadas em laboratório de Química Analítica, foram empregados os seguintes equipamentos e acessórios para o desenvolvimento do trabalho: Espectrofotômetro UV/Visível, marca ThermoSpectronic, modelo Genesys 6, (Rochester, EUA), sistema para eletroforese 2D-PAGE, marca GE Healthcare, modelo Ettan™ DaltSix (Uppsala, Suécia), sistema para focalização isoeletrica, marca Amersham Biosciences, modelo EPS1001 (Uppsala, Suécia), Scanner (GE Healthcare), Espectrômetro de absorção atômica Shimadzu, modelo AA-6800 (Tokyo, Japão), Forno de Microondas Provecto Analítica, modelo DGT 100 plus (Campinas/São Paulo, Brasil).

Reagentes e Soluções

Água ultrapura ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida pelo sistema Elga modelo PURELAB Ultra Ionic foi utilizada em todo o trabalho no preparo das soluções. Ácidos acético (J. T. Backer) e fosfórico (Mallinckodt) de pureza analítica, nítrico e clorídrico (Merck) de grau espectroscópico foram utilizados em todo o trabalho no preparo das soluções utilizadas nas separações eletroforéticas. Todos os solventes orgânicos utilizados (e.g. etanol, acetona, metanol) foram de pureza analítica e de procedência Merck. As soluções utilizadas nas separações eletroforéticas e nas determinações de proteína total foram preparadas com reagentes de pureza analítica de procedência Amersham Biosciences. Todas as soluções foram estocadas em frascos de polipropileno e/ou vidro,

sendo que as soluções utilizadas nas separações eletroforéticas foram guardadas em refrigerador a 4 °C (e.g.) ou em freezer a -20 °C.

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

Coleta e preparo das amostras

O pool de amostras de plasma foi obtido a partir de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, Botucatu/SP. Ao final do manejo alimentar, os peixes foram anestesiados, com solução de benzocaína (100 mg L⁻¹) para coleta de sangue do vaso caudal com auxílio de seringa de 1,0 mL para obtenção da amostra de plasma. Após a coleta, o sangue foi transferido para tubos do tipo Eppendorf[®], o qual continha K₂EDTA (3,0%) que foi utilizado como anticoagulante. O sangue foi então centrifugado a 13.000 rpm durante 5 minutos em ultracentrífuga refrigerada para obtenção do plasma, em seguida amostras foram armazenadas a -20 °C.

Preparação das amostras para eletroforese

As amostras de plasma após procedimento de separação do sangue foram submetidas ao processo de remoção de albumina por meio do uso de “kit” de remoção de albumina (Millipore), visto que essas amostras apresentam altas concentrações de albumina [14,15]. Após o procedimento de remoção de albumina, as amostras estão prontas para serem quantificados os teores totais de proteínas e para os procedimentos das corridas eletroforéticas. Para quantificação do conteúdo protéico nas amostras, foi feita a precipitação das proteínas utilizando-se solução gelada de acetona 80% (v/v) na proporção de 1:4 (amostra:acetona). Essa precipitação foi conduzida durante três horas a 5 °C, garantindo que a precipitação ocorresse de maneira quantitativa. Em seguida, o precipitado protéico foi centrifugado a 10.000 rpm em ultracentrífuga refrigerada

(BioAgency) por 10 minutos e o sobrenadante foi retirado. Esse precipitado protéico foi lavado mais duas vezes com a solução de acetona gelada utilizada para a precipitação. Após estes procedimentos parte dos precipitados protéicos foi ressolubilizada em solução de NaOH a $0,50 \text{ mol L}^{-1}$, para quantificação do teor total de proteínas, e outra parte dos precipitados foi ressolubilizada em tampão contendo uréia a 7 mol L^{-1} , tiouréia a 2 mol L^{-1} , CHAPS a 2% (m/v), anfólitos de pH 3 a 10 a 0,5% (v/v), azul de bromofenol a 0,002% e 2,8 mg de DTT, para ser utilizada nas corridas eletroforéticas [13].

Determinação da concentração das proteínas totais

A concentração de proteínas totais na amostra de plasma foi determinada de acordo com o método de Bradford [11]. Curvas analíticas de calibração foram feitas na faixa de 25 a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ a partir de solução padrão estoque de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Albumina de Soro Bovino, com o mesmo tampão utilizado na ressolubilização das proteínas. Quando necessário, as amostras foram diluídas com o mesmo tampão. Em cubetas de vidro foram adicionados $200 \mu\text{L}$ de padrão/amostra diluída apropriadamente, e 2,5 mL do reagente de Bradford. Após 5 min de reação, as leituras de absorbância foram medidas a 595 nm em espectrofotômetro.

Separações eletroforéticas

Antes do início das separações eletroforéticas volumes $250 \mu\text{L}$ dos extratos protéicos de plasma (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 ou 4 a 7. Essas fitas foram colocadas em um aparato, sobre o qual permaneceu por 12 horas, a temperatura ambiente, para serem rehidratadas com o extrato protéico. Além do extrato protéico foram adicionados cerca de $900 \mu\text{L}$ de óleo mineral sobre essas fitas. Após este período, a fita rehidratada foi levada ao sistema para focalização isoeletrica para corrida em primeira dimensão da eletroforese bi-dimensional, utilizando a seguinte programação de tensão: Etapa 1 = 500 V, com acúmulo de 500 Vh; Etapa 2 = 1000 V, com acúmulo de

800 Vh; Etapa 3 = 10000 V, com acúmulo de 11300 Vh; Etapa 4 = 10000 V, com acúmulo de 3000 Vh.

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

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

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

Determinação qualitativa de manganês e zinco por SR-XRF nos “spots” protéicos das amostras de plasma

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

Determinação quantitativa de manganês e zinco nos “spots” protéicos das amostras de plasma por GFAAS

A quantificação de manganês e zinco nos “spots” protéicos das amostras de plasma foi feita por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite após mineralização das amostras. Nessas determinações foi utilizado espectrômetro de

absorção atômica SHIMADSU modelo AA-6800, equipado com corretor de absorção de fundo com lâmpada de deutério e sistema self-reverse (SR), tubo de grafite pirolítico com plataforma integrada e amostrador automático ASC-6100. Foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco de manganês e zinco SHIMADSU, operada com 10 mA de corrente. O comprimento de onda utilizado foi de 279,5 nm para o manganês e 213,8 nm para o zinco, com resolução espectral de 0,5 nm. Argônio foi utilizado como gás inerte, mantendo-se um fluxo constante de 1 L min⁻¹ durante todo o programa de aquecimento, exceto na etapa de atomização, na qual o fluxo de gás foi interrompido. Os sinais de absorbância foram medidos em área de pico [7].

Resultados e discussão

Determinação da concentração de proteínas totais nas amostras

A determinação do teor total de proteínas nas amostras de plasma foi feita para obter a massa protéica a ser aplicada nos géis das corridas eletroforéticas por 2D-PAGE, levando-se em consideração a concentração do gel. O resultado dessa determinação indicou que o extrato das proteínas da amostras de plasmas contém $25,7 \pm 0,27$ mg mL⁻¹. Com base nesses resultados volumes de 10 µL dos extratos das amostras de plasma foram aplicados nas tiras contendo géis pré-fabricados para a etapa de IEF, o que corresponde a uma massa 250 µg de proteína.

Otimização das separações eletroforéticas

Na tentativa de obter géis de eletroforese com boas resoluções testou-se sistemas de separação 2D-PAGE, visto que o sistema de separação eletroforética somente em uma dimensão não apresentaria boa resolução e sim bandas eletroforéticas de um grupo de proteínas com massas molares semelhantes. Na eletroforese 2D-PAGE cada mancha no gel, ou mais comumente denominado “*spot*” representa uma única proteína [18-20]. Todas as corridas eletroforéticas dos extratos das amostras de plasma foram feitas em triplicata. Análises de correlações e a contagem do número de “spots” também foram feitas entre as repetições dos géis. A Figura 1 ilustra o gel obtido para a amostra do

extrato protéico das amostras de plasma, com os spots protéicos nos quais foram detectados manganês e zinco por SR-XRF destacados com um círculo.

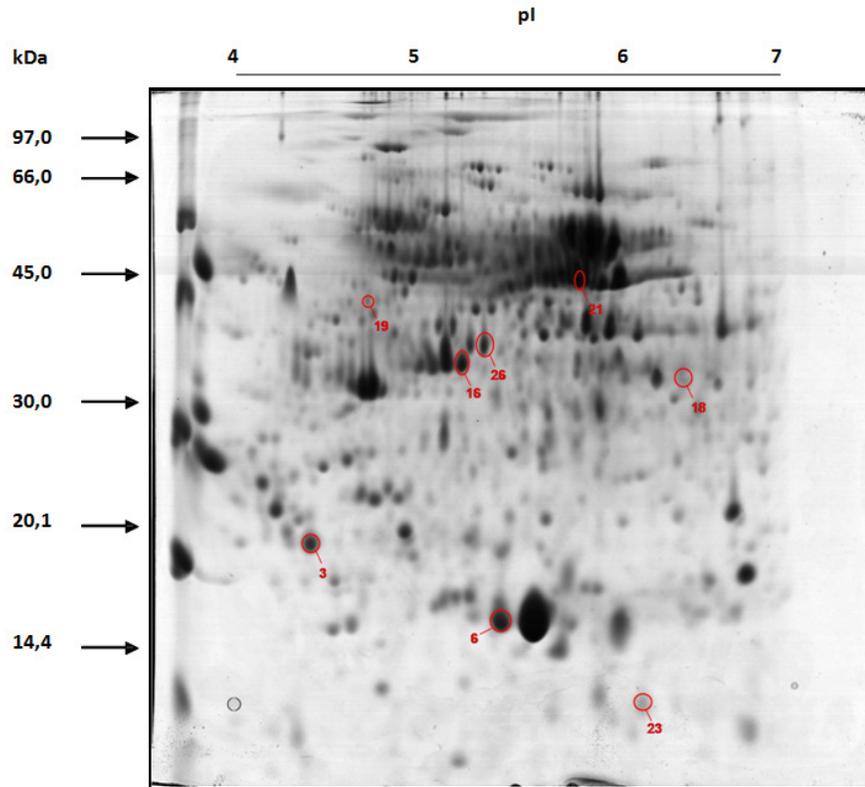


Figura 1: Gel de poliacrilamida 10% (m/v) de plasma de tilápia do Nilo com pI situado na faixa de 4 a 7 e massa molar de proteína na faixa de 14,4 a 97,0 kDa.

Conforme ilustrado na Figura 1, o gel do extrato das amostras de plasma apresenta boa resolução, o que demonstra que a separação de proteínas ocorreu de forma eficiente. Observa-se uma grande diversidade de proteínas, espalhadas em todo o gel, com algumas mais intensas com pI entre 5 e 6 e massa molar em torno de 70,0 kDa. A análise de correlação entre três repetições dos géis demonstrou que 89,5% das proteínas estavam presentes nos três géis, o que representa aproximadamente 515 spots de proteínas. O número médio de spots nos géis foi de 575 com desvio padrão de 13 spots.

Avaliação qualitativa de manganês e zinco por SR-XRF nos “spots” protéicos das amostras de plasma de tilápia do Nilo

A avaliação qualitativa de manganês e zinco ligados às proteínas dos “spots” protéicos foi realizada por SR-XRF, considerando-se a sensibilidade dessa técnica e que possivelmente o manganês e o zinco estariam em baixas concentrações nos diversos “spots” [21,22]. A Figura 2 apresenta como exemplo, um dos espectros de fluorescência obtido nas análises por SR-XRF dos “spots” protéicos das amostras de plasma de tilápia do Nilo e a Figura 3 ilustra em três dimensões os “spots” protéicos nos quais foram detectados manganês e zinco.

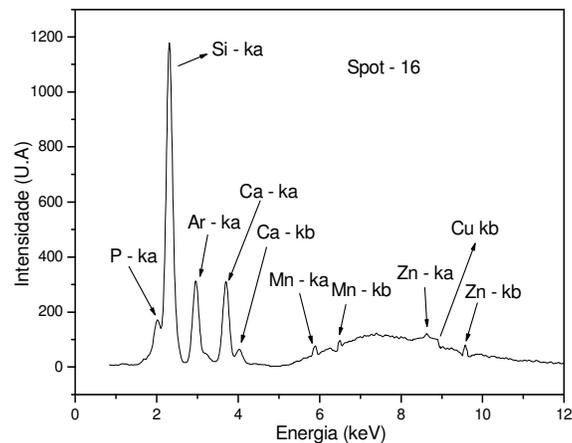


Figura 2: Exemplo de espectro de SR-XRF obtido do spot protéico 16 do pool de amostras de plasma de tilápia do Nilo.

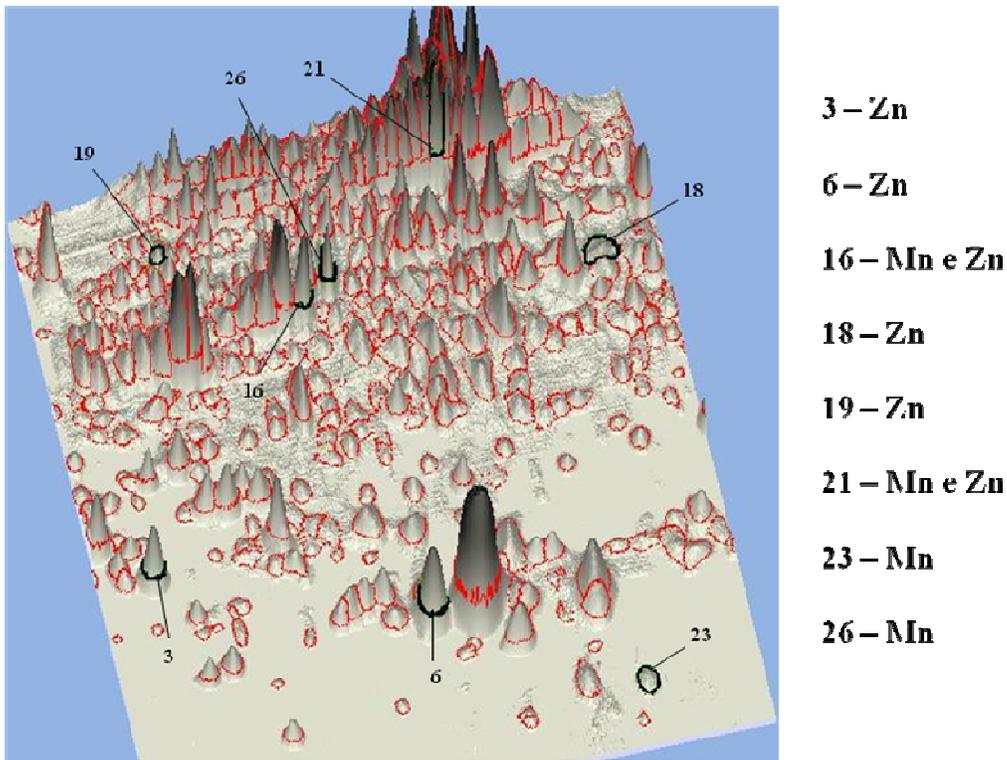


Figura 3. Spots protéicos em três dimensões obtidos do pool de amostras de plasma de tilápia do Nilo. Os spots nos quais foram identificados a presença de manganês e zinco por SR-XRF estão indicados com círculo.

O exemplo de espectro SR-XRF ilustrado na Figura 2, apresenta fundo contínuo de bastante intensidade. De uma forma geral, todos os demais espectros obtidos nas análises por SR-XRF apresentaram o mesmo perfil. Tais fundos devem-se, principalmente, ao espalhamento Compton dos raios-X incidentes sobre a matriz do gel, o qual pode mascarar os sinais do elemento de interesse [19]. Dessa forma, utilizando os valores das áreas dos picos normalizados (após desconto do branco analítico) dos espectros de SR-XRF, foi possível identificar o manganês ($k_{\alpha} = 5,898$, $K_{\beta} = 6,490$) e zinco ($k_{\alpha} = 6,638$, $k_{\beta} = 9,571$) ligados às proteínas dos spots destacados com um círculo, apresentados na Figura 3. Como pode ser visto no espectro da Figura 2, além de manganês e zinco foi detectado a presença de fósforo, não-metal que pode estar presente na estrutura da proteína do spot analisado. Outros íons metálicos detectados foram o cálcio e o cobre. A presença de mais de um íon metálico/metalóide em “spots” de proteínas são aceitáveis, já que única metaloproteína ou proteína ligada metal a pode ter vários sítios ativos formados por átomos de íons de diferentes elementos [22]. Os picos

de grande intensidade relativos ao argônio ($k\alpha = 2,957$) e ao silício ($k\alpha = 1,740$), que aparecem em todos os espectros, são esperados, pois neste caso, o silício está presente na fita em que é fixada a amostra do “spot” protéico e o argônio está presente no ar ambiente a taxa constante de 0,934% (v/v) [20,21]. Na Tabela 1 são apresentados os spots nos quais foram identificados a presença de manganês e zinco.

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

“Spots”	Proteínas MM (kDa)	pI	Íons metálicos
3P	31,50	4,70	Zn
6P	24,80	5,50	Zn
16P	51,50	5,30	Mn, Zn
18P	52,80	6,30	Zn
19P	64,40	4,90	Zn
21P	70,00	5,80	Mn, Zn
23P	19,60	6,10	Mn
26P	56,80	5,40	Mn

Com base nos resultados apresentados na Tabela 1 pode-se sugerir a presença de manganês e zinco em quatro e seis spots protéicos do plasma, respectivamente. Sendo que de forma geral, os íons metálicos identificados por SR-XRF estão ligados à proteínas com massa molar na faixa de 19 a 70 kDa e com pI na faixa de 4,70 a 6,30.

Avaliação quantitativa de manganês e zinco nos “spots” protéicos das amostras de plasma de tilápia do Nilo

Após a identificação da presença de manganês e zinco por SR-XRF nos “spots” protéicos das amostras de plasma por 2D PAGE, foi feita a quantificação dos elementos

por GFAAS após a mineralização ácida dos “spots” protéicos. As concentrações de manganês e zinco nos spots protéicos foi realizado considerando a estimativa da massa de proteína obtida por densidade óptica utilizando-se o programa ImageMaster 2D Platinum versão 7.0. Na Tabela 2 são apresentadas as concentrações de manganês e zinco determinadas.

Tabela 2: Concentração de manganês e zinco e estimativa das massas de proteínas determinadas nos “spots” protéicos das amostras de plasma, nos quais foi detectada a presença desses elementos por SR-XRF.

Spots	Manganês mg g ⁻¹	Zinco mg g ⁻¹	Massa de Proteína m*(µg)
3P	-	4,80	3,80
6P	-	13,90	5,40
16P	4,20	5,50	2,20
18P	-	3,02	1,20
19P	-	2,30	1,20
21P	4,10	5,20	5,40
23P	3,40	-	1,30
26P	3,50	-	3,50

*m = massa de proteína

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 2, observa-se que as concentrações de manganês e zinco determinadas nos “spots” protéicos apresentam valores na faixa de 3,40 a 4,20 mg g⁻¹ e 2,30 a 13,90 mg g⁻¹, respectivamente. No entanto, os resultados apresentados na Tabela 2 não fornecem muita informação porque não se sabe de quais proteínas se tratam. Dessa forma, foi feita a conversão da estimativa das massas de proteínas e das massas de manganês e zinco para quantidades de moléculas de proteína e quantidade em mol de manganês e de zinco, considerando as massas molares das proteínas e dos dois analitos e que 1 kDa= 1,661.10⁻²⁴ g. Os cálculos possibilitaram a estimativa de quantos átomos dos elementos estariam

presentes por moléculas de proteína [3]. Os resultados obtidos nesses cálculos são apresentados na Tabela 3 em termos de porcentagem de moléculas de proteínas com átomos de manganês e/ou zinco e do número de átomos de manganês e/ou zinco por molécula de proteína.

Tabela 3. Estimativa de porcentagens de moléculas de proteínas contendo manganês e/ou zinco ligados e do número de átomos de manganês e/ou zinco por spot protéico.

Spots	Número de moléculas Proteínas x 10 ¹³	Número de átomos de Manganês x 10 ¹⁴	Número de átomos de Zinco x 10 ¹⁴	Números de átomos de Mn/molécula de proteína	Números de átomos de Zn/molécula de proteína
3P	7,30	-	2,20		2,00
6P	13,10	-	1,28		1,00
16P	2,47	0,46	0,50	2,00	2,00
18P	1,40	-	0,28		2,00
19P	1,10	-	0,21		2,00
21P	4,70	0,45	0,48	1,00	1,00
23P	3,90	0,37	-	1,00	
26P	3,70	0,38	-	1,00	

Com base nos resultados apresentados na Tabela 3 é possível estimar a proporção de manganês e zinco por molécula de proteína. Por exemplo, pode-se inferir que no spot 3P da amostra de plasma cada molécula de proteína tenha aproximadamente dois átomos de zinco. Utilizando-se esse raciocínio, pode-se inferir que os spots 6P, 21P, 16P, 18P e 19P tenham aproximadamente um e dois átomos de zinco. Em relação ao manganês, pode-se inferir que os “spots” 21P, 23P, 26P e 16P contenham aproximadamente um e dois átomos desse elemento.

4. Conclusão

A utilização da eletroforese 2D PAGE como etapa inicial no estudo de avaliação de metaloproteínas foi eficiente no fracionamento das proteínas presentes em amostras de plasma de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). A boa correlação obtida nas repetições dos géis indicou que os procedimentos de extração de proteínas totais preservaram a estrutura metal-proteína, o que possibilitou o mapeamento de manganês e zinco nos “spots” protéicos por SR-XRF e posterior quantificação desses elementos por GFAAS. A quantificação do manganês e do zinco nos “spots” protéicos permitiu estimar que as proteínas analisadas apresentam proporções de um a dois átomos de zinco e de um a dois átomos de manganês por molécula de proteína, indicando, que se trata de metaloproteínas ou proteínas de metal ligante.

Agradecimentos

À FAPESP (Processes 03/13362-6 and 07/59778-0) e ao CNPq (Processo 301123/2005-5) pelo suporte financeiro.

Referências Bibliográficas

- [1] FAO. The State of World's Fisheries and Aquaculture 2002. FAO Information Division Rome. Italy, 2003.
- [2] FAO. State of world aquaculture 2006. FAO Fisheries Technical Paper, n. 500. Rome. FAO, p. 134, 2006
- [3] LOVSHIN, L.L. Tilápia Aquaculture in Brazil. In: COSTA-PIERCE, B.A.; RAKOCY, J.E. (Ed.) Tilápia Aquaculture in Americas 2. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, p. 133-140, 2000.
- [4] SA, M. V. C.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; PADILHA P. M. Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles diets. *Aquaculture* (Amsterdam), Estados Unidos, v. 238, n. 1-4, p. 385-401, 2004.
- [5] SA, M. V. C.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; PADILHA P. M. Relative bioavailability of zinc in supplemental inorganic and organic sources for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fingerlings. *Aquaculture Nutrition*, Oslo-Noruega, v. 11, n. 4, p. 273-285, 2005.
- [6] SILVA, FA. ; NEVES, R. C. F. ; QUINTERO-PINTO, L. G. ; PADILHA, C. C. F. ; JORGE, S. O. M. A. ; BARROS, M. M. ; PEZZATO, L. E.; PADILHA P. M. Determination of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the bioavailability of this micronutrient in feed used in pisciculture.. *Chemosphere*, v. 68, p. 1542-1547, 2007.
- [7] NEVES, R. C. F.; MORAES, P. M.; SALEH, M. A. D.; LOUREIRO, V. R.; BARROS, M. M.; PADILHA, C. C. F.; ALVESJORGE, S. M.; PADILHA PM. FAAS determination of metal nutrients in fish feed after ultrasound extraction. *Food Chemistry*, v. 113, p. 679-683, 2009.
- [8] GARCIA, J.S.; MAGALHÃES, C.S.; ARRUDA, M.A.Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis, *Talanta* v. 69, p. 1-15, 2006.
- [9] LOUREIRO, V. R.; SALEH, M. A. D.; MORAES, P. M.; NEVES, R. C. F.; PADILHA, C. C. F.; PADILHA PM. Manganese Determination by GFAAS in Feces

and Fish Feed Slurries. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, p. 1235-1241, 2007.

[10] SILVA, FA; PADILHA, C. C. F.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; PADILHA PM. Determination of chromium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the apparent digestibility of nutrients in feed used in pisciculture. *Talanta (Oxford)*, Estados Unidos., v. 69, n. No 4, p. 1025-1030, 2006.

[11] HARAGUCHI, H. Metallomics as integrated biometal science, *J. Anal. At. Spectrom.* v. 19, p. 5-14, 2004.

[12] SZPUNAR, P. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry, *Anal. Bioanal. Chem.* v. 378, p. 54-56. 2004.

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

[14] HAMES, B. D.; RICKWOOD, D. *Gel Electrophoresis of proteins: A practical approach.* 2^a ed., New York: IRL Press, 383p, 1990.

[15] BERKELMAN, T.; STENSTEDT, T.; *2-D Electrophoresis: Principles and Methods.* Uppsala: Amersham Biosciences, 1998. 101p.

[16]. LANÇAS, F.M.; SILVA, J.C.R.; BICUDO, R.C.; NETO, M.B. A química analítica do proteoma. *Analytica*, v.6, p.60-67, 2003.

[17]. BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry.* v.72, p.248-254, 1976.

[18]. CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-259 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, v.25, p.1327-1333, 2004.

- [19]. WESELOH, G., KUHbacher, M., BERTELSMANN, H., OZASLAN, M., KYRIAKOPOULOS, A., KNOCHel, A., BEHNE, D. Analysis of metal-containing proteins by gel electrophoresis and synchrotron radiation X-ray fluorescence. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 259, 473, 2004.
- [20]. SALEH, M. A. D.; NEVES, R. C. F.; SILVA, F. A.; MORAES, P. M.; LOUREIRO, V. R.; ROLDAN, P. S.; PADILHA, P.D. GFAAS Determination of Zinc in Fish Feed and Feces Using Slurry Sampling .. *Food Analytical Methods*, 2, 162-168, 2009.
- [21]. GARCIA, J. S., SOUSA, G. H. M. F., EBERLIN, M. N., ARRUDA, M. A. Z. Evaluation of metal-ion stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves through proteomic changes. *Metallomics*, 1, p. 107-113, 2009.
- [22]. VERBI, F. M., ARRUDA, S. C. C., RODRÍGUEZ, A. P. M., PÉREZ, C. A., ARRUDA, M. A. M. Metal-binding proteins scanning and determination by combing gel electrophoresis, synchrotron radiation X-ray fluorescence and atomic spectrometry. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, v. 62, p. 97-109, 2005.
- [23]. SUSSULINI, A. ; GARCIA, J. S. ; MESKO, M. F. ; MORAES, D. P. ; FLORES, É. M. ; PEREZ, C. A. ; ARRUDA, M. A. Z. . Evaluation of soybean seed protein extraction focusing on metalloprotein analysis. *Mikrochimica Acta*, 158, p. 173-180, 2007.
- [24]. WIND, M., LEHAMANN, W. D. Element and molecular mass spectrometry – an emerging analytical team in the life sciences. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19, p. 20-25, 2004.

Capítulo - III

Implicações

A metalômica é um novo campo de investigação que une estudos de proteínas com estudos de metais. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de protocolos analíticos para avaliação metaloproteínas, principalmente em relação aos microminerais, por exemplo, cobre, manganês e zinco, os quais participam diretamente das atividades biológicas de diversas proteínas. Neste contexto, o presente trabalho mostra-se como pioneiro nos estudos metaloproteômicos em animais, mais especificamente os peixes. Assim, foi possível mapear por SR-XRF manganês e zinco em spots de um pool de amostras de plasma e quantificar esses elementos nos spots protéicos por GFAAS. Os dados quantitativos obtidos permitiram estimar o número de átomos de manganês e zinco ligados às estruturas das proteínas fracionadas por 2D PAGE.

O presente trabalho servirá de base para caracterização de proteínas em animais, mais especificamente em peixes, com a possibilidade de revelação de novas espécies protéicas e possíveis descobertas de atividade das mesmas, trazendo contribuições significativas aos estudos relacionados à fisiologia de peixe.

Anexo

1. Mineralização dos spots protéicos

Os “spots” protéicos de interesse foram retirados do gel com o auxílio de ponteira de pipeta e foram mineralizados por digestão ácida. Para isso, os spots foram pesados em balança analítica e transferidos diretamente para balões de digestão, adicionando-se em seguida 1,5 mL de ácido nítrico e 0,50 mL de ácido perclórico e levados ao bloco digestor onde permaneceram sob aquecimento. Após a total mineralização das amostras, os extratos ácidos foram transferidos quantitativamente para balões volumétricos de 5 mL, completando-se o volume com água ultra-pura [1].

2. Exemplo do cálculo para a estimativa do números de mols de íons de Zn por números de mols de moléculas de proteínas para “spot” 3P.

1) Determinação da massa da molécula de proteína:

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

$$31500 \text{ Da} = X \quad \text{g}$$

$$X = 5,23 \times 10^{-20}\text{g}$$

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

$$1 \text{ molécula} = 5,23 \times 10^{-20}\text{g}$$

$$X \text{ moléculas} = 3,80 \times 10^{-6}\text{g}$$

$$X = 7,266 \times 10^{13} \text{ moléculas}$$

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

$$65,39 \text{ g} = 6,022 \times 10^{23} \text{ átomos}$$

$$1,824 \times 10^{-8} = X$$

$$X = 1,70 \times 10^{14} \text{ átomos de Zn}$$

4) Relação de números de átomos por moléculas de proteínas

$$\frac{1,70 \times 10^{14}}{7,266 \times 10^{13}} = 2,3 \text{ átomos de Zn por molécula de proteína}$$

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)