



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

TESE DE DOUTORADO

AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE
GIRASSOL POR MEIO DE ANÁLISE DE PROTEÍNAS
E METALOPROTEÍNAS

Orientada: Jerusa Simone Garcia

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda

CAMPINAS – SP
SETEMBRO DE 2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

G165a Garcia, Jerusa Simone.
Avaliação do desenvolvimento de girassol por meio de análise de proteínas e metaloproteínas / Jerusa Simone Garcia. -- Campinas, SP: [s.n], 2006.

Orientador: Marco Aurélio Zezzi Arruda.

Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Girassol. 2. Proteína. 3. Metaloproteína.
4. Contaminação. I. Arruda, Marco Aurélio Zezzi.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Evaluation of sunflower development based on protein and metalloprotein analysis

Palavras-chaves em inglês: Sunflower, Protein, Metalloprotein, Contamination

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda (orientador), Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira, Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva, Prof. Dr. Fernando Antônio Santos Coelho

Data de defesa: 15/09/2006

BANCA EXAMINADORA

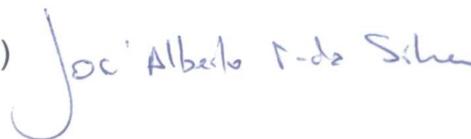
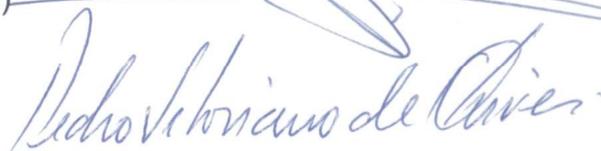
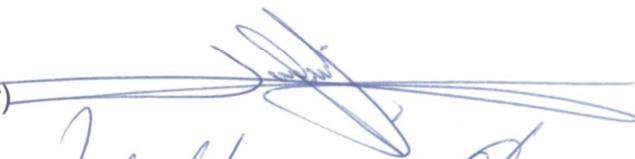
Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda (Orientador)

Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira (IQ-USP)

Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo (ESALQ-USP)

Prof. Dr. Fernando Antônio Santos Coelho (IQ-UNICAMP)

Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva (IQ-UNICAMP)



Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pela aluna **JERUSA SIMONE GARCIA**, aprovada pela Comissão Julgadora em 15 de setembro de 2006.



Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda
(Presidente da Banca)

*Dedico esta tese de Doutorado aos meus pais
Celso e Iêda, e aos meus irmãos Josmar,
Jordan e Jaison por todo o amor e apoio
durante mais esta etapa da minha vida.*

“Sem imaginação, o cientista não descobriria nada, uma vez que a essência da descoberta requer que o cientista olhe para as coisas que todas as pessoas vêem, mas perceba coisas que ninguém jamais viu.”

Carl Linus Pauling

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, em especial ao Departamento de Química Analítica do Instituto de Química pela oportunidade oferecida para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de estudo e do auxílio financeiro.

Ao professor Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda, pela orientação, apoio e amizade e pelos valiosos conselhos.

Ao professor Dr. Érico M. M. Flores do Departamento de Química da UFSM por disponibilizar o seu laboratório e equipamentos para a realização de um estágio onde foi feito parte dos experimentos desta tese.

Ao professor Dr. Ricardo Antunes de Azevedo do Departamento de Genética Bioquímica de Plantas da Esalq/USP pelo auxílio na obtenção e interpretação dos dados a respeito da atividade enzimática.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) pelo suporte dado para a execução dos experimentos na linha de fluorescência de raios-X, em especial ao Dr. Carlos A. Pérez.

Ao professor Dr. Ronei Jesus Poppi do Departamento de Química Analítica da Unicamp pela assistência no emprego da ferramenta quimiométrica rede Neural Kohonen.

À todos professores que fizeram parte da minha formação acadêmica, em especial a professora Dra. Honória de Fátima Gorgulho que sempre me incentivou.

À todos amigos do Grupo de Espectrometria, Preparo de Amostras e Mecanização (GEPAM): Aline Klassen, Aline Lopes, Alessandra, Américo, Ana Cristi, Cristiana, Eduardo, Eraldo, Geraldo, Marcel e Marcelo pelo agradável convívio, meu muito obrigado.

Aos ex-colegas de laboratório, André, Audrey, César, Edenir, Fabíola, Guida, Janaína, Luciana, Madson e Nathália pela amizade.

Aos amigos Araceli, Gilmare e Joselito pelo apoio e carinho que sempre tiveram comigo.

Aos funcionários do Instituto de Química, especialmente a Helena, ao Sr. Fontana e a Bel da CPG por sempre atender prontamente aos meus pedidos.

Aos meus pais e irmãos pelo amor, estímulo, dedicação e compreensão.

Aos meus avós, por sempre terem compreendido a minha ausência e que infelizmente não estão mais presentes para compartilhar a alegria desta conquista.

E a você, Marcello, meu amor, por tornar os momentos da minha vida mais felizes....

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Jerusa Simone Garcia
Data de Nascimento: 1º de abril de 1978
Naturalidade: Barbacena – MG
Filiação: Celso de Oliveira Garcia e Iêda Lopes Garcia
Endereço Eletrônico: garje@zipmail.com.br

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2003 – 2006 Doutorado em Ciências

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Título: Avaliação do desenvolvimento de girassol por meio de análise de proteínas e metaloproteínas.

2001 – 2003 Mestrado em Agroquímica

Universidade Federal de Viçosa – UFV
Título: Otimização de misturas de coagulantes para a remoção de cádmio, cobre e chumbo em sistema aquoso por coprecipitação.

1996 – 2001 Licenciatura em Química

Universidade Federal de São João del-Rei.

3. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigos completos publicados, aceitos e submetidos

- GARCIA, J. S., MAGALHAES, C. S., ARRUDA, M. A. Z., Trends in metal-binding and metalloprotein analysis, *Talanta*, v. 69, p. 1-15, Holanda, 2006.
- GARCIA, J. S., GRATÃO, P. L., AZEVEDO, R. A., ARRUDA, M. A. Z., Metal contamination affects on sunflower (*Helianthus annuus L.*) growth and protein expression in leaves during the development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Estados Unidos, 2006, no prelo.
- SUSSULINI, A., GARCIA, J. S., MESKO, M. F., MORAES, D. P., FLORES, E. M. M., PÉREZ, C. A., ARRUDA, M. A. Z., Evaluation of soybean seed protein extraction focusing on metalloprotein analysis. *Microchimica Acta*, Áustria, 2006, no prelo.
- GARCIA, J. S., PEREZ, C. A., ARRUDA, M. A. Z., Metal ions mapping bound to proteins from sunflower leaves through SRXRF analysis. *Activity Report*, Brasil, 2005.
- GARCIA, J. S., REIS, C., REIS, E. L., NOGUEIRA, M. N., Solubilidade de Cádmio, Cobre e Chumbo em função do pH utilizando coprecipitação com $Al_2(SO_4)_3$, $Fe_2(SO_4)_3$ e $MnSO_4$. *Tecno Lógica*, v. 8, n. 2, p. 43-49, Brasil, 2004.
- GARCIA, J. S., SILVA, G. A., ARRUDA, M. A. Z., POPPI, R. J., Application of Kohonen neural to exploratory analyses of sunflower metalloproteins, submetido. *X-Ray Spectrometry*, Inglaterra, 2006.

Capítulo de Livro

- MAGALHAES, C. S., GARCIA, J. S., LOPES, A. S., FIGUEIREDO, E. C., ARRUDA, M. A. Z., Strategies for sample preparation focusing biomolecules determination/characterization, no prelo. em: Trends in Sample Preparation. Nova Science, New York, 2006.

Principais trabalhos apresentados em eventos

- GARCIA, J. S., ARRUDA, M. A. Z., Metalômica Quantitativa de Girassóis, apresentação oral. 13º Encontro Nacional de Química Analítica, 2005, Niterói.
- GARCIA, J. S., SILVA, G. A., ARRUDA, M. A. Z., POPPI, R. J., Aplicação de Rede Neural Kohonen em dados de SRXRF proveniente de bandas de proteínas. 28º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas.
- GARCIA, J. S.; ARRUDA, M. A. Z., PEREZ, C. A., Mapeamento de íons metálicos ligados a proteínas de folhas de girassol usando fluorescência de raios-X. XV Reunião Anual de Usuários do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, 2005, Campinas.
- GARCIA, J. S., ARRUDA, M. A. Z., Study of Protein Extraction from Sunflower Leaves using Different Procedures. 7 International Symposium on Advances in Extraction Technologies, 2005, Campinas.
- GARCIA, J. S., BUENO, M. I. M. S., ARRUDA, M. A. Z., Identificação de espécies químicas ligadas a proteínas de folhas de girassóis por Fluorescência de Raios-X. XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004, Salvador.
- GARCIA, J. S., ARRUDA, M. A. Z., Determination of macro and micro constituents in dry matter and proteins of sunflowers using ICP OES. 8th Rio Symposium on Atomic Spectrometry, 2004, Paraty.
- GARCIA, J. S., ARRUDA, M. A. Z., Evaluation of sunflower growth and leaves protein expression at different conditions. XII International Meeting of International Humic Substances Society, 2004, São Pedro.

Total de trabalhos em eventos internacionais: 7

Total de trabalhos em eventos nacionais: 18

Participações em eventos científicos: 19

4. HISTÓRICO PROFISSIONAL

- Estágio Docente
 - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG
 - Disciplina: Métodos Instrumentais de Análise
 - Período: 2º semestre de 2001
- Atividade Didática
 - Universidade Federal de São João del Rei, São João del Rei, MG
 - Monitora das Disciplinas: Química Geral e Química Orgânica
 - Período: 1º semestre de 1997 a 2º semestre de 1998
- Professora de Matemática no Ensino Fundamental na Escola "Estadual Cônego Luiz Giarola Carlos", localizada em Barroso, MG.
Período: 1998 a 1999
- Iniciação Científica, realizada na Universidade Federal de São João del Rei, São João del Rei, MG
 - Projeto: Síntese e Caracterização Eletroquímica do Dióxido de Manganês.
 - Orientadora: Prof. Dra. Honória de Fátima Gorgulho.
 - Período: 09/1999 a 07/2001

RESUMO

AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE GIRASSOL POR MEIO DE ANÁLISE DE PROTEÍNAS E METALOPROTEÍNAS

Autora: Jerusa Simone Garcia

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda

Este trabalho de Tese apresenta os resultados referentes ao crescimento e ao desenvolvimento da cultura de girassol (*Helianthus annuus* L.) submetida a 7 tratamentos e as suas inter-relações com as análises de proteínas e metaloproteínas. Em quatro tratamentos, foram adicionadas soluções de íons metálicos (Cd, Cu, Pb e Zn) ao substrato. Em outros dois tratamentos, usados como testemunhos, foi empregada somente água desionizada para a irrigação das plantas. No último tratamento foi acrescentada uma solução denominada mista, contendo simultaneamente os 4 contaminantes. Nos tratamentos foi avaliada a altura das plantas, a biomassa produzida e a distribuição e translocação de nutrientes do substrato para as partes do girassol. As plantas submetidas à contaminação com a solução mista foram as mais afetadas em termos fisiológicos. Também foi investigada a influência das espécies metálicas na composição protéica. Para isso, foi feita a extração das proteínas presentes no sistema foliar, caulinar e radicular dos girassóis, sendo, em seguida, determinada a concentração das proteínas totais. As proteínas das folhas foram ainda separadas utilizando a eletroforese do tipo SDS-PAGE. Este processo possibilitou identificar, em termos de massa molar, o conjunto de proteínas presentes em cada tratamento. As proteínas das folhas procedentes da contaminação com zinco foram as mais prejudicadas, ocorrendo uma diminuição acentuada de suas expressões e a supressão de algumas delas. Este fato ocorreu devido à geração excessiva de espécies de oxigênio reativas, conduzindo a um estresse oxidativo. Tal evento foi confirmado pela análise da atividade enzimática da catalase, superóxido dismutase e glutathiona redutase. Com a finalidade de se fazer uma

investigação mais detalhada, as proteínas das folhas foram separadas também por eletroforese bidimensional, sendo detectadas cerca de 260 proteínas. Além disso, foi confirmado que as proteínas das plantas contaminadas com zinco foram as mais comprometidas, sendo algumas delas sequer detectadas. Em uma outra vertente da Tese foram estabelecidos quais íons metálicos estavam efetivamente ligados as proteínas. Para isso, foi executado, por meio de fluorescência de raios-X com radiação Síncrotron, o mapeamento de 43 bandas obtidas da separação SDS-PAGE. Em seguida, as intensidades de 11 espécies químicas foram avaliadas por intermédio da ferramenta quimiométrica rede Neural Kohonen. Esta ferramenta selecionou seis amostras com potencial para o prosseguimento das investigações. Nestas amostras foi feita a avaliação quantitativa dos íons metálicos presentes nas estruturas das proteínas. Para isso, as bandas foram decompostas por dois sistemas diferentes (combustão assistida por microondas e forno de microondas à alta pressão), sendo possível investigar a correlação entre a formação e/ou preservação das metaloproteínas e o meio de cultura de onde elas se originavam. As proteínas procedentes dos girassóis desenvolvidos sem contaminação apresentaram níveis maiores de íons metálicos. Assim sendo, importantes metaloproteínas e enzimas participaram de processos metabólicos para combater os efeitos adversos provocados pelo excesso de íons metálicos, principalmente o zinco.

ABSTRACT

EVALUATION OF SUNFLOWER DEVELOPMENT BASED ON PROTEIN AND METALLOPROTEIN ANALYSES

Author: Jerusa Simone Garcia

Adviser: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda

This work describes an evaluation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) growth when it is submitted to seven treatments, and their interrelation with proteins and metalloproteins analyses. Metal ion solutions (Cd, Cu, Pb and Zn) were added to the substrate in four treatments. In another two, used as controls, the plants were irrigated only with deionized water. Finally, in the seventh treatment, a solution called “mixed ions solution”, simultaneously containing the four metal ions was used. The sunflower height, biomass production and nutrient distribution and translocation were evaluated. Sunflower plants contaminated with mixed solution are more affected in terms of physiological parameters. The influence of metal species on the protein composition was also investigated. For that, the extraction of sunflower proteins present in leaves, stem and root tissue was carried out. The total protein content in all extracts was determined according to the Bradford method. The leaves proteins were separated using SDS-PAGE electrophoresis. Leaves from plants irrigated with zinc were more affected in terms of protein expression. In such case, there was a significant decrease of protein amounts and the suppression of some of them. This is explained by the excessive generation of reactive oxygen species that induced an oxidative stress, which was confirmed by the enzymatic activity analyses of catalase, superoxide dismutase and glutathione reductase. In order to obtain more details about the changes in protein composition, leaf proteins were also separated using two-dimensional electrophoresis. In this analysis it was possible to detect about 260 protein spots and confirm that the proteins of plants contaminated with zinc were more affected. In another

part of this work, the identification of the metal ions bound to the proteins was carried out. For that, 43 protein bands obtained from SDS-PAGE separation were mapped using synchrotron radiation X-ray fluorescence analysis. The fluorescence intensities of 11 chemical species were evaluated by the Kohonen Neural Network. This chemometric tool selected six samples in which the quantitative analysis of metal ions are made. For that, the bands were decomposed by two different systems (microwave-assisted sample combustion and focused microwave oven). In these samples, the correlation between the formation and/or preservation of metalloproteins and the substrate were investigated. The proteins proceeding from sunflowers plants without contamination showed high metal ions levels so that it is possible to conclude that important metalloproteins and enzymes participate in metabolic processes to avoid the adverse effects provoked by metal ion excess, particularly when zinc is considered.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS.....	XXI
LISTA DE QUADROS.....	XXIII
LISTA DE TABELAS.....	XXV
LISTA DE FIGURAS.....	XXVII
INTRODUÇÃO.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	2
CAPÍTULO 1 – Desenvolvimento dos Girassóis.....	5
1. OBJETIVOS.....	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1. GIRASSOL.....	7
2.2. ÍONS METÁLICOS EM PLANTAS.....	10
2.3. ESTRESSE OXIDATIVO E MECANISMOS DE DEFESA.....	12
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	14
3.1. EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS.....	14
3.2. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	14
3.3. PLANTIO DOS GIRASSÓIS.....	15
3.4. DETERMINAÇÃO DAS ESPÉCIES QUÍMICAS NOS SUBSTRATOS.....	17
3.5. DETERMINAÇÃO DAS ESPÉCIES QUÍMICAS NOS EXTRATOS VEGETAIS.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	18
4.1. AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DOS GIRASSÓIS.....	18

4.2. CONCENTRAÇÕES DAS ESPÉCIES QUÍMICAS ANTES E APÓS O CULTIVO.....	23
4.3. ABSORÇÃO E TRANSLOCAÇÃO DAS ESPÉCIES QUÍMICAS NOS DIFERENTES TECIDOS DO GIRASSOL.....	25
5. CONCLUSÕES PARCIAIS.....	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
CAPÍTULO 2 – Influência da contaminação por íons metálicos em nível protéico.....	35
1. OBJETIVOS.....	37
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	37
2.1. PROTEÍNAS – ASPECTOS GERAIS.....	37
2.2. PREPARO DE AMOSTRAS VISANDO A EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	38
2.3. ELETROFORESE.....	42
2.3.1. ASPECTOS GERAIS.....	43
2.3.2. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	44
2.3.2.1. ELETROFORESE EM UMA DIMENSÃO (1D-PAGE).....	45
2.3.2.2. ELETROFORESE EM DUAS DIMENSÕES (2D-PAGE).....	46
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	47
3.1. EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS.....	47
3.2. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	48
3.3. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS PARA A SEPARAÇÃO USANDO SDS-PAGE E 2D-PAGE.....	50
3.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS: MÉTODO DE BRADFORD.....	51

3.5. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE).....	52
3.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	53
3.7. OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA A SEPARAÇÃO POR 2D-PAGE.....	54
3.7.1. SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA EM DUAS DIMENSÕES (2D-PAGE).....	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	58
4.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	58
4.2. SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DO TIPO SDS-PAGE.....	59
4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	65
4.4. OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA 2D-PAGE.....	68
5. CONCLUSÕES PARCIAIS.....	77
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

CAPÍTULO 3 – Avaliação quali e quantitativa de algumas metaloproteínas presentes nas folhas de girassol.....83

1. OBJETIVOS.....	85
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	85
2.1. METALÔMICA.....	85
2.2. METALOPROTEÍNAS E <i>METAL-BINDING</i> PROTEÍNAS.....	87
2.3. FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X.....	90
2.3.1. RADIAÇÃO SÍNCROTRON.....	92
2.4. REDE NEURAL KOHONEN.....	93
2.5. TÉCNICAS DE QUANTIFICAÇÃO DE ÍONS METÁLICOS.....	96
2.5.1. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA (ETAAS).....	96
2.5.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM FONTE DE PLASMA ACOPLADO	

INDUTIVAMENTE (ICP-MS).....	98
2.6. DECOMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS.....	100
2.6.1. SISTEMA FECHADO COM AQUECIMENTO POR RADIAÇÃO MICROONDA....	101
2.6.2. DECOMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS POR COMBUSTÃO ASSISTIDA POR RADIAÇÃO MICROONDA.....	102
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	103
3.1. EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS.....	103
3.2. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	104
3.3. MAPEAMENTO DAS BANDAS DE PROTEÍNAS.....	105
3.4. TRATAMENTO DOS DADOS E SELEÇÃO DAS BANDAS PROTÉICAS USANDO REDE NEURAL KOHONEN.....	106
3.5. DECOMPOSIÇÃO DAS BANDAS PROTÉICAS.....	107
3.5.1. COMBUSTÃO ASSISTIDA POR RADIAÇÃO MICROONDA.....	107
3.5.2. DECOMPOSIÇÃO À ALTA PRESSÃO MEDIADA POR RADIAÇÃO MICROONDA.....	108
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	109
4.1. MAPEAMENTO DAS BANDAS COM SRXRF.....	109
4.2. TRATAMENTO QUIMIOMÉTRICO DOS DADOS DE INTENSIDADES DE FLUORESCÊNCIA.....	111
4.3. CONCENTRAÇÕES DE ÍONS METÁLICOS NAS BANDAS DE PROTEÍNAS.....	116
4.3.1. DECOMPOSIÇÃO USANDO COMBUSTÃO ASSISTIDA POR RADIAÇÃO MICROONDA.....	116
4.3.2. DECOMPOSIÇÃO À ALTA PRESSÃO EM FORNO DE MICROONDA.....	121
5. CONCLUSÕES PARCIAIS.....	123
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124
CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	131

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

1D-PAGE	Eletoforese em Gel de Poliacrilamida em uma dimensão (do inglês, <i>One Dimension Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
2D-PAGE	Eletoforese em Gel de Poliacrilamida em duas dimensões (do inglês, <i>Two Dimension Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
AAS	Espectrometria de Absorção Atômica (do inglês, <i>Atomic Absorption Spectrometry</i>)
ANOVA	Análise da Variância
CAT	Catalase
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CRM	Material Certificado de Referência (do inglês, <i>Certified Reference Material</i>)
Da	Dalton (1 Da = $1,661 \times 10^{-24}$ g)
ETAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (do inglês, <i>Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry</i>)
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (do inglês, <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>)
GeV	Gigaeletrovolts
GR	Glutathiona Redutase
ICP	Plasma Acoplado Indutivamente (do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma</i>)
ICP-MS	Espectrometria de Massas com Fonte de Plasma Acoplado Indutivamente (do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
ICP OES	Espectrometria de Emissão Atômica com Fonte de Plasma Acoplado Indutivamente (do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>)

IEF	Focalização Isoelétrica (do inglês, <i>Isoelectric Focussing</i>)
LA-ICP-MS	Espectrometria de Massas com Fonte de Plasma Acoplado Indutivamente com Ablação a Laser (do inglês, <i>Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
LD	Limite de Detecção
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
LQ	Limite de Quantificação
MM	Massa Molar
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (do inglês, <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
PCA	Análise de componentes Principais (do inglês, <i>Principal Component Analysis</i>)
pl	Ponto Isoelétrico
ROS	Espécie de Oxigênio Reativas (do inglês, <i>Reactive Oxygen Species</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês, <i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SOM	Mapas auto-organizáveis (do inglês, <i>self-organizing maps</i>)
SRXRF	Espectrometria de Fluorescência de Raios-X com Radiação Síncrotron (do inglês, <i>Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence Spectrometry</i>)
SOD	Superóxido Dismutase
XRF	Espectrometria de Fluorescência de Raios-X (do inglês, <i>X-Ray Fluorescence Spectrometry</i>)

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1	Concentrações dos principais nutrientes para o desenvolvimento do girassol.....	11
Quadro 1.2	Descrição resumida das condições adotadas no cultivo de girassol.....	16
Quadro 2.1	Principais substâncias usadas na solubilização das proteínas.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Concentrações dos íons metálicos (média±desvio padrão, n=3) determinados nos diferentes substratos empregados no cultivo dos girassóis.....	23
Tabela 1.2	Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) obtidos experimentalmente nas amostras de substratos usando a técnica de ICP OES.....	25
Tabela 1.3	Determinação de Ca, K, Mg e P (mg g ⁻¹ , n=4) empregando o método analítico proposto e os seus valores certificados no material de referência (CRM 100).....	25
Tabela 1.4	Concentrações dos íons metálicos (média±desvio, n=3) usados na contaminação da cultura de girassol presentes no extrato vegetal (massa seca).....	29
Tabela 1.5	Limite de detecção e de quantificação obtidos experimentalmente usando a técnica de ICP OES nas amostras de extratos vegetais.....	30
Tabela 2.1	Concentrações de proteínas totais (média±desvio padrão, n=3) em cada parte do girassol (massa úmida) determinadas pelo método de Bradford..	58
Tabela 2.2	Quantidade de proteína (média±desvio padrão, n=3) presente em cada banda. Estimativa realizada por meio do programa <i>Gel-Pro Analyzer</i> , versão 3.1.....	63
Tabela 2.3	Informações das proteínas mostradas na Figura 2.8(b) obtidas por meio do programa <i>ImageMaster 2D Platinum</i> , versão 6.0.....	73
Tabela 3.1	Identificação das amostras usadas na análise por SRXRF.....	110
Tabela 3.2	Intensidades de fluorescência (unidades arbitárias) das bandas protéicas. Para a identificação das amostras, vide definição na Tabela 3.1.....	112
Tabela 3.3	Quantidade de íons metálicos (média±desvio padrão, n=3) nas bandas de proteínas de folhas de girassóis quantificados por ICP-MS.....	117

Tabela 3.4	Quantidade de íons metálicos (média±desvio, n=3) nas bandas de proteínas quantificados por meio da técnica de ICP OES.....	118
Tabela 3.5	Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) obtidos experimentalmente nas amostras de bandas protéicas usando as técnicas de ICP-MS e ICP OES.....	118
Tabela 3.6	Quantidade de íons metálicos nas bandas de proteínas provenientes de folhas de girassóis submetidas a diferentes condições de cultivo.....	122
Tabela 3.7	Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) obtidos experimentalmente nas amostras de bandas protéicas usando as técnicas de ETAAS ou FAAS.....	123

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** Desenvolvimento dos girassóis (média±desvio padrão, n=10) durante 40 dias de cultivo em diferentes meios. *Valores das médias seguidas por letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de acordo com o teste Tukey.....20
- Figura 1.2** Média da biomassa produzida (n=5) em cada parte da planta depois de 40 dias: (a) massa úmida obtida logo após a colheita e (b) massa seca adquirida depois de 72 h em estufa a 60°C.....21
- Figura 1.3** Girassóis submetidos a diferentes condições de cultivo após 40 dias. Da esquerda para direita: Solo, Solo+Verm., Solução Mista, Cd(II), Cu(II), Pb(II) e Zn(II), respectivamente.....21
- Figura 1.4** Exemplos dos girassóis logo após a colheita (40 dias) onde são enfatizadas as diferenças entre os mesmos. Outras definições, vide legenda da Figura 1.3.....22
- Figura 1.5** Concentrações de nutrientes em diferentes tecidos do girassol (média±desvio padrão, n=3): (a) Ca, (b) K, (c) Fe, (d) Mg, (e) Na e (f) P. Valores das médias de cada parte da planta seguida por letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. A ausência de letras nas barras indica que a razão do teste F não é significativa, de acordo com o teste ANOVA.....26
- Figura 2.1** Géis dos extratos protéicos das folhas: (a) tratamento com Cd(II), (b) Cu(II), (c) Pb(II), (d) Zn(II), (e) Solução Mista, (f) Solo e (g) Solo+Verm. A primeira coluna de cada gel apresenta os padrões de massas molares (116,0-14,4 kDa). Os números de 1 a 15 (lado direito da Figura) identificam as bandas formadas em cada condição de cultivo.....60
- Figura 2.2** Géis representativos das amostras de extrato protéico do caule e da raiz do girassol: (a) caule do tratamento com Zn (II) e (b) raiz do tratamento com solo. Em ambos os casos, estas amostras foram as que apresentaram maior concentração de proteínas de acordo com os dados dispostos na Tabela 2.1.....64

- Figura 2.3** Atividade da superóxido dismutase (SOD) em gel nativo: (a) padrão de SOD de fígado bovino, (b) amostra de folhas do plantio em solo e vermicomposto, (c) tratamento com Zn(II) e (d) com a solução mista.....66
- Figura 2.4** Atividade enzimática presente nos extratos protéicos das folhas determinada espectrofotometricamente: (a) catalase (CAT) e (b) glutatona redutase (GR).....67
- Figura 2.5** Gel 2D-PAGE das proteínas de folhas de girassol do cultivo em solo e vermicomposto extraídas com o *Tampão 1*. Fita de 13 cm, pH de 3 a 10. Padrão de massa molar de 97,7 a 14,4 kDa. Gel com dimensões de 130 x 130 x 1,5 mm.....69
- Figura 2.6** Etapas do preparo da amostra protéica utilizando precipitação com acetato de amônio em metanol (tubo de ensaio à esquerda) e com TCA e DTT em acetona (tubo de ensaio a direita): (a) amostra precipitada depois de 24h, (b) primeira etapa de limpeza do precipitado com DTT em acetona, (c) segunda limpeza com a mesma solução e (d) terceira etapa de limpeza.....70
- Figura 2.7** Géis 2D-PAGE das proteínas de folhas de girassol do cultivo em solo e vermicomposto extraídas com o *Tampão 2*: (a) amostra precipitada com acetato de amônio em metanol e (b) amostra precipitada com TCA e DTT em acetona. Fita de 13 cm, pH de 3 a 10. Padrão de massa molar de 97,7 a 14,4 kDa. Géis com dimensões 130 x 130 x 1,5 mm.....71
- Figura 2.8** Géis 2D-PAGE das proteínas de folhas de girassol do cultivo em solo e vermicomposto extraídas com o *Tampão 2* e precipitadas com TCA e DTT em acetona: (a) 1,8 mg de proteína e (b) 2,4 mg de proteína. Os conjuntos de proteínas são identificados pelos números de 1 a 6. Maiores detalhes vide legenda da Figura 2.7.....72
- Figura 2.9** Géis 2D-PAGE das proteínas de folhas de girassol: (a) tratamento com Zn(II) e (b) tratamento com a solução mista. Maiores detalhes vide legenda da Figura 2.8.....74
- Figura 2.10** Exemplos das imagens tridimensionais dos *spots*: (a) proteínas agrupadas no conjunto 3, (b) proteínas pertencentes ao conjunto 4 e (c) proteínas dos conjuntos 5 e 6 de acordo com a Figura 2.8. O *spot* 6 está sinalizado por uma seta. Mais detalhes vide legenda da Tabela 2.3.....75
- Figura 3.1** Principais técnicas usadas em estudos metalômicos [5].....87
- Figura 3.2** Representação do número de metaloproteínas depositadas no banco de dados especializado até abril de 2005. Adaptação da referência [8].....88
- Figura 3.3** Arquitetura típica da rede neural Kohonen. Os neurônios são representados por colunas inseridas em uma caixa. Todos os dados de entrada são colocados nos neurônios ao mesmo tempo.....95

- Figura 3.4** Sistema de decomposição por combustão iniciada por microondas. Adaptado de Mesko, *et al.* [58].....103
- Figura 3.5** Configuração do sistema utilizado para aquisição dos dados referentes ao mapeamento de espécies químicas presentes nas bandas de proteína..105
- Figura 3.6** Espectros de raios-X adquiridos na análise de SRXRF: (a) branco analítico, (b) proteína de 43 kDa do cultivo em solo, (c) proteína de mesma massa molar do tratamento com Zn(II) e (d) proteína de mesma massa molar do tratamento com a solução mista.....111
- Figura 3.7** Bandas de proteínas reduzidas ao espaço bidimensional. As amostras são classificadas em 6 grupos. (a) Matriz U – reúne a influência de todas as variáveis do sistema e (b) *Labels* – os quais apresentam os conjuntos de amostras. A barra contendo escala de cores apresenta as intensidades de fluorescência auto-escaladas.....113
- Figura 3.8** Mapas dos componentes das bandas de proteínas. Cada mapa apresenta a intensidade de fluorescência de uma espécie química detectada por SRXRF. A barra contendo escala de cores apresenta as intensidades de fluorescência auto-escaladas.....115

INTRODUÇÃO

A determinação de espécies químicas em baixas concentrações em seres vivos tornou-se necessária, já que pequenas variações em suas concentrações podem determinar suas essencialidades ou toxicidades. A toxicidade destas espécies pode ocasionar doenças ou, então, uma série de conseqüências patológicas. Desta forma, o metabolismo de elementos em baixas concentrações presentes em sistemas biológicos possui grande relevância para estudos bioquímicos, farmacológicos e toxicológicos. A maioria destes elementos em baixas concentrações são íons metálicos que podem se ligar a centros ativos de várias proteínas e enzimas [1]. Estas macromoléculas, denominadas metaloproteínas, *metal-binding* proteínas e metaloenzimas, são responsáveis por diversos processos metabólicos que promovem um pleno desenvolvimento do organismo. Os íons metálicos são componentes fundamentais da estrutura molecular das proteínas e, portanto, estão envolvidos em processos importantes como catálise, regulação enzimática e expressão gênica [2,3].

Uma série de fatores externos como exposição a íons metálicos ou outros tipos de contaminação, dieta alimentar e tratamentos com medicamentos podem afetar adversamente a homeostase, ou seja, o equilíbrio entre a ligação íon metálico e proteína. Isso pode ocasionar diversos efeitos tóxicos nos organismos que precisam ser investigados. Especialmente em estudos envolvendo as metaloproteínas é necessário identificar, localizar e quantificar os íons metálicos presentes nas suas estruturas para compreender o papel que as mesmas desempenham nos sistemas biológicos. A localização destes íons, bem como a sua quantificação, melhora o entendimento da sua função nutricional, impacto bioquímico e toxicológico nos organismos [4]. Para isso, é preciso associar tecnologias com alto poder de separação com aquelas que possuam elevada sensibilidade para a detecção. Somente desta maneira é possível efetuar estudos relacionados à especificação de íons metálicos em proteínas [5].

Antes de ser realizada a localização e quantificação é necessário que seja utilizado algum processo de separação das macromoléculas que contenham estes íons. Dentre as técnicas disponíveis de separação de proteínas destaca-se a eletroforese em gel, principalmente a eletroforese bidimensional (2D-PAGE). Esta técnica separa simultaneamente uma grande variedade de espécies protéicas de um proteoma [6]. No

entanto, ressalta-se que para realizar estudos de especiação é necessário manter a integridade da ligação íon metálico e proteína durante a separação, independente do tipo de eletroforese empregada.

Pelo fato de alguns μg de amostras ficarem dispostos em uma área de poucos mm^2 no gel é comum surgirem problemas de representatividade por se tratar de amostras biológicas, em que indivíduos de uma mesma espécie podem apresentar variações na quantidade e tipo de proteína expressa. Devido a estas características, é imprescindível o emprego de procedimentos analíticos que visem aperfeiçoar os resultados.

Nas últimas décadas, a espectrometria atômica vem sendo usada para detecção de íons metálicos em proteínas inseridas em gel. Os sistemas de detecção são baseados nas técnicas de espectrometria de absorção atômica e técnicas nucleares. Atualmente, observa-se o uso crescente da espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) [7].

Neste trabalho, foram utilizadas várias técnicas analíticas com elevada sensibilidade e seletividade para que fosse possível analisar o crescimento e o desenvolvimento dos girassóis frente a distintas condições de cultivo. Os tratamentos aplicados consistiam em contaminar o meio de cultura com íons metálicos (Cd, Cu, Pb e Zn). Além disso, foram avaliados os efeitos desta ação nas proteínas e nas metaloproteínas dos girassóis. Para isso, foram localizados e quantificados uma série de íons metálicos presentes em proteínas de folhas de girassóis procedentes de diferentes tratamentos.

Com este procedimento buscou-se unir informações que normalmente são apresentadas de modo fragmentado na literatura. Desta forma, foi possível obter uma visão mais detalhada do complexo sistema envolvendo o íon metálico e a proteína, bem como as suas implicações no metabolismo vegetal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Voet, D., Voet, J. G. e Pratt, C. W., Fundamentals of biochemistry, *John Wiley & Sons*, Londres, 1999.

- [2] Kennedy, M. L. e Gibney, B. R., *Metalloprotein and redox protein design*. **Current Opinion in Structural Biology**, 11(2001)485.
- [3] Liu, C. e Xu, H., *The metal site as a template for the metalloprotein structure formation*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 88(2002)77.
- [4] Gao, Y., Chen C., Chai, Z., Zhao, J., Liu, J., Zhang, P. e 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**, 127(2002)1700.
- [5] Ma, R., McLeod, C. M., Tomlinson, K. e Poole, R. K., *Speciation of protein-bound trace elements by gel electrophoresis and atomic spectrometry*. **Electrophoresis**, 25(2004)2469.
- [6] Melvin, M., **Electrophoresis**, John Wiley & Sons, London, 1987.
- [7] Garcia, J. S, Magalhães, C. S. e Arruda, M. A. Z., *Trends in metal-binding and metalloprotein analysis*. **Talanta**, 69(2006)1.

CAPÍTULO 1
Desenvolvimento dos Girassóis

1. OBJETIVO

O objetivo descrito neste primeiro Capítulo foi avaliar as modificações ocorridas nos girassóis durante o cultivo em diferentes substratos, principalmente no que se refere à contaminação por íons metálicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. GIRASSOL

O girassol é originário da região compreendida entre o norte do México e o sul dos Estados Unidos. Os primeiros cultivos desta planta, com finalidade comercial, foram realizados na Rússia por volta de 1830. No Brasil, as primeiras referências sobre o girassol datam de 1924. Esta planta pertence à família das Compostas (Asteráceas), a qual compreende 920 gêneros e mais de 19.000 espécies, sendo a mais numerosa família das Angiospermas. Especificamente o gênero *Helianthus* tem cerca de 70 espécies, sendo que as alturas das plantas deste gênero variam entre 1 a 3 m [1]. A cultura de girassol é de simples manejo e resistente, ou seja, necessita de pouca água e suporta variações de temperatura. Por estas razões o girassol apresenta uma maior adaptação ao estresse ocasionado por condições adversas. Além disso, apresenta rápido crescimento, com ciclo de vida em torno de 130 dias.

O girassol (*Helianthus annuus* L.) destaca-se por ser a quinta oleagina em produção de grãos. Em 2005, a sua produção mundial foi superior a 25 milhões de toneladas. A participação do Brasil é de cerca de 0,5% da produção mundial, contribuindo com 147 mil toneladas deste grão. Apesar do Brasil ser um produtor pouco expressivo, ressalta-se que esta cultura tem apresentado um crescimento constante a fim de acompanhar o aumento no consumo interno [2].

Além do fator econômico gerado pela produção de óleo, o girassol apresenta características muito importantes para o solo, pois suas raízes promovem a reciclagem de nutrientes. A grande quantidade de massa seca produzida por esta cultura também faz

com que os níveis de matéria orgânica no solo sejam elevados, proporcionando, assim, uma melhor estruturação do mesmo. Por todos estes motivos, a cultura do girassol é apropriada para a rotação de culturas comerciais. Além disso, as folhas e o caule dos girassóis podem ser utilizados na alimentação animal na forma de silagem ou farelo [1]. De acordo com Hill, *et al.* [3], a silagem de girassol tem teor de proteína bruta entre 9,0 a 13,6%. Estes valores são 30% maiores do que aqueles encontrados na silagem de milho.

É importante enfatizar ainda que a grande quantidade de biomassa produzida nesta cultura também pode acumular uma elevada concentração de íons metálicos em seus tecidos. Esta característica faz com que o girassol seja bastante empregado no processo denominado fitorremediação. Neste processo as plantas são empregadas para extrair ou assimilar íons metálicos, pesticidas, xenobióticos ou compostos orgânicos deixando o solo ou o ambiente aquático sem estes contaminantes, mesmo que isso gere alguns problemas para o crescimento e desenvolvimento das mesmas. A fitorremediação é considerada uma tecnologia segura, que apresenta baixo custo e que causa menor impacto ao meio ambiente que outros processos adotados com a mesma finalidade [4,5].

Devido à multiplicidade do uso desta cultura, há um aumento na demanda por informações sobre a mesma. A seguir são citados alguns trabalhos referentes a potencialidades desta planta para a remoção de íons metálicos e, conseqüentemente, na sua utilização no processo de fitorremediação.

No trabalho de Lin, *et al.* [6], foram examinados os efeitos de diferentes concentrações de cobre ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ a 1 mmol L^{-1}) no crescimento e na acumulação deste elemento nas raízes, hipocótilo, cotilédone e nas folhas do girassol. Foi constatado que as plantas expostas à concentração de $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ de cobre aumentaram em 33% o comprimento das raízes ao serem comparadas com o controle. Por outro lado, os girassóis submetidos ao nível de 1 mmol L^{-1} do mesmo elemento tiveram seu crescimento significativamente diminuído. Além disso, foi observado que os níveis de cobre nas diferentes partes do girassol foram maiores com o aumento da concentração de cobre empregada. Alguns estudos referentes à presença de cádmio no desenvolvimento do girassol foram realizados por Azevedo, *et al.* [7]. Os girassóis expostos a $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de cádmio apresentaram diminuição nos níveis de vários importantes macronutrientes (Ca, Cu, Fe, Mg e Mn).

As alterações fisiológicas nos girassóis em resposta ao plantio utilizando resíduo sólido de curtume com elevadas concentrações de cromo, ferro, manganês e zinco foram reportadas por Singh e Sinha [8]. Para isso, os autores avaliaram o crescimento das plantas. Além disso, foi utilizada microscopia eletrônica de varredura para analisar o tecido foliar dos girassóis. Com o aumento da concentração de resíduo empregado, as plantas apresentaram um maior número de folhas e as suas alturas foram maiores. Entretanto, houve um comportamento inverso na raiz, ou seja, o comprimento da mesma foi menor com o aumento da concentração de resíduo. As folhas também apresentaram uma ampliação no número de estomas, além da degradação de algumas células nas plantas desenvolvidas na presença de resíduo de curtume. O uso do girassol no processo de fitorremediação também foi proposto por Madejón, *et al.* [9]. Nesse caso, uma área contaminada com resíduo de mineração, apresentando elevados teores de As, Fe, Pb e Zn, foi utilizada para o plantio. As plantas sob tal condição foram significativamente afetadas no que se refere à altura e à biomassa produzida.

Na literatura também são reportados trabalhos que avaliam as alterações fisiológicas, relacionadas, principalmente, à produção de espécies antioxidantes. No trabalho de Gallego, *et al.* [10] foi avaliada a relação entre a toxicidade de Cd(II), Cu(II) e Fe(II) e o estresse oxidativo sofrido pelos girassóis. A adição dos íons metálicos diminuiu os níveis de clorofila e glutathione, além de provocar um aumento da peroxidação lipídica. Os íons metálicos avaliados também causaram um decréscimo dos níveis de enzimas antioxidantes (catalase, ascorbato peroxidase e glutathione redutase). Em um trabalho mais recente de Gallego, *et al.* [11] foram estudados, nas células de girassol (calos embriogênicos), os mecanismos antioxidativos mediados pela glutathione em resposta à contaminação por cádmio. A razão entre os níveis de glutathione reduzida e de glutathione oxidada foi menor ao ser comparada com o controle. No entanto, a concentração de fitoquelatinas foi duas vezes superior. Com estes resultados, os calos apresentaram adaptação à presença de cádmio. A influência deste elemento no desenvolvimento da cultura de girassóis também foi averiguada por Azevedo, *et al.* [12]. Neste trabalho, a exposição de cádmio também reduziu significativamente a concentração de proteínas solúveis nas folhas e nos calos embriogênicos. As atividades da catalase e da peroxidase apresentaram decréscimo na presença da referida contaminação, acarretando problemas na integridade das membranas celulares.

2.2. ÍONS METÁLICOS EM PLANTAS

Normalmente, a composição química das plantas está estritamente relacionada à composição elementar do meio de cultura. Entretanto, esta relação depende de vários outros fatores tais como pH do meio, teor de matéria orgânica, concentração e se o elemento está na forma disponível ou não para ser absorvido. Além disso, a distribuição e o acúmulo de uma espécie química dependem consideravelmente do elemento em questão, do tipo de planta e da fase de desenvolvimento da mesma [13].

Como nutrientes, as plantas necessitam de diversos íons metálicos para um crescimento e desenvolvimento normal. Dentre os macronutrientes catiônicos, destacam-se o K, Ca, e Mg pelo fato de desempenharem importantes funções celulares. Já os micronutrientes catiônicos são íons de metais de transição que são fundamentais na maioria das reações de oxi-redução. O ferro, por exemplo, participa da síntese da clorofila, além de ser um importante componente das heme-proteínas (por exemplo citocromo) e, também, de várias enzimas. O cobre, por sua vez, participa da constituição de certas proteínas responsáveis pela transferência de elétrons durante o processo de fotossíntese e respiração. O zinco exerce papel estrutural e/ou catalítico em algumas proteínas e enzimas. Quando alguns destes íons metálicos estão presentes em quantidades insuficientes, diversos problemas podem ocorrer. O mesmo acontece quando eles estão presentes em excesso. As plantas podem acumular em seus tecidos, uma grande quantidade de íons metálicos devido ao fato de apresentarem grande capacidade de se adaptar às várias condições químicas do ambiente [14].

No Quadro 1.1 estão apresentados os valores apropriados dos níveis de alguns nutrientes no solo para a cultura de girassol. De maneira geral, as condições de fertilidade do solo adequadas ao seu cultivo são as mesmas exigidas pelas culturas de soja e milho. Para a avaliação do estado nutricional da planta, a folha é a parte mais adequada por apresentar a maior atividade metabólica. Por este motivo, informações a respeito dos teores de importantes nutrientes nas folhas de girassol coletadas no início do florescimento também são mostradas no Quadro citado [1].

Quadro 1.1 – Concentrações dos principais nutrientes para o desenvolvimento do girassol.

Nutriente	Solo (mg kg ⁻¹)*	Folha (mg g ⁻¹)**
Ca	-	19-32
Cu	1-126	0,024-0,042
K	-	31-45
Fe	-	0,120- 0,235
Mg	-	5,1-9,4
Mn	10-4000	0,055- 0,180
P	-	2,9-4,5
Zn	10-250	0,029-0,043

* Informações obtidas da referência [15],

** Informações obtidas da referência [1],

- Dado não disponível.

Como mencionado, diferentes espécies de vegetais possuem respostas distintas à toxicidade de íons metálicos. Em geral, o excesso de íons metálicos interfere em diversos processos fisiológicos. Os íons metálicos em concentrações elevadas também diminuem o vigor das plantas afetando o seu desenvolvimento e crescimento.

Especificamente, o cobre, quando absorvido em excesso, pode inibir o crescimento das plantas, provocar distúrbios no processo de mitose, diminuir o comprimento das raízes e prejudicar as células de membranas epidérmicas da parte radicular [6]. O cádmio pode ocasionar uma série de alterações como inibir o crescimento e, em alguns casos, acarretar a morte por meio de mecanismos que ainda não estão completamente elucidados. Este elemento também afeta o processo de fotossíntese (ocasionado por mudanças estruturais nos cloroplastos), além de diminuir a quantidade de clorofila. Ressalta-se que este elemento, mesmo não sendo essencial, é prontamente absorvido pelas raízes sendo facilmente translocado para as partes aéreas das plantas devido a sua semelhança com o zinco. Estes dois íons são conduzidos nas plantas pelos mesmos transportadores, ou então, são controlados por reguladores comuns [16]. Em girassóis, a avaliação do cádmio merece atenção particular uma vez que esta cultura tende mais do que outras, a acumular este íon [9,10].

A fitotoxicidade do chumbo é relativamente baixa comparada a outros elementos. Este íon metálico, mesmo não sendo prontamente solúvel no solo é absorvido principalmente pelas raízes. A translocação do Pb para a parte aérea da planta é limitada, ficando na maioria dos casos basicamente restrito ao sistema radicular. Mesmo assim, a presença de chumbo em solos deve ser constantemente monitorada [17].

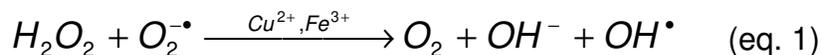
Quando presente em elevadas concentrações, o zinco pode ser translocado das raízes para as partes aéreas, localizando-se especialmente nos cloroplastos, nos vacúolos e nas membranas celulares. Desta forma, a toxidez do zinco se manifesta pelo atrofiamento da planta, diminuição da área foliar e clorose. Pode aparecer também uma pigmentação avermelhada atribuída à presença de compostos fenólicos. O excesso de Zn pode ainda diminuir a absorção de fósforo e ferro [15].

2.3. ESTRESSE OXIDATIVO E MECANISMOS DE DEFESA

A concentração elevada de íons metálicos, como exemplificado, conduz a uma série de alterações que ocasionam vários problemas metabólicos. As plantas por sua vez possuem alguns mecanismos para reduzir os níveis destes íons presentes no citosol das células. Estes mecanismos incluem a compartimentalização dos mesmos em estruturas sub-celulares, exclusão e/ou diminuição do transporte por meio de membranas e a formação de compostos (fitoquelatinas e metalotioneínas) capazes de complexar íons metálicos. As fitoquelatinas são oligopeptídeos sintetizados especificamente em plantas submetidas a estresse metálico. Elas são formadas por três tipos de aminoácidos (cisteína, ácido glutâmico e glicina), podendo ter entre 2 a 11 aminoácidos em cada cadeia. No caso das fitoquelatinas, a desintoxicação dos íons metálicos é feita por meio da ligação entre o íon e o grupo tiol da unidade da cisteína ($\text{HOOCCHCH}_2\text{SHNH}_2$) [18].

Apesar de todos estes meios adotados pelas plantas, muitas vezes os mesmos não são suficientes para combater os efeitos adversos provocados pela presença excessiva de íons metálicos. Estes íons, entre outros fatores, podem induzir a um estresse oxidativo por causa do aumento nos teores de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, *Reactive Oxygen Species*). A intoxicação com poluentes metálicos leva ao estresse oxidativo pelo fato destes íons estarem envolvidos em diferentes tipos de mecanismos de geração de

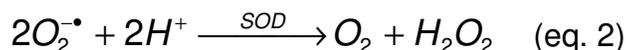
ROS. Por exemplo, íons de metais de transição como Fe(III) e Cu(II) participam do ciclo de Haber-Weiss (apresentado na equação 1), o qual produz radicais hidroxila a partir do radical superóxido e do peróxido de hidrogênio [20].

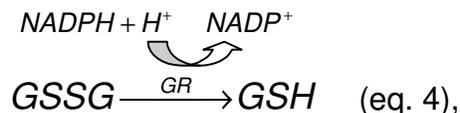
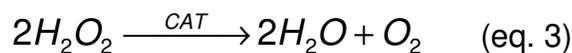


Outros íons metálicos que não possuem capacidade redox tais como Cd(II), Hg(II) e Pb(II) também interferem nos níveis de ROS, uma vez que reduzem os teores de espécies antioxidantes como a glutathiona [16]. Desta forma, os íons metálicos são capazes de causar prejuízos de forma direta agindo como redutores e gerando assim as ROS, ou, então, indiretamente, desativando o sistema antioxidante [18].

Os principais exemplos de ROS são o oxigênio singlete, o peróxido de hidrogênio, o radical superóxido e o radical hidroxila. Estas ROS são produzidas normalmente em organismos aeróbicos durante o processo de respiração e fotossíntese. Entretanto, níveis elevados de íons metálicos conduzem a um desequilíbrio na formação das mesmas. As ROS, por sua vez, podem interagir com proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos, fato este que causa alterações na estrutura das células e mutagenese [19,20].

A partir do momento que estas espécies de oxigênio reativas estão presentes, o organismo atua de modo a minimizar os seus efeitos. O mecanismo de desintoxicação consiste em ativar o sistema antioxidante a fim de interromper os eventos oxidativos que, geralmente, acontecem em cascata. Os principais compostos antioxidantes incluem o ascorbato, a vitamina E, a glutathiona e o β -caroteno e, finalmente, as enzimas antioxidantes. Todos estes compostos são capazes de neutralizar ou mesmo remover as ROS. Dentre as enzimas antioxidantes, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathiona redutase (GR), a glutathiona peroxidase e a peroxidase. Especificamente, as enzimas SOD, CAT e a peroxidase convertem os radicais superóxido e o peróxido de hidrogênio em espécies menos reativas. Desta forma, a SOD transforma o superóxido em H_2O_2 . Por sua vez, a CAT e a peroxidase converte o H_2O_2 em H_2O . As vias de atuação destas enzimas são descritas a seguir: equação 2 – reação catalisada pela SOD, equação 3 – reação catalisada pela CAT e equação 4 – reação catalisada pela GR [18-21].





onde GSSG é a glutationa oxidada, GSH é a glutationa reduzida e NADPH é nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Os equipamentos e acessórios que foram empregados na parte inicial desta tese são enumerados a seguir:

- Balança analítica, marca Mettler, modelo AE200;
- Chapa aquecedora, marca Marconi, modelo MA239;
- Destilador sub-ebulição, marca Marconi, modelo MA075;
- Espectrômetro de emissão atômica com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP OES), marca Perkin-Elmer, modelo Optima 3000 DV;
- Forno de microondas tipo cavidade, marca Provecto Analítica, modelo DGT 100 *Plus*;
- Sistema desionizador Milli-Q, marca Millipore, modelo Quantum™ cartridge;
- Vidrarias apropriadas.

3.2. REAGENTES E SOLUÇÕES

Os reagentes utilizados possuíam grau analítico. Todas as soluções foram feitas usando água desionizada. Para as soluções-padrão de várias espécies químicas

empregou-se HNO₃ destilado abaixo do seu ponto de ebulição. A concentração de HNO₃ usada para as determinações realizadas por ICP OES, foi de 0,44 mol L⁻¹ (2% v/v). Os reagentes/soluções usados estão relacionados a seguir:

- Ácido bórico, H₃BO₃, MM = 61,83 g mol⁻¹ (Merck);
- Ácido clorídrico, HCl 38%, MM = 36,48 g mol⁻¹ (J. T. Baker);
- Ácido fluorídrico, HF 48%, MM = 20,01 g mol⁻¹ (Merck);
- Ácido nítrico sub-destilado, HNO₃ 65% (Merck);
- Material certificado de referência de folhas de faia (*Beech leaves*, CRM 100);
- Nitrato de cádmio tetrahidratado, Cd(NO₃)₂•4H₂O, MM = 308,47 g mol⁻¹ (Merck);
- Nitrato de cobre trihidratado, Cu(NO₃)₂•3H₂O, MM = 241,60 g mol⁻¹ (Synth);
- Nitrato de chumbo, Pb(NO₃)₂, MM = 331,21 g mol⁻¹ (Mallinckrodt);
- Nitrato de zinco hexahidratado, Zn(NO₃)₂•6H₂O, MM = 297,49 g mol⁻¹ (Ecibra);
- Peróxido de hidrogênio, H₂O₂ 30% (Merck);
- Soluções-padrão de várias espécies químicas (TecLab).

3.3. PLANTIO DOS GIRASSÓIS

Neste trabalho, as sementes de girassol (*Helianthus annuus L.*) germinaram e se desenvolveram em potes de plástico (capacidade de 1 litro). O substrato utilizado no plantio dos girassóis foi solo (marca Nutri Solos Produtos, Piracaia, SP), ou, então, uma mistura deste mesmo solo com vermicomposto (marca Xaxim, Campinas, SP). A caracterização do vermicomposto empregado no cultivo foi realizada por Pereira e Arruda [22]. O vermicomposto apresenta 27% de matéria orgânica total, 58% de umidade, pH= 5,7 e teor de cinza de 69%.

Os girassóis foram submetidos a 7 diferentes tratamentos descritos resumidamente no Quadro 1.2. Para isso, foram colocadas três sementes em cada pote para serem germinadas. Após a germinação, foi selecionada a planta que apresentava maior altura e melhor vigor, sendo as outras plantas removidas do meio de cultura. Os girassóis (uma planta por pote) se desenvolveram durante 40 dias (nos meses de maio/junho de 2004) à

temperatura entre 18-24°C (noite e dia, respectivamente) sob condições ambientais. No primeiro tratamento, as plantas foram cultivadas somente em solo (400 g). Do segundo ao sétimo tratamento foi empregada a mistura de solo e vermicomposto (320 g e 80 g, respectivamente).

Nas duas primeiras condições, usadas como testemunhos, foram adicionados 30 mL de água desionizada em dias alternados para a irrigação dos girassóis, totalizando 600 mL. Do terceiro ao sexto tratamento, a água desionizada foi substituída por soluções sintéticas individuais de íons metálicos na concentração de 500 mg L⁻¹. Durante a irrigação foram adicionados, ao todo, 300 mg de cada íon metálico. Os íons empregados individualmente foram: cádmio, cobre, chumbo e zinco, preparados a partir de seus respectivos nitratos, por apresentarem elevada solubilidade em água. Finalmente, no sétimo tratamento, foi usada uma solução contendo simultaneamente os 4 íons metálicos mencionados denominada “solução mista”. A concentração de cada um destes íons na referida solução foi 500 mg L⁻¹. A irrigação com água desionizada ou solução de íons metálicos foi realizada próximo aos caules das plantas.

Quadro 1.2 – Descrição resumida das condições adotadas no cultivo de girassol.

TRATAMENTO	SUBSTRATO	IRRIGAÇÃO	IDENTIFICAÇÃO
1º	Solo	Água desionizada	Solo
2º	Solo e vermicomposto	Água desionizada	Solo+Verm.
3º	Solo e vermicomposto	Solução de cádmio	Cd(II)
4º	Solo e vermicomposto	Solução de cobre	Cu(II)
5º	Solo e vermicomposto	Solução de chumbo	Pb(II)
6º	Solo e vermicomposto	Solução de zinco	Zn(II)
7º	Solo e vermicomposto	Solução de cádmio, cobre, chumbo e zinco	Solução Mista

Pelo menos 10 réplicas foram feitas em cada tratamento. Especificamente no tratamento com a solução mista, foi adotado um maior número de réplicas (n=20). Ao término do experimento foram obtidas 70 plantas. Durante o período de cultivo (a cada 7 dias) foi feito o acompanhamento do crescimento dos girassóis em relação à altura e ao

número de folhas. Também foi realizada a avaliação da massa das folhas, caules e raízes das plantas, após a permanência de 40 dias no meio de cultura.

3.4. DETERMINAÇÃO DAS ESPÉCIES QUÍMICAS NOS SUBSTRATOS

Para obter um perfil das espécies químicas responsáveis pelo desenvolvimento dos girassóis, foi efetuada a análise dos substratos antes e após o cultivo. Para isso, primeiramente, foi realizada a amostragem e a secagem dos mesmos à temperatura de 60°C até massa constante. Para a amostragem, os substratos foram reunidos em um recipiente onde foi efetuada a homogeneização manual dos mesmos seguida de quarteamento. Em seguida, as amostras de substratos empregados no cultivo dos girassóis foram decompostos em forno de microondas tipo cavidade (Provecto Analítica, modelo DGT 100 *Plus*) equipado com sensor de temperatura, frascos de Teflon e magnetron de 2450±13 MHz com potência de 1200 W. O programa de decomposição utilizado foi o mesmo proposto por Alves, *et al.* [23] composto pelas etapas: (1) 250 W por 3 min.; (2) 500 W por 5 min.; (3) 600 W por 5 min.; (4) 700 W por 20 min. e (5) 80 W por 2 min. De acordo com a recomendação feita pelos autores, o programa de decomposição foi executado 2 vezes. Foram feitas três réplicas de cada amostra.

Na digestão foram empregados, aproximadamente, 250 mg de amostra, 10 mL de água régia (HCl e HNO₃ sub-destilado, na proporção de 3:1, respectivamente) e 5 mL de HF. Após as digestões, foram adicionados cerca de 400 mg de H₃BO₃ para remover o HF. As soluções obtidas foram evaporadas a 40°C para a eliminação do excesso de HNO₃, e retomadas para 25 mL usando solução de HNO₃ sub-destilado a 2% (v/v).

As concentrações de 12 espécies químicas (Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Ni, P, Pb e Zn) foram avaliadas por ICP OES (Perkim-Elmer, modelo Optima 3000 DV). Alguns destes elementos foram selecionados pelo fato de naturalmente fazerem parte da constituição química do solo. Já outros elementos foram escolhidos com a finalidade de se avaliar a permanência dos contaminantes introduzidos no meio de cultura.

3.5. DETERMINAÇÃO DAS ESPÉCIES QUÍMICAS NOS EXTRATOS VEGETAIS

Uma porção das folhas, caules e raízes dos girassóis provenientes dos 7 tratamentos foi lavada com água desionizada e seca à temperatura de 60°C por 72 h até massa constante. Em seguida, estes materiais foram decompostos também em forno de microondas tipo cavidade de acordo com a programação proposta por Matos [24]. O programa foi composto pelas seguintes etapas: (1) 400 W por 5 min.; (2) 790 W por 8 min. e (3) 320 W por 4 min. Este programa foi executado 2 vezes, seguindo a recomendação do autor.

Na digestão foram empregados aproximadamente 250 mg de amostra, 6 mL de HNO₃ sub-destilado e 0,5 mL de H₂O₂ (30% v/v). No caso da raiz, por limitação da quantidade de extrato vegetal produzido, foi usado em torno de 100 mg para ser possível efetuar a decomposição em triplicata. As soluções adquiridas no processo de decomposição foram evaporadas a 40°C até quase a secura, e retomadas para 10 mL utilizando solução de HNO₃ sub-destilado a 2% (v/v). Foram avaliadas 12 espécies químicas, em geral escolhidas por fazerem parte da nutrição das plantas, desempenhando funções importantes no seu crescimento e desenvolvimento. As concentrações das espécies químicas (Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Na, Ni, P, Pb e Zn) foram determinadas utilizando ICP OES.

A exatidão do método analítico foi averiguada por meio da amostra certificada de folhas de faia (*Beech leaves*, BCR 100). Para isso, foram pesados cerca de 200 mg de amostra. O procedimento adotado foi o mesmo descrito anteriormente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DOS GIRASSÓIS

As sementes de girassol dos diferentes meios de cultivo germinaram entre o sexto e o décimo dia de plantio. Neste processo, as sementes irrigadas com solução mista foram

as mais tardias. Por este motivo, as primeiras avaliações referentes à altura das plantas, foram realizadas ao 18º dia de plantio. Os dados relacionados a este parâmetro podem ser observados na Figura 1.1.

O meio de cultura exerceu influência no crescimento dos girassóis. Para examinar efetivamente esta influência, o teste estatístico Tukey foi aplicado aos dados das alturas das plantas aos 40 dias de plantio. Este teste estatístico permite verificar, de modo bastante simplificado, por meio da análise da variância (ANOVA), se os dados apresentam diferenças significativas. Caso afirmativo, o teste atribui letras ao conjunto de dados. Para isso, as médias são colocadas em ordem decrescente. Ao maior valor da média é aplicada a letra “a”, a próxima média significativamente diferente é atribuída a letra “b”, e assim sucessivamente. Se estas duas médias não apresentassem diferenças significativas poderiam ser colocadas ao lado da segunda média a letra “a” ou as letras “ab”. Desta forma, os valores de médias acompanhados por pelo menos uma letra igual não apresentam diferenças significativas ao nível de significância empregado. Por exemplo, a média acompanhada das letras “ab” não apresenta diferença significativa da média com as letras “bc” [25]. O referido teste estatístico foi aplicado com o auxílio do programa ASSISTAT versão 7.3, obtido gratuitamente [26].

O teste Tukey demonstrou que os girassóis irrigados com solução de cobre e de chumbo apresentam alturas estatisticamente iguais às plantas cultivadas com solo e vermicomposto (testemunho). Já os girassóis irrigados com a solução de cádmio apresentavam alturas estatisticamente iguais às plantas irrigadas com solução de chumbo, zinco e aquelas cultivadas somente em solo. Comparando-se a altura média entre as plantas regadas com a solução mista (24 ± 1 cm) e as plantas adubadas com vermicomposto (37 ± 4 cm), constatou-se um decréscimo de *ca.* 35%. Além disso, foi observado um elevado grau de mortalidade (50%) entre as plantas irrigadas com a solução mista. Por esta razão, um maior número de réplicas ($n=20$) foi usado neste tratamento ao ser comparado com os outros tratamentos ($n=10$). Estes dados evidenciam que a contaminação simultânea com os 4 íons metálicos dificultou significativamente o crescimento e desenvolvimento dos girassóis.

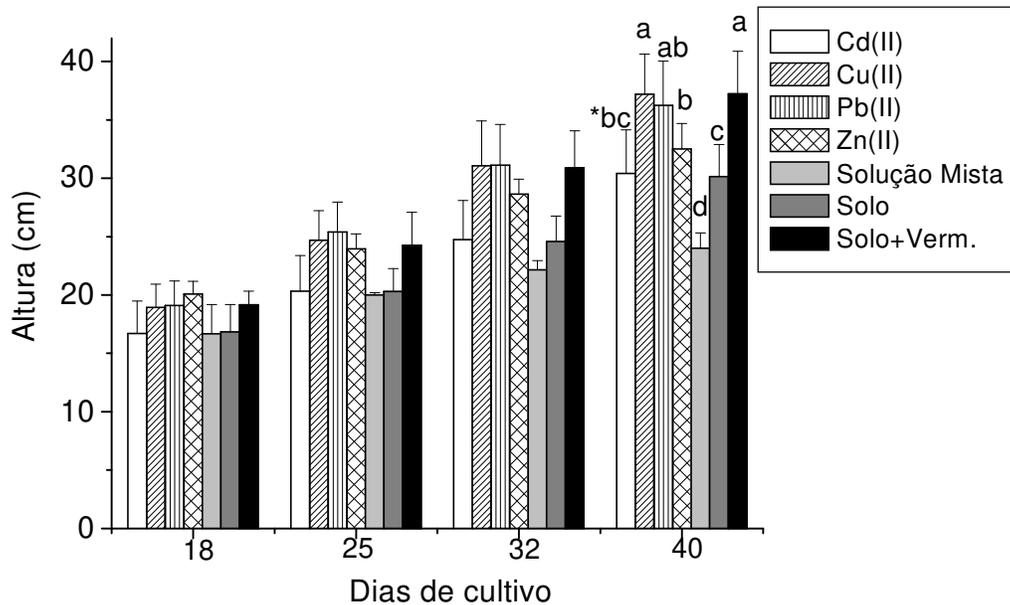


Figura 1.1 – Desenvolvimento dos girassóis (média±desvio padrão, n=10) durante 40 dias de cultivo em diferentes meios. *Valores das médias seguidas por letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de acordo com o teste Tukey.

A avaliação das diferentes partes dos girassóis (folha, caule e raiz) foi feita depois das plantas serem removidas do meio de cultura, lavadas com água desionizada e secas a temperatura ambiente e também a 60°C por 72 h. De acordo com a Figura 1.2, as plantas cultivadas somente em solo apresentaram menor quantidade de biomassa em todas as partes estudadas ao serem comparadas com o tratamento onde foi empregado solo e vermicomposto. Isto demonstra que o vermicomposto auxiliou efetivamente no desenvolvimento do girassol, o qual é verificado por um aumento de 3 vezes na massa de folha e caule, e de 2 vezes na massa de raiz. Este fato ocorreu devido à presença de nutrientes minerais e a maior atividade microbiana em substratos adubados com este material. Experimentos que confirmam a contribuição do vermicomposto no desenvolvimento de plantas também são apresentados por Atiyeh, *et al.* [27].

Quando os girassóis foram irrigados com a solução de íons metálicos, observou-se que a presença deste tipo de contaminante atrapalhou o desenvolvimento da planta. Os girassóis tiveram uma menor quantidade de biomassa ao serem confrontadas com aqueles cultivados em solo e vermicomposto. Este decréscimo ficou mais evidente quando foi usada a solução mista. As folhas e os caules das plantas sob esta condição foram as mais frágeis e menores, e suas raízes apresentaram poucas ramificações, ou seja, houve o comprometimento no desenvolvimento de toda a planta. Entre as plantas irrigadas

individualmente com a solução de Cd(II), Cu(II), Pb(II) e Zn(II) não foi verificada variação significativa referente à quantidade de biomassa produzida, principalmente ao ser observada as folhas e as raízes dos girassóis.

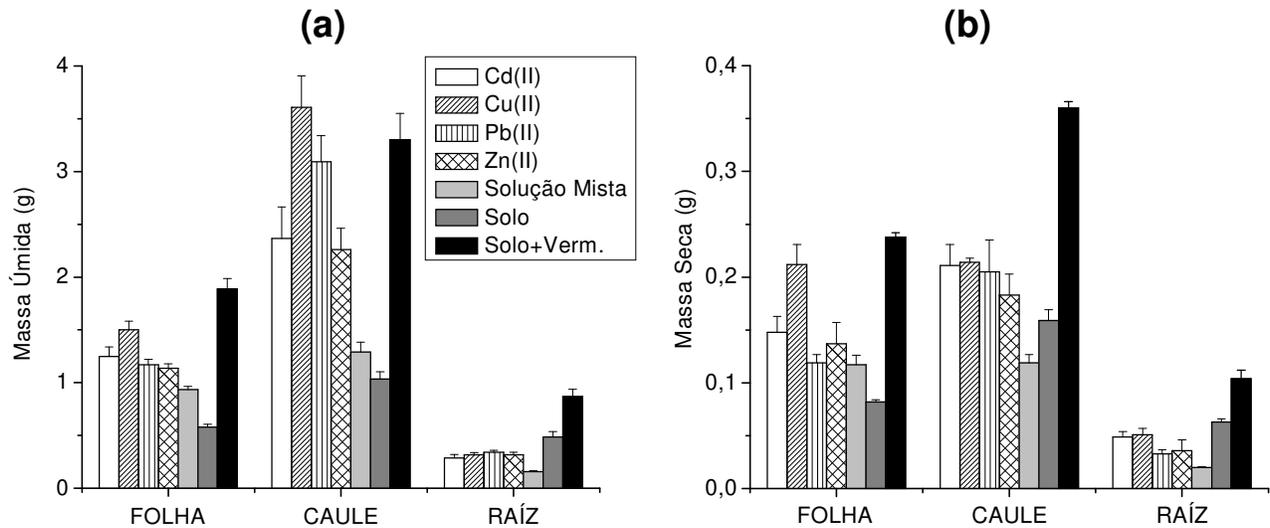


Figura 1.2 – Média da biomassa produzida (n=5) em cada parte da planta depois de 40 dias: (a) massa úmida obtida logo após a colheita e (b) massa seca adquirida depois de 72 h em estufa a 60°C.

Na Figura 1.3 é mostrada a foto comparativa entre os exemplares representativos das plantas procedentes dos 7 tratamentos, decorridos 40 dias de plantio. É possível perceber nesta foto as diferenças no crescimento mencionadas anteriormente.



Figura 1.3 – Girassóis submetidos a diferentes condições de cultivo após 40 dias. Da esquerda para direita: Solo, Solo+Verm., Solução Mista, Cd(II), Cu(II), Pb(II) e Zn(II), respectivamente.

Um maior detalhamento das modificações sofridas pelos girassóis pode ser verificado por meio da Figura 1.4, na qual são apresentadas em destaque as partes das plantas. Sintomas de necrose no caule localizado próximo à raiz podem ser notados nos girassóis contaminados com a solução de cádmio e com a solução mista. Além disso, fica evidente a menor quantidade de raiz presente nestas plantas. A menor quantidade de raízes dificulta a absorção de nutrientes e de água disponível no substrato, visto que, a capacidade de absorção do sistema radicular é diretamente proporcional à sua massa [27]. Foi também observado que algumas plantas contaminadas com chumbo e zinco apresentaram tortuosidades no caule. Estes fatos sugerem que as concentrações dos íons metálicos que contaminavam os substratos atingiram níveis fitotóxicos nas plantas, visto que prejudicaram o desenvolvimento dos mesmos [28]. Tais suposições foram confirmadas em testes descritos a seguir.



Figura 1.4 – Exemplos dos girassóis logo após a colheita (40 dias) onde são enfatizadas as diferenças entre os mesmos. Outras definições, vide legenda da Figura 1.3.

4.2. CONCENTRAÇÕES DAS ESPÉCIES QUÍMICAS ANTES E APÓS O CULTIVO

Os íons metálicos estão presentes naturalmente nos solos, em concentrações variáveis, dependendo da sua composição. No entanto, estas concentrações podem sofrer incremento devido a processos antrópicos. Como neste trabalho foi feita a adição de contaminantes no meio de cultura, avaliou-se a consequência desta ação. Sendo assim, na Tabela 1.1, estão apresentados os dados referentes às concentrações de diversas espécies químicas disponíveis para o crescimento e desenvolvimento dos girassóis, bem como os valores das concentrações fitotóxicas de alguns íons metálicos em solo segundo a CETESB [29].

Tabela 1.1 – Concentrações dos íons metálicos (média±desvio padrão, n=3) determinados nos diferentes substratos empregados no cultivo dos girassóis.

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g g}^{-1}$)							
	Cd	Cu	Cr	K	Fe	P	Pb	Zn
Solo (antes)	- ^a	- ^a	27±3	1112±34	27654±490	1009±6	- ^a	42±2
Solo (após)	- ^a	- ^a	26±3	1090±117	15700±600	- ^a	- ^a	26±2
Solo+Verm. (antes)	- ^a	- ^a	25±3	2965±320	20900±184	1526±100	- ^a	45±1
Solo+Verm. (após)	- ^a	- ^a	- ^a	972±140	15500±800	1454±100	- ^a	41±1
Cd(II)	1200±200	- ^a	25±1	1170±150	15300±300	1413±140	- ^a	43±8
Cu(II)	- ^a	860±10	23±3	2287±320	14600±1400	652±70	- ^a	45±2
Pb(II)	- ^a	- ^a	23±1	1090±21	15100±300	1434±147	780±50	43±5
Zn(II)	- ^a	64±5	24±2	1703±35	14900±200	1850±52	- ^a	1187±93
Solução Mista	960±101	1164±130	26±5	1844±120	14800±300	- ^a	1040±70	959±92
CETESB	3-8	60-125	75	DND	DND	DND	100-400	300-400

-^a < LQ conforme a Tabela 1.2

DND – dado não disponível

As concentrações dos íons Cd(II), Cu(II), Pb(II) e Zn(II) alcançaram níveis fitotóxicos nos substratos quando estes foram acrescidos ao meio. Ressalta-se, também, que as concentrações dos íons Cd(II) e Zn(II) foram menores nos substratos contaminados com a solução mista ao serem comparados com a situação onde eles foram acrescentados individualmente. Estes dados são concordantes com as maiores concentrações de íons metálicos encontradas nos extratos vegetais dos girassóis contaminados com a solução mista. Isso demonstra que houve maior translocação dos íons Cd(II) e Zn(II) dos substratos contaminados com a solução mista para a planta (dados apresentados no item 4.3, Tabela 1.4).

A adição do vermicomposto fez com que maiores concentrações de potássio e fósforo fossem determinadas, indicando, mais uma vez, a capacidade de adubação exercida por este material [22,27]. No caso do fósforo, destaca-se que uma menor concentração foi encontrada no substrato contaminado com a solução mista. Provavelmente, os girassóis absorveram uma maior quantidade de fósforo para combater os efeitos adversos provocados pela presença dos contaminantes, visto que este macronutriente desempenha importantes funções metabólicas tais como armazenamento e fornecimento de energia, além de participar da síntese de proteínas. Verificou-se, ainda, que os girassóis absorveram significativamente os íons ferro (*ca.* 30%). Isto demonstra a importância deste elemento no desenvolvimento das plantas [13,15].

Os íons Ca(II) e Mg(II), apesar de não fazerem parte da Tabela 1.1, também foram detectados. Entretanto, estes íons somente estavam presentes na amostra de solo e vermicomposto antes de ser efetuado o plantio. As concentrações destes íons no referido substrato foram de 717 ± 40 e $44 \pm 4 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

Em alguns casos, os desvios padrão obtidos na determinação das espécies químicas nos substratos foram relativamente elevados (*ca.* 15%). Isto pode ser explicado pelo fato de não ter sido realizado nenhum controle em relação ao tamanho de partícula das amostras. Além disso, as soluções contaminantes foram adicionadas de forma heterogênea ao recipiente empregado no cultivo. Desta maneira, pode ter havido problemas de amostragem. Os limites de detecção e quantificação adquiridos nesta análise são apresentados na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 – Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) obtidos experimentalmente nas amostras de substratos usando a técnica de ICP OES.

	Ca	Cd	Cu	Co	Cr	K	Fe	Mg	Ni	P	Pb	Zn
LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	41	11	17	25	7	140	213	12	44	186	112	3
LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	137	37	57	83	23	466	710	40	147	620	373	10

4.3. ABSORÇÃO E TRANSLOCAÇÃO DAS ESPÉCIES QUÍMICAS NOS DIFERENTES TECIDOS DO GIRASSOL

A capacidade de absorção e translocação dos íons metálicos foi avaliada por meio da decomposição, em forno de microondas à alta pressão, de cada parte do girassol nos diferentes tratamentos, seguida da determinação por ICP OES. Entretanto, primeiramente foi verificada a exatidão da metodologia aplicada utilizando o material de referência certificado (*Beech leaves*, CRM 100).

A Tabela 1.3 apresenta as concentrações das espécies químicas na amostra de folhas de faia submetidas ao método de decomposição utilizado para os extratos de girassóis, bem com os valores certificados. Aos valores mostrados na Tabela 1.3 foi aplicado o teste *t* [25]. Nenhuma diferença estatística foi observada ao nível de 95% de intervalo de confiança para as concentrações de Ca, Mg e P. Já para o K, ao ser usado o nível de 99% de intervalo de confiança, não foi observado diferença estatística.

Tabela 1.3 – Determinação de Ca, K, Mg e P (mg g^{-1} , $n=4$) empregando o método analítico proposto e os seus valores certificados no material de referência certificado (CRM 100).

ANALITO	CONCENTRAÇÃO (mg g^{-1})	
	MÉTODO PROPOSTO	VALOR CERTIFICADO
Ca	4,70 \pm 0,05	5,30 \pm 0,05
K	8,77 \pm 0,25	9,94 \pm 0,20
Mg	0,733 \pm 0,002	0,878 \pm 0,017
P	1,23 \pm 0,01	1,55 \pm 0,04

Após a validação do método, o procedimento foi aplicado às amostras de extratos vegetais. Na Figura 1.5 são apresentadas as distribuições das espécies químicas Ca, K, Fe, Mg, Na e P, respectivamente nas diferentes partes dos girassóis.

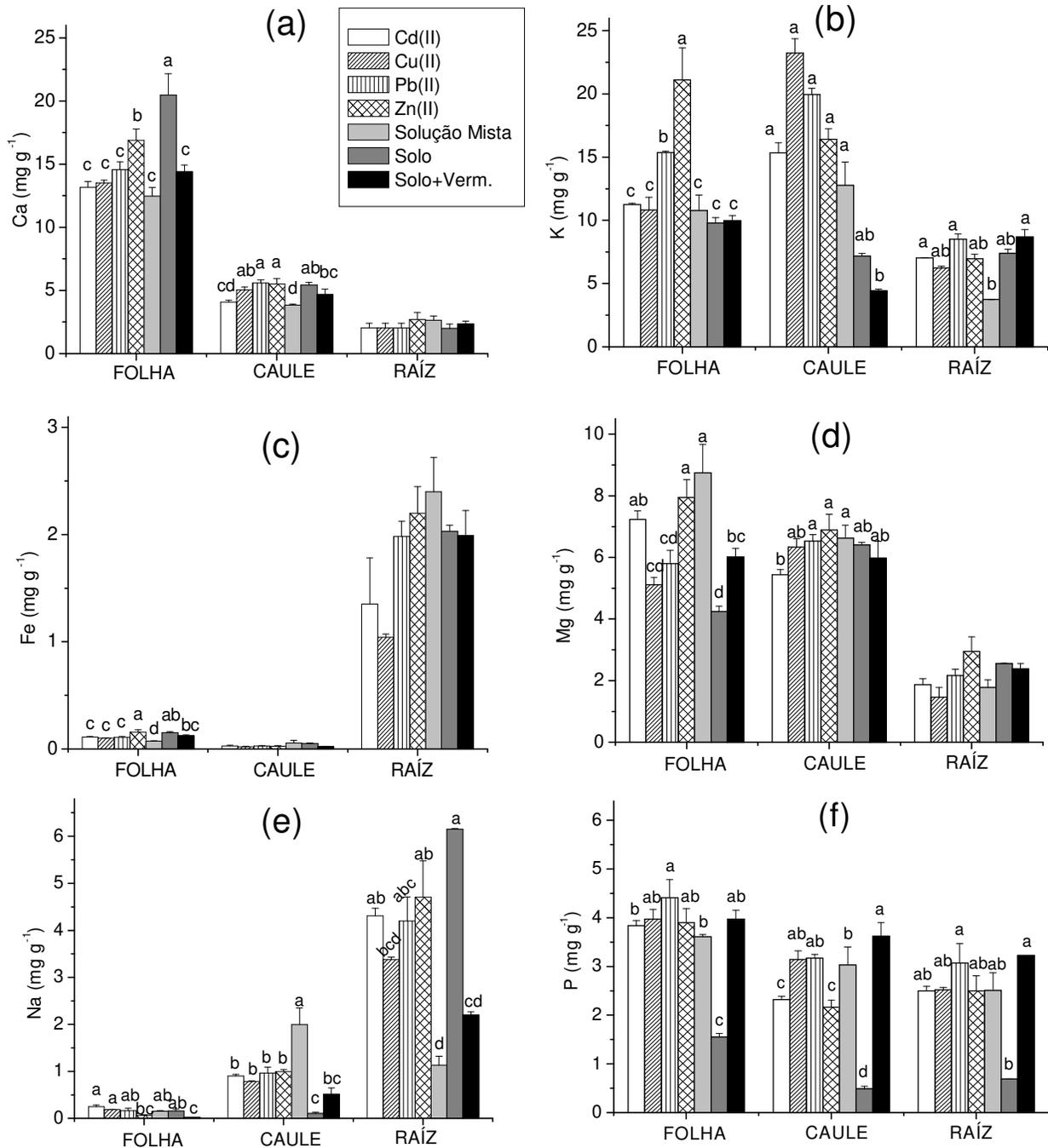


Figura 1.5 – Concentrações de nutrientes em diferentes tecidos do girassol (média±desvio padrão, n=3): (a) Ca, (b) K, (c) Fe, (d) Mg, (e) Na e (f) P. Valores das médias de cada parte da planta seguida por letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. A ausência de letras nas barras indica que a razão do teste F não é significativa, de acordo com o teste ANOVA.

O cálcio é indispensável para manter a estrutura e o funcionamento normal das membranas celulares. De acordo com a Figura 1.5(a), este elemento está presente em toda a planta, porém, ele ficou mais concentrado nas folhas. Isto ocorreu porque ele é preferencialmente transportado pelo xilema, conduzido por um movimento ascendente. Depois de localizado nas folhas, o Ca(II) dificilmente é redistribuído [15]. Também foi observado que na planta onde foi usado somente solo, os níveis deste elemento foram maiores. A presença do vermicomposto dificultou o transporte do Ca(II) para a planta, provavelmente por causa das interações iônicas entre o mesmo e os grupos fenólicos dos ácidos húmicos [30].

Segundo a literatura, o transporte de magnésio nas plantas acontece de forma bastante semelhante ao do cálcio. Entretanto, ocorreu uma inversão na concentração destes dois elementos, ou seja, a presença de um elemento no meio de cultura diminuiu a absorção do outro [10,13]. Tal comportamento foi mais pronunciado no sistema foliar (Figura 1.5(d)) das plantas cultivadas somente em solo. Este fato é associado ao efeito de antagonismo entre estes elementos. Isto explica as concentrações de Mg encontradas nas folhas.

O potássio, absorvido pela raiz, é conduzido para a parte aérea pelo xilema ou mesmo pelo floema. Ao contrário do Ca, a redistribuição do K é facilitada pelo fato de ca. 75% do mesmo estar na forma solúvel nos tecidos vegetais. Tal característica pode ser comprovada comparando-se os níveis de potássio Figura 1.5(b) com os níveis de cálcio Figura 1.5(a). Uma das principais funções do potássio é ativar enzimas, participar de reações de fosforilação e da síntese de proteínas [15].

O ferro pode ser absorvido pelas plantas na forma dos íons Fe(II) e Fe(III). De acordo com a Figura 1.5(c), o ferro se concentrou preferencialmente nas raízes dos girassóis. Este comportamento é o mesmo descrito por Madejón, *et al.* [9]. A presença dos íons metálicos contaminantes não alterou significativamente o processo de absorção deste micronutriente no sistema radicular como pode ser visto na Figura 1.5(c). A maior acumulação do sódio também foi verificada na raiz como mostrado na Figura 1.5(e). Esta informação está de acordo com os dados da literatura que afirmam que a maior concentração deste elemento está na folha seguido do caule e da raiz [15].

Foi observado que o fósforo, Figura 1.5(f), distribuiu-se em toda a planta e que a sua maior fixação foi ocasionada pela adubação com vermicomposto. De acordo com

Madejón, *et al.* [9] e Murillo, *et al.* [17], a concentração normal de P nas folhas em culturas de girassol é de aproximadamente 4 mg g⁻¹. Somente quando o girassol foi cultivado em solo, o nível apropriado deste elemento não foi atingido. A deficiência deste elemento reflete em um menor crescimento da planta. Entretanto, a absorção deste macronutriente não foi afetada pelas diferentes contaminações por íons metálicos.

A distribuição dos íons metálicos contaminantes determinados nos extratos vegetais dos girassóis está disposta na Tabela 1.4. O cádmio encontrou-se disseminando nas três partes da planta onde houve a contaminação com este elemento. Observa-se que a presença dos outros íons (Cu(II), Pb(II) e Zn(II)) presentes na solução mista, potencializou a absorção de Cd aumentando em torno de 3 vezes a concentração deste íon metálico. Os teores considerados normais de Cd na folhagem seca variam entre 0,1 a 1 mg kg⁻¹. Nas folhas dos girassóis, os níveis de Cd encontrados foram de 147 e 379 mg kg⁻¹ para as plantas do tratamento com Cd(II) e com solução mista, respectivamente. Estes valores estão compreendidos dentro da faixa de fitotoxicidade (5-700 mg kg⁻¹) [31]. Nesta concentração, o Cd causa uma série de alterações fisiológicas nas plantas [32]. No trabalho de Gallego, *et al.* [33] foi constatada uma diminuição de 40% no teor de clorofila na folhas contaminadas com Cd. A principal causa de toxidez do Cd parece ser devida a sua combinação com os grupos tíois de enzimas e proteínas, o que provoca desarranjos no metabolismo. Todos estes fatores justificam um menor desenvolvimento dos girassóis na presença deste elemento.

A absorção do Pb foi detectada nos girassóis contaminados com este elemento. O nível normal de Pb na folhagem seca é de 2 a 5 mg kg⁻¹ [31]. A concentração determinada nas folhas de girassol do tratamento com chumbo foi de 23 mg kg⁻¹. Este valor é 4 vezes maior que o recomendado.

O cobre e o zinco são micronutrientes essenciais, sendo responsáveis por vários processos celulares. Geralmente, a contaminação de cobre em plantas é menor em comparação com Cd(II), Pb(II) e Zn(II) [9]. Isto ocorre porque os íons Cu ligam-se fortemente a matéria orgânica e também a colóides presentes no solo, dificultando a sua disponibilidade para as plantas. Em excesso, os íons Cu(II) causam respostas fisiológicas que diminuem o vigor e inibem o crescimento das plantas, principalmente devido ao funcionamento anormal das raízes que ocasionam perdas de nutrientes previamente adsorvidos [6]. A adição de íons de cobre não induziu a uma maior absorção para as

folhas, sendo assim, o nível deste elemento ficou dentro da faixa nutricionalmente adequada ($3\text{-}20\text{ mg kg}^{-1}$) [9,17]. A toxicidade do Zn(II) em plantas pode reduzir o crescimento da raiz, caule e folhas, provocar também a clorose das folhas jovens [34]. A absorção de Zn(II) foi mais pronunciada ao acrescentar este micronutriente no meio de cultura. A sua concentração nas folhas nos tratamentos Zn(II) e na solução mista atingiu níveis fitotóxicos ($500\text{-}1500\text{ mg kg}^{-1}$).

Tabela 1.4 – Concentrações dos íons metálicos (média±desvio, n=3) usados na contaminação da cultura de girassol presentes no extrato vegetal (massa seca).

	TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO (mg kg^{-1})			
		Cd	Cu	Pb	Zn
FOLHA	Cd(II)	147±2	- ^a	- ^a	58±8
	Cu(II)	- ^a	19±3	- ^a	49±4
	Pb(II)	- ^a	5±1	23±1	49±7
	Zn(II)	- ^a	8±1	- ^a	673±57
	Solução Mista	379±24	- ^a	- ^a	509±46
	Solo	- ^a	24±4	- ^a	81±17
	Solo+Verm.	- ^a	9±3	- ^a	46±8
CAULE	Cd(II)	426±16	25±4	- ^a	43±2
	Cu(II)	- ^a	83±6	- ^a	77±12
	Pb(II)	- ^a	31±1	35±3	73±7
	Zn(II)	- ^a	8±1	- ^a	1365±56
	Solução Mista	1403±313	125±39	58±10	3146±304
	Solo	- ^a	61±10	- ^a	128±9
	Solo+Verm.	- ^a	- ^a	- ^a	74±11
RAIZ	Cd(II)	1344±130	- ^a	- ^a	- ^a
	Cu(II)	- ^a	1030±97	- ^a	- ^a
	Pb(II)	- ^a	- ^a	1339±231	- ^a
	Zn(II)	- ^a	- ^a	- ^a	2692±342
	Solução Mista	3321±419	1257±132	855±93	5034±756
	Solo	- ^a	- ^a	- ^a	26±5
	Solo+Verm.	- ^a	- ^a	- ^a	54±4

^a < LQ conforme Tabela 1.5

Ressalta-se, ainda, que nos extratos vegetais dos girassóis foram encontrados maiores níveis de zinco, seguido do cádmio, cobre e chumbo. Este comportamento está de acordo com a ordem de biodisponibilidade dos íons metálicos. Segundo Pereira e Arruda [22], o vermicomposto usado no cultivo dos girassóis tem maior afinidade em complexar os íons Pb(II) seguido do Cu(II), Cd(II) e Zn(II).

Os íons Co(II), Cr(VI) e Ni(II) também foram determinados por ICP OES nos extratos vegetais, contudo, devido à sensibilidade da técnica, não foi possível detectá-los. Os limites de detecção e quantificação da referida análise estão apresentados na Tabela 1.5.

Tabela 1.5 – Limite de detecção e de quantificação obtidos experimentalmente usando a técnica de ICP OES nas amostras de extratos vegetais.

	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	3	3	8	1	12	7	3
LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	10	10	26	5	39	22	10

5. CONCLUSÕES PARCIAIS

Com as análises realizadas neste capítulo foi possível estabelecer as concentrações de várias espécies químicas presentes nos substratos antes e após o período de cultivo dos girassóis. A adição do vermicomposto proporcionou uma maior concentração de potássio e fósforo. Por outro lado, a introdução de íons metálicos (Cd, Cu, Pb e Zn) no substrato fez com que as concentrações dos mesmos atingissem os níveis fitotóxicos estabelecidos pela CETESB.

Foram ainda avaliados diversos parâmetros referentes ao desenvolvimento e ao crescimento dos girassóis. A presença do vermicomposto, devido ao seu elevado poder nutricional, conduziu ao desenvolvimento de plantas mais saudáveis. Isto refletiu em plantas mais altas e com maior produção de massa. Entretanto, quando este vermicomposto foi associado à contaminação com íons metálicos houve danos significativos. Os girassóis contaminados com solução mista foram os mais afetados, fato este agravado pelo elevado índice de mortalidade observado (50%).

Em relação à capacidade de absorção e translocação dos íons metálicos, foi constatado que a exposição durante 40 dias fez com que as espécies avaliadas se acumulassem de modo distinto e fossem condicionadas a condição empregada. Elementos como Na e Fe se localizaram, preferencialmente, no sistema radicular das plantas. Já os íons de Ca, Mg e P se distribuíram em toda a planta, sendo preferencialmente encontrados nas folhas, seguido do caule e das raízes. Os elementos contaminantes (Cd, Cu, Pb e Zn) ficaram restritos basicamente às raízes dos girassóis, sendo que as maiores concentrações foram, geralmente, observadas ao se empregar a solução mista.

Foi observado que o cádmio e o zinco acrescentados ao meio de cultura translocaram-se até as folhas, fazendo com que os mesmos atingissem níveis fitotóxicos. Este fato, além de provocar uma série de danos fisiológicos enumerados no transcórre deste capítulo, possivelmente induziu a outras alterações que serão investigadas mais aprofundadamente no transcórre desta Tese.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Leite, R. M. V. B. C., Brighenti, A. M. e Castro, C, *Girassol no Brasil*. Embrapa Soja, Londrina, Brasil, 2005.
- [2] Vieira, O. V., *Características da cultura do girassol e sua inserção em sistemas de cultivos no Brasil*. **Plantio Direto**, 88(2005)18.
- [3] Hill, J. A. G., Flemming, J. S., Montanhini Neto, R., Camargo, H. e Flemming, D. F. *Valor nutricional do Girassol (Helianthus annuus L.) como forrageira*. **Archives of Veterinary Science**, 8(2003)41.
- [4] Pilon-Smits, E., *Phytoremediation*. **Annual Review of Plant Biology**, 56(2005)15.
- [5] Madrid, F., Liphadzi, M. S. e Kirkham, M. B., *Heavy metal displacement in chelating-irrigated soil during phytoremediation*. **Journal of Hydrology**, 272(2003)107.
- [6] Lin, J., Jiang, W. e Liu, D., *Accumulation of copper by roots, hypocotyls, cotyledons and leaves of sunflower (Helianthus annuus L.)*. **Bioresource Technology**, 86(2003)151.
- [7] Azevedo, H., Pinto, C. G. G. e Santos, C., *Cadmium effects in sunflower: Nutritional imbalances in plants and calluses*. **Journal of Plant Nutrition**, 28(2005)2221.

- [8] Singh, S. e Sinha, S., *Scanning electron microscopic studies and growth response of the plants of Helianthus annuus L. grown on tannery sludge amended soil*. **Environment International**, 30(2004)389.
- [9] Madejón, P., Murillo, J. M., Marañón, T., Cabrera, F. e Soriano, M. A., *Trace element and nutrient accumulation in sunflower plants two years after the Aznalcóllar mine spill*. **Science Total Environment**, 307(2003)239.
- [10] Gallego, S. M., Benavides, M. P. e Tomaro, M. L., *Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress*. **Plant Science**, 121(1996)151.
- [11] Gallego, S. M., Kogan, M. J., Azpiculicueta, C. E., Peña, C. e Tomaro, M. L., *Glutathione-mediated antioxidative mechanisms in sunflower (*Helianthus annuus L.*) cell in response to cadmium stress*. **Plant Growth Regulation**, 46(2005)267.
- [12] Azevedo, H., Pinto, C. G. G. e Santos, C., *Cadmium effects in sunflower: Membrane permeability and changes in catalase and peroxidase activity in leaves and calluses*. **Journal of Plant Nutrition**, 28(2005)2233.
- [13] Mengel, K. e Kirkby, E. *Principles of plant nutrition*. 5th ed., Kluwer Academic Publishers, London, UK, 2001.
- [14] Hall, J. L. e Willians, L. E., *Transition metal transporters in plants*. **Journal of Experimental Botany**, 54(2003)2601.
- [15] Malavolta, E., *Elementos de Nutrição Mineral de Plantas*. Agronômica Ceres LTDA, Piracicaba, Brasil, 1980.
- [16] Benavides, M. P., Gallego, S. M. e Tomaro, M. L., *Cadmium toxicity in plants*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 17(2005)21.
- [17] Murillo, J. M., Marañón, T., Cabrera, F. e López, R., *Accumulation of heavy metal in sunflower and sorghum plants affected by the Guardiamar spill*. **The Science Total Environment**, 242(1999)281.
- [18] Gratão, P. L., *Análise da resposta antioxidativa de células de Nicotiana tabacum cv BY2 submetidas ao cádmio*. **Dissertação de Mestrado, Esalq/USP, nov. 2003**.
- [19] Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P. J. e Azevedo, R. A., *Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier*. **Functional Plant Biology**, 32(2005)481.
- [20] Arora, A., Sairam, R. K. e Srivastava, G. C., *Oxidative stress and antioxidative system in plant*. **Current Science**, 82(2002)1227.
- [21] Scandalios, J. G. *Oxidative stress: molecular perception and transduction of signal triggering antioxidant gene defenses*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 38(2005)995.

- [22] Pereira, M. G. e Arruda, M. A. Z. *Vermicompost as a natural adsorbent material: characterization and potentialities for cadmium adsorption*. **Journal Brazilian Chemical Society**, 14(2003)39.
- [23] Alves, F. L., Cadore, S., Jardim, W. F. e Arruda, M. A. Z. *River Sediment Analysis by Slurry Sampling FAAS: Determination of Copper, Zinc and Lead*. **Journal Brazilian Chemical Society**, 12(2001)799.
- [24] Matos, G. D. *Utilização do vermicomposto como material adsorvente no tratamento de resíduos de laboratório*. **Dissertação de Mestrado, Unicamp, fev. 2003**.
- [25] Miller, J. C. e Miller, J. N. *Statistics for analytical chemistry*. 3rd ed., Ellis Horwood, London, UK, 1993.
- [26] web site <http://superdownloads.uol.com.br/download/i30236.html>, acessado em agosto de 2004.
- [27] Atiyeh, R. M., Lee, S., Edwards, C. A., Arancon, N. Q. e Metzger, J. D., *The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth*. **Bioresource Technology**, 84(2002)7.
- [28] Madrid, F., Liphadzi, M. S. e Kirkham, M. B., *Heavy metal displacement in chelating-irrigated soil during phytoremediation*. **Journal of Hydrology**, 272(2003)107.
- [29] Relatório de estabelecimento de Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo. CETESB, 2001.
- [30] Alves, M. R., Landgraf, M. D. e Rezende, M. O. O., *Sorption and desorption of the herbicide alachlor on humic acid fractions from two vermicomposts*. **Journal of Environmental Science and Health, Part B – Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes**, 36(2001)797.
- [31] Gupta, U. C. e Gupta, S. C., *Trace element toxicity relationships to crop production and livestock in human health: implications for management*. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, 29(1998)1491.
- [32] Peralta-Videa, J. R., del la Rosa, G., González, J. H. e Gardea-Torresdey, J. L., *Effects of the growth stage on the heavy metal tolerance of alfafa plants*. **Advances in Environmental Research**, 8(2004)679.
- [33] Gallego, S. M., Benavides, M. P. e Tomaro, M. L., *Involvement of an antioxidant defense system in the adaptive response to heavy metal ion excess in Helianthus annuus L. cells*. **Plant Growth Regulation**, 36(2002)267.
- [34] Montilla, I., Parra, M. M. A. e Torrent, J., *Zinc phytotoxicity to oilseed rape grown on zinc-loaded substrates consisting of Fe oxide-coated and calcite sand*. **Plant and Soil**, 257(2003)227.

CAPÍTULO 2

Influência da contaminação por íons metálicos em nível protéico

1. OBJETIVOS

Neste capítulo buscou-se aprofundar os estudos a respeito dos danos causados nos girassóis devido à contaminação por íons metálicos. Desta forma, o objetivo deste capítulo foi averiguar as alterações no proteoma dos girassóis utilizando a eletroforese unidimensional e bidimensional. Além disso, procurou-se comprovar o estresse oxidativo sofrido pelos girassóis.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PROTEÍNAS – ASPECTOS GERAIS

As proteínas são as moléculas orgânicas mais abundantes nas células, correspondendo a aproximadamente 50% da massa seca. São encontradas em toda parte por serem fundamentais para a estrutura e função celular [1]. Estas moléculas possuem estruturas bastante complexas formadas por unidades monoméricas. Estas unidades denominadas aminoácidos (apenas 20 são encontrados em plantas e animais) se agrupam por meio das ligações peptídicas. O agrupamento entre os aminoácidos pode acontecer de inúmeras maneiras, gerando uma extensa variedade de moléculas protéicas [2,3]. Esta grande diversidade é necessária devido às várias funções desempenhadas pelas mesmas nos organismos vivos. As proteínas possuem massa molar (MM) que variam de centenas a milhares de unidades de Dalton ($1 \text{ Da} = 1,661 \times 10^{-24} \text{ g}$).

As moléculas de proteínas consistem de uma “espinha dorsal” da qual projetam-se cadeias laterais constituídas por resíduos de aminoácidos. Estas cadeias laterais conferem propriedades diferentes a cada proteína [4], pois cada aminoácido apresenta duas constantes de ionização (uma do grupo amino e a outra do grupo carboxílico). Assim, a carga líquida de uma molécula da proteína em solução aquosa depende da constante de ionização de seus aminoácidos e do pH da solução. Em menores valores de pH, os grupos amino são protonados e os grupos carboxílicos não são ionizados, resultando, assim, em uma carga líquida positiva. Por outro lado, em maiores valores de pH, os

grupos carboxílicos são ionizados, porém, os grupos aminos não são protonados. Desta forma, a proteína terá carga líquida negativa. Em valores intermediários de pH, alguns grupos laterais livres são protonados, dependendo de seus valores de pKa. Em um pH particular, a proteína terá carga líquida nula (mesmo número de grupos carregados positivamente e negativamente). Este valor de pH é denominado ponto isoelétrico (pI) da proteína [4,5].

Para realizar estudos a respeito das proteínas, primeiro é necessário isolá-las das demais substâncias. Esta separação é feita baseada nas suas características físico-químicas singulares. As principais propriedades usadas são: carga iônica, tamanho, conformação e especificidade de ligação com outras moléculas biológicas. Esta última, útil quando é feita a separação das proteínas utilizando a técnica de cromatografia. Já as outras propriedades citadas podem ser usadas tanto por cromatografia como por eletroforese [1-3].

Podem ser manipuladas também variáveis como pH, temperatura, concentrações de sais dissolvidos e polaridade de solventes para precipitar seletivamente algumas proteínas (mantendo outras em solução). O pH pode ser ainda ajustado até aproximadamente o pI da proteína desejada tornando-a menos solúvel [2]. A seguir, serão mencionadas as principais estratégias adotadas para a aquisição de amostras com características adequadas para realização de estudos proteômicos.

2.2. PREPARO DE AMOSTRAS VISANDO A EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS

A grande complexidade das amostras biológicas faz com que o preparo seja um desafio. Por este motivo, antes de iniciar o preparo é necessário conhecer a amostra biológica em questão, para que seja possível otimizar a metodologia a ser empregada. Desta forma, o analista fica ciente dos possíveis contaminantes que possam interferir na análise. Além disso, deve-se definir o objetivo da análise para que parâmetros como grau de pureza necessário e etapas mais apropriadas sejam estabelecidas [6]. Os objetivos da análise protéica são variados e alguns exemplos são enumerados a seguir:

- 1) determinar a concentração total de proteínas;
- 2) comparar as proteínas presentes em uma mesma amostra provenientes de indivíduos sob condições diferentes (por exemplo indivíduos normais com aqueles que apresentam alguma patologia);
- 3) estabelecer a seqüência de aminoácidos;
- 4) determinar a estrutura tridimensional da proteína;
- 5) conhecer a sua função;
- 6) determinar a atividade catalítica da enzima.

Para cada uma destas finalidades é empregado um conjunto diferente de etapas de preparação da amostra que requer um tempo considerável [7]. Um método eficiente de preparação de amostras protéicas precisa considerar os fatores citados a seguir [1,8]:

- 1) as proteínas devem ser extraídas da amostra biológica;
- 2) as substâncias interferentes devem ser removidas ou reduzidas;
- 3) as proteínas devem ser mantidas em solução até que o processo de separação esteja finalizado;
- 4) deve ser evitada a agregação e modificação química das proteínas.

Sendo assim, para iniciar o preparo da amostra é necessário escolher o método de extração e do rompimento celular a ser utilizado. Esta escolha é dependente do estado físico da amostra. O rompimento das células pode ser feito por processos mecânicos ou por tratamento enzimático. Em amostras sólidas, geralmente emprega-se a maceração manual com emprego de nitrogênio líquido para transformar a amostra em um pó fino. Pode ser usada também a trituração com sonda de aço, capaz de promover a homogeneização do material, além de cortá-lo em pequenos pedaços. Para amostras líquidas, utiliza-se ultra-som para homogeneizar o material e romper as células. Uma vez removida a proteína do seu ambiente natural, ela fica exposta a muitos agentes que podem danificá-la de forma irreversível. Por isso, o rompimento celular deve ser realizado rapidamente e em baixas temperaturas [2].

A presença de substâncias endógenas, na maioria das amostras, interfere na extração das proteínas. Desta maneira, estas substâncias devem ser inativadas,

minimizadas ou removidas durante ou após o rompimento das células. Estes interferentes podem interagir com as proteínas causando problemas na separação eletroforética. Os principais interferentes encontrados são os sais, os ácidos nucleicos, os lipídeos e os polissacarídeos. Em material vegetal, podem ser ainda incluídos as ligninas, os grupos fenólicos, os pigmentos e os alcalóides. Em alguns casos, proteínas em altas concentrações também podem ser consideradas substâncias interferentes por dificultar a detecção de proteínas presentes em menores níveis. Na literatura, encontram-se disponíveis alguns artigos de revisão que descrevem os procedimentos necessários para remover ou inativar as várias substâncias interferentes mencionadas [9-11]. A seguir, são exemplificados os procedimentos adotados para a remoção de interferentes de amostras vegetais.

Wang, *et al.* [12] descreveram um protocolo para remover os interferentes presentes em folhas de oliveira. Tal amostra é extremamente complicada por causa do elevado índice de contaminantes. O procedimento desenvolvido constituiu de três etapas. Primeiramente, o tecido foliar foi macerado obtendo-se um pó fino. Em seguida, o material foi lavado com ácido tricloroacético (TCA) para que, então, as proteínas fossem extraídas com fenol na presença de dodecil sulfato de sódio. Desta forma, os autores obtiveram perfis de géis do tipo SDS-PAGE e 2D-PAGE com um maior número de proteínas.

A combinação de processos químicos e físicos foi usada por Islam, *et al.* [13] para melhorar a extração de proteínas de folhas de arroz. Este material apresentou dificuldades relacionadas ao rompimento da parede celular, além da presença de elevados teores de interferentes. Para alcançar uma melhor extração das proteínas, e conseqüentemente um gel bidimensional apresentando boa resolução, foram associadas à etapa de remoção dos contaminantes por solvente orgânico (acetona e TCA) os processos de sonicação e maceração da amostra.

Em um trabalho mais recente, Carpentier, *et al.* [14] avaliaram vários métodos para a extração de proteínas em folhas de bananeira. O preparo deste tipo de amostra é bastante difícil devido ao elevado índice de interferentes. Os métodos estudados foram: 1) precipitação com TCA/acetona, 2) precipitação usando acetona com fracionamento da amostra em alíquotas, 3) fracionamento da amostra sem precipitação e 4) extração com fenol e precipitação com metanol/acetato de amônio. Somente o primeiro e o último método de extração mostraram ser eficientes para esta amostra, visto que apresentaram

boa reprodutibilidade e pequena perda de proteínas durante o processo. Após a otimização, o mesmo protocolo ainda foi aplicado com bons resultados às amostras de folhas de tomate e de meristema proveniente de macieira.

Em geral, após o rompimento celular e a retirada das substâncias interferentes, as proteínas são reduzidas (as interações intramoleculares e intermoleculares são rompidas), além de serem solubilizadas. Quando permitido, as proteínas são ainda desnaturadas. Neste processo acontece a modificação da estrutura terciária ou a quebra das ligações não covalentes da estrutura quaternária.

Para que ocorra a solubilização das proteínas é adicionada uma solução-tampão contendo uma série de componentes (detergentes, agentes caotrópicos, redutores, bem como inibidores de protease). O Quadro 2.1 apresenta os principais reagentes usados e as funções que eles desempenham nas etapas de preparação de amostras protéicas [11].

Quadro 2.1 – Principais substâncias usadas na solubilização das proteínas.

COMPONENTES DO TAMPÃO	EXEMPLOS	FINALIDADE
Detergentes	Dodecil sulfato de sódio (SDS), Triton X-100 e sulfonato de 3-[(3-cloroamidopropil)dimetilamonio]-1-propano (CHAPS)	Extração integral de proteínas e solubilização de proteínas pouco solúveis
Agentes Redutores	1,4 ditiotreitól (DTT) e β -mercaptoetanol	Manter os resíduos de cisteína reduzidos
Inibidores de Protease	fenimetilsulfonil fluoreto (PMSF), pepstatina e leupeptina	Inibir a protease 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

A solução-tampão mais usada para solubilizar as proteínas foi proposta por O' Farrell [15]. Embora a mesma apresente resultados satisfatórios para uma série de amostras, em alguns casos é necessário fazer modificações para alcançar uma completa

solubilização das proteínas. Alguns exemplos que mostram a influência da composição da solução-tampão são apresentados a seguir.

Os efeitos de algumas variáveis na extração de proteínas de sorgo foram avaliados por Park e Bean [16]. Neste trabalho, foram testados fatores como tipo e concentração de agentes redutores, detergentes e pH, além da razão amostra/solvente. Entre os redutores testados (β -mercaptoetanol, DTT e hidrocloreto de tris(2-carboxietil) fosfina), a solução de β -mercaptoetanol a 2% (v/v) extraiu uma maior quantidade de proteínas. Os autores também avaliaram os detergentes: SDS, brometo de dodecilamônio e *n*-dodecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato. O SDS foi o mais eficiente no processo de extração. Constatou-se também que a solubilização das proteínas foi melhor em pH 10.

Uma alternativa para melhorar a extração de proteínas de folhas e caules da *Arabidopsis thaliana* foi investigada por Giavalisco, *et al.* [17]. O procedimento adotado consistiu em extrair as proteínas em duas frações. Na primeira, o extrato protéico (formado por proteínas citoplasmáticas) foi obtido após a centrifugação do material contendo inibidores de protease. Ao material particulado remanescente, foram adicionados, novamente, os inibidores de protease e também tampão fosfato. Em seguida, foi acrescentada uma solução contendo DTT, uréia e tiouréia. O extrato protéico adquirido nesta fração continha proteínas estruturais. Com esta metodologia os autores conseguiram melhorar a resolução dos géis bidimensionais, além de aumentar em *ca.* de 3 vezes as proteínas detectadas, ao se comparar com os resultados provenientes do método de precipitação com acetona (freqüentemente usado neste tipo de amostra).

2.3. ELETROFORESE

A eletroforese é extremamente usada em estudos proteômicos pelo fato de ser capaz de separar centenas ou milhares de proteínas simultaneamente e por apresentar elevada resolução. Além disso, ela é compatível com várias técnicas de determinação das proteínas capazes de efetuar o seqüenciamento e identificação. Por estas razões, as principais características da eletroforese serão citadas.

2.3.1. ASPECTOS GERAIS

Esta técnica foi introduzida por Tiselius em 1933, tendo como principal interesse a separação de frações protéicas do soro humano em um meio líquido (formado por uma solução-tampão na ausência de sistema estabilizante). Para isso, foi usado um recipiente na forma de U contendo na parte superior de cada um dos compartimentos um eletrodo (anodo e catodo). Neste aparato, as proteínas migravam a partir da parte central de cada um destes compartimentos. O perfil eletroforético ao longo do tubo era determinado pelo gradiente do índice de refração, visto que o mesmo variava de forma diretamente proporcional à concentração das proteínas. Este sistema apresentava falta de resolução e ausência de estabilização das proteínas separadas devido à rápida difusão [5].

A partir do sistema proposto por Tiselius, no final da década de 1940, surgiu a eletroforese em papel e no início de 1950, a eletroforese em gel de amido e de acetato de celulose. Já no começo dos anos 1960 foi criada a eletroforese em gel de poliacrilamida (esta última será enfatizada posteriormente). Os avanços desta técnica continuaram e nos anos 1990 ocorreu a implementação definitiva da eletroforese capilar [4,5].

A eletroforese, independente do tipo, é um método relacionado à migração de partículas carregadas em um meio sob a influência de um campo elétrico contínuo [5]. Do ponto de vista eletroforético, as propriedades mais importantes das proteínas são a massa molar, a carga e a conformação. Estes fatores são os que influenciam diretamente na velocidade de migração (v) e na mobilidade (μ) das mesmas ao longo da corrida eletroforética, podendo ser citados, ainda, o campo elétrico aplicado e a viscosidade do meio [4]. As proteínas que possuem velocidades de migração diferentes são separadas uma das outras. A velocidade de migração é definida de acordo com a equação matemática que se segue:

$$v = \mu \times E, \quad \text{onde } \mu = z e / 6\pi\eta r,$$

sendo E o campo elétrico aplicado, z a carga da molécula, e a carga elementar ($1,602 \times 10^{-19}$ C), η a viscosidade eletroforética do meio e r o raio da molécula [4].

2.3.2. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Estão disponíveis vários suportes pelos quais a eletroforese pode ser realizada, tais como: papel ou acetato de celulose, sílica, alumina ou celulose, além de gel de agarose e poliacrilamida. Dentre eles, destaca-se a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE, do inglês, *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) por ser um material quimicamente inerte, transparente e estável sobre uma ampla faixa de pH, temperatura e força-iônica [4,5]. Este gel é formado pela copolimerização entre acrilamida e N,N'-metilenobisacrilamida, na presença de persulfato de amônio e tetrametiletilenodiamina (TEMED). O tamanho dos poros do gel depende da concentração de bisacrilamida. Quanto maior a proporção de bisacrilamida, menor o tamanho dos poros [4,5,18,19]. A concentração de bisacrilamida no gel é um fator importante para otimizar a separação das proteínas. Géis com poros largos são adequados para a separação de proteínas grandes, porém, são inapropriados para resolver pequenos peptídeos.

As primeiras corridas eletroforéticas conduzidas em géis de poliacrilamida polimerizados em placas usavam o gel denominado fracionador ou de separação. Depois, foi inserido no sistema, o gel denominado concentrador ou empilhador que possuía poro mais largo. Aproveitando estas características, foi introduzido o sistema descontínuo, que varia a porosidade dos géis, bem como a composição química e o pH das soluções-tampão constituintes de cada gel. No sistema descontínuo, os íons tamponantes do gel (Tris-HCl) são diferentes daqueles do reservatório do eletrodo (Tris-Glicina). Dependendo das proteínas, a escolha da solução-tampão e do pH deve ser feita experimentalmente. Esta técnica descontínua possui elevado grau de resolução, apresentando bandas bastante estreitas [18,19]. Estas bandas surgem por causa das diferenças nas velocidades pelas quais as proteínas migram ao longo do gel devido à sua relação carga/massa e sua forma. As bandas são reveladas por meio de processos de coloração específicos. Sabendo-se a distância entre as bandas pode-se estimar as suas massas molares por meio de padrões empregados nas mesmas condições eletroforéticas da amostra em questão.

A eletroforese em gel de poliacrilamida pode ser classificada como sendo em uma (1D) ou em duas (2D) dimensões.

2.3.2.1. ELETROFORESE EM UMA DIMENSÃO (1D-PAGE)

Na eletroforese em gel de poliacrilamida em uma dimensão, pode-se analisar a proteína na forma nativa ou desnaturada, dependendo das condições empregadas durante a extração das proteínas. No primeiro caso, não há alterações na conformação, atividade biológica e entre as subunidades das proteínas. Este sistema é denominado não-dissociante ou nativo e as proteínas são separadas com base na sua carga, usando o método de focalização isoelétrica (IEF, do inglês *Isoelectric Focusing*), ou então, em gel vertical sem SDS. Durante a IEF é formado um gradiente de pH e as espécies carregadas movem-se pelo gel até alcançar um pH específico. Neste pH as proteínas apresentam carga efetiva nula (conhecido como pI da proteína). A IEF apresenta elevada resolução, capaz de separar macromoléculas com diferenças de pI de apenas 0,001 unidade de pH [4-6].

Em sistemas dissociantes ou desnaturantes, as proteínas são solubilizadas em tampão contendo reagente usado para promover a desnaturação das proteínas, sendo geralmente empregado o SDS. Este detergente interage com as proteínas fornecendo-lhes cargas negativas. A magnitude da carga negativa está relacionada com a massa molar da proteína. Para um grande número de proteínas, a quantidade de SDS que interage com as cadeias polipeptídicas é da ordem de 1,4 g de SDS por grama de proteína. Nestas condições, todas as proteínas migram em direção ao eletrodo positivo e são separadas somente pelas diferenças relacionadas à massa molar. Além disso, a adição de reagentes redutores como o β -mercaptoetanol e o DTT rompem as pontes de dissulfeto presentes, facilitando o acesso do SDS às partes mais internas das proteínas [4,5,18]. Este tipo de eletroforese é conhecido como SDS-PAGE devido à combinação entre o tratamento da proteína com SDS e a eletroforese com gel de poliacrilamida. A SDS-PAGE foi originalmente descrita por Laemmli, em 1970. Esta técnica é extensamente empregada para a determinação da massa molar de polipeptídeos presentes em amostras protéicas [20].

2.3.2.2. ELETROFORESE EM DUAS DIMENSÕES (2D-PAGE)

Esta técnica bidimensional foi desenvolvida em 1975 por O'Farrel [15]. Inicialmente, nesta técnica foi utilizado um gel de poliacrilamida produzido em um cilindro vertical para a focalização isoelétrica das proteínas. Tal gel possuía um gradiente de pH gerado pela adição de anfólitos (substâncias que podem se comportar como um ácido ou uma base). Neste gel era aplicada a amostra para que as proteínas fossem separadas de acordo com seus pI, por meio de campo elétrico. Em seguida, o gel cilíndrico era colocado transversalmente sobre um gel vertical, também de poliacrilamida, para a realização da eletroforese dissociante. Este sistema inicialmente proposto apresentava problemas de reprodutibilidade entre as separações. Para solucionar tais problemas nos sistemas bidimensionais atuais, a primeira dimensão é realizada em fitas pré-fabricadas de gel de poliacrilamida onde os anfólitos estão imobilizados, formando, assim, um gradiente de pH. Após a separação das proteínas de acordo com o pI, a fita é incubada com agente redutor e iodoacetamida (evita a reoxidação dos grupos tióis). As proteínas presentes na fita são, então, separadas de acordo com a massa molar, utilizando eletroforese do tipo SDS-PAGE. A associação entre estes dois tipos de eletroforese (IEF e SDS-PAGE) aumenta significativamente o poder de resolução do método. Desta forma, cada ponto resultante (denominado *spot*) observado no gel de 2D-PAGE corresponde a uma espécie protéica presente na amostra [18].

É importante ressaltar que devem ser tomados alguns cuidados adicionais no preparo da amostra ao se tratar da eletroforese 2D-PAGE. Os problemas que podem ocorrer estão relacionados à presença de componentes que afetem a migração das proteínas. Um exemplo é a alta concentração de sais (acima de 100 mM) que podem interferir na IEF. A adição de DTT em quantidade inapropriada na amostra também pode atrapalhar a IEF pelo fato do mesmo também migrar pelo gradiente de pH, provocando a reoxidação dos grupos sulfidrilas e ocasionando a precipitação de algumas proteínas. Já as amostras contendo uréia não devem ser aquecidas acima de 37°C para evitar a formação de isocianato, que induz a carbamilação das proteínas. Na carbamilação, os resíduos de lisina modificam-se induzindo alterações no pI das proteínas [21].

Apesar da eletroforese bidimensional ser amplamente utilizada, ela apresenta algumas limitações para proteínas hidrofóbicas, proteínas básicas e que possuam massas molares muito elevadas ou muito baixas [4].

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

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

- Agitador por efeito vortex, marca Thermolyne, modelo M-37600;
- Balança analítica, marca Mettler, modelo AE200;
- Bio-freezer, marca Forma Scientific; modelo 356070;
- Centrífuga, marca Nova Técnica, modelo NT 811;
- Cubas para eletroforese do tipo SDS-PAGE, marca GE;
- Espectrofotômetro UV/Vis, marca Micronal, modelo B582;
- Fonte de corrente contínua, marca Pharmacia Biotech, modelo EPS1001;
- Mesa agitadora, marca Quimis, modelo Q225M;
- Potenciômetro, marca Digimed, modelo DM20;
- Sistema desionizador Milli-Q, marca Millipore, modelo Quantum™ cartridge;
- Sistema para eletroforese 2D-PAGE, marca GE Healthcare, modelo Ettan™ Daltsix;
- Ultracentrífuga refrigerada, marca BioAgency, modelo Bio-Spin-R;
- Vidrarias apropriadas para laboratório de química analítica.

3.2. REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes usados foram de grau analítico, sendo as soluções preparadas com água desionizada. A seguir, são listados todos os reagentes/soluções empregados nesta parte do trabalho:

- 5,5-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico), DTNB, (Sigma);
- β -mercaptoetanol, HSCH₂CH₂OH, MM = 73,18 g mol⁻¹ (J. T. Baker);
- Acetato de amônio, C₂H₇NO₂, MM = 77,08 g mol⁻¹ (Mallinckrodt);
- Acetona P.A., (CH₃)₂CO, MM = 58,08 g mol⁻¹ (Synth);
- Ácido acético glacial, CH₃COOH, MM = 60,05 g mol⁻¹ (J. T. Baker);
- Ácido clorídrico, HCl, MM = 36,46 g mol⁻¹ (J. T. Baker);
- Ácido etilenodiaminotetracético (sal dissódico), EDTA, C₁₀H₁₄O₈N₂Na₂•2H₂O, MM = 372,24 g mol⁻¹ (Nuclear);
- Ácido fosfórico 85%, H₃PO₄, MM 98,00 g mol⁻¹ (Merck);
- Ácido tricloroacético, C₂HCl₃O₂, MM = 163,39 g mol⁻¹ (Synth);
- Acrilamida, MM = 71,08 g mol⁻¹ (BioAgency);
- Agarose grau biologia molecular, (BioAgency);
- Albumina de soro bovino, (Merck);
- Anfólitos, pH de 3 a 10 (Amersham Biosciences);
- Azul de Coomassie G-250, C₄₇H₅₀N₃NaO₇S₂, MM = 854,03 g mol⁻¹ (J.T. Baker);
- Azul de bromofenol, C₁₉H₉Br₄NaO₅S, MM = 691,94 g mol⁻¹ (BioAgency);
- Cloreto de potássio, KCl, MM = 74,55 g mol⁻¹ (Merck);
- Ditioneitol, DTT, (CHOHCH₂SH)₂, MM = 154,24 g mol⁻¹ (Amersham Biosciences);
- Dodecil sulfato de sódio, SDS, C₁₂H₂₅NaO₄S, MM = 288,28 g mol⁻¹ (Synth);
- Etanol 95%, C₂H₆O, MM = 46,07 g mol⁻¹ (J. T. Baker);
- Fluoreto de fenilmetanosufonila, PMSF, C₇H₇FO₂S, MM = 174,19 g mol⁻¹ (Sigma);
- Glicerol 87%, HOCH₂CH(OH)CH₂OH, MM = 92,09 g mol⁻¹ (Amersham Biosciences);

- Glicina, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, MM = 75,07 g mol⁻¹ (Amersham Biosciences);
- Glutaciona oxidada (Sigma);
- Iodoacetamida, $\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$, MM = 184,96 g mol⁻¹ (Amersham, Biosciences);
- Metanol P.A., CH_3OH , MM = 32,04 g mol⁻¹ (Ecibra);
- *N,N'*-metilenobisacrilamida, $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$, MM = 154,17 g mol⁻¹ (Amersham, Biosciences);
- *N,N',N,N'*-tetrametiletilenodiamina, TEMED, $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$, MM = 116,20 g mol⁻¹ (J. T. Baker);
- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida, NADPH, $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3$, MM = 745,4 g mol⁻¹ (Sigma);
- Nitroazul de tetrazólio, NBT, $\text{C}_{40}\text{H}_{30}\text{N}_{10}\text{O}_6$, MM = 817,6 g mol⁻¹ (Merck);
- Óleo mineral, (Amersham Biosciences);
- Padrão protéico de massa molar, 116,0–14,4 kDa (MBI, Fermentas);
- Padrão protéico de massa molar, 97,0–14,4 kDa (Amersham Biosciences);
- Padrão de superóxido dismutase de fígado bovino (Sigma);
- Polivinilpirrolidona, MM = 25000 - 30000 g mol⁻¹(Merck);
- Riboflavina, $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$, MM = 376,36 g mol⁻¹(Merck);
- Sulfato de amônio, $\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, MM= 132,14 g mol⁻¹, (Vetec);
- Sulfonato de 3-[3-cloroamidopropil-dimetilamonio]-1-propano, CHAPS, $\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$, MM = 614,88 g mol⁻¹ (Amersham Biosciences);
- Tiouréia, H_2NCSNH_2 , MM = 76,12 g mol⁻¹ (Synth);
- Tris-hidroximetil amino metano, $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, MM = 121,14 g mol⁻¹ (Amersham Biosciences);
- Peróxido de hidrogênio, H_2O_2 30% (v/v) (Merck);
- Polioxietileno(10) isoocilfenil éter, Triton X-100, (J. T. Baker);
- Uréia, NH_2CONH_2 , MM = 60,06 g mol⁻¹ (BioAgency).

3.3. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS PARA A SEPARAÇÃO USANDO SDS-PAGE E 2D-PAGE

Parte da massa radicular, caulinar e foliar dos girassóis obtida em cada tratamento, foi usada para efetuar a extração das proteínas. Para isso, os tecidos vegetais foram lavados com água desionizada e secos à temperatura ambiente. Em seguida, os mesmos foram macerados em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido em banho de gelo. Após este procedimento, foi adicionado tampão extrator composto por 125 μL de Tris-HCl a 1 mol L^{-1} (pH=6,8), 200 μL de SDS a 10% (m/v), 100 μL de glicerol (conc.), 50 μL de β -mercaptoetanol (conc.) e 525 μL de água desionizada [5]. As proporções de massa de amostra e de tampão utilizadas foram de 1:3 para folha, 1:2 para caule e 1:1 (m/v) para a raiz. Estas proporções foram obtidas depois de terem sido feitos testes preliminares para adequar o volume de amostra aplicado ao gel e a quantidade de proteína presente nas respectivas partes da planta.

As soluções resultantes foram submetidas à agitação por efeito vortex durante 20 minutos. Posteriormente, foi realizada a centrifugação das mesmas em ultracentrífuga (BioAgency, modelo Bio-Spin-R) a 8500 g por 5 minutos. O material particulado foi descartado, obtendo-se, assim, os extratos protéicos. Estes extratos, quando não usados imediatamente, foram armazenados em fracos de 1,5 mL (tipo *ependorf*) à temperatura de -80°C .

Para a eletroforese bidimensional, as proteínas foram extraídas usando dois procedimentos diferentes. Primeiramente, foi testada, com algumas modificações, a extração das proteínas utilizando o protocolo descrito por Bellato, *et al.* [22]. Neste caso foram usados 100 mg de folha para cada 1 mL de tampão extrator. O tampão extrator, denominado *Tampão 1*, foi formado por 50 mmol L^{-1} de Tris-HCl (pH=8,8), 10 mmol L^{-1} de KCl, 10 mmol L^{-1} de DTT, 10 mmol L^{-1} de PMSF e 0,1% (m/v) de SDS.

Também foi avaliada a extração das proteínas fazendo-se uma pequena alteração na composição do tampão extrator empregado na eletroforese em uma dimensão. Neste caso, a concentração de SDS utilizada foi reduzida à metade, visto que segundo Dunn e Corbett [23], a concentração final de SDS na amostra pode ser, no máximo, igual a 1% para que não haja interferência na separação isoeletrica das proteínas. Desta forma, o

tampão estabelecido, denominado *Tampão 2*, foi de 125 μL de Tris-HCl a 1 mol L^{-1} (pH=6,8), 100 μL de SDS a 10% (m/v), 100 μL de glicerol (conc.), 50 μL de β -mercaptoetanol (conc.) e 625 μL de água desionizada. A proporção entre a massa de amostra e o volume de tampão extrator foi a mesma descrita anteriormente.

Depois de ter sido adicionado o tampão extrator, o processo adotado para a aquisição do extrato protéico foi o mesmo. A solução obtida foi submetida à agitação por efeito vortex durante 20 minutos, sendo, em seguida, centrifugada a 8500 g por 5 minutos, para que fosse possível efetuar a coleta do sobrenadante.

3.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS: MÉTODO DE BRADFORD

A determinação da concentração de proteínas totais presentes nos extratos protéicos (folha, caule e raiz) foi feita utilizando o método de Bradford [24]. Para isso, as amostras foram diluídas a um volume final de 5 mL com tampão Tris-HCl a 1 mol L^{-1} (pH 6,8). O fator de diluição para o extrato protéico proveniente da amostra de folha foi de 50 vezes. Já para as amostras de caule e de raiz o fator de diluição foi de 25 vezes.

A concentração protéica presente nos extratos protéicos foi expressa utilizando a albumina de soro bovino como padrão. Para isso, foi feita a curva analítica de calibração na faixa de concentração entre 5 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com o mesmo tampão usado nas diluições das amostras.

Para as medidas espectrofotométricas, pipetou-se, em cubetas de plástico, 200 μL do extrato protéico diluído apropriadamente. Em seguida, foi adicionado 2,5 mL da solução denominada reagente de Bradford. O reagente de Bradford consiste em uma mistura de azul de Coomassie G-250 a 0,01% (m/v), 4,75% (v/v) de etanol e 8,5% (v/v) de ácido fosfórico. Após 5 minutos de reação, foi determinada a absorbância das amostras em 595 nm, usando espectrofotômetro UV/Vis (Micronal, modelo B582).

3.5. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE)

As proteínas presentes nos diferentes extratos protéicos foram previamente aquecidas em banho-maria a 100°C por 10 minutos para serem separadas usando SDS-PAGE. Para isso, foram utilizados 30 µL de extrato protéico contendo 90 µg de proteína, em gel descontínuo com dimensões de 185 x 135 x 1,5 mm.

O sistema utilizado foi formado por gel concentrador a 3,5% (m/m) de acrilamida e tampão de Tris-HCl a 1 mol L⁻¹ (pH=6,8) e gel separador a 12,5% (m/m) de acrilamida e tampão de Tris-HCl a 1,5 mol L⁻¹ (pH=8,8). As condições eletroforéticas aplicadas como pH, força iônica e tampão foram as mesmas estabelecidas por Laemmli [20]. A solução de tampão de corrida empregada no preenchimento dos reservatórios da cuba foi formada por Tris-Base a 0,06 mol L⁻¹, glicina a 0,5 mol L⁻¹ e SDS a 0,15% (m/v).

Na corrida eletroforética foi fixada a corrente de 30 mA por gel e potência 5 W aplicado no gel concentrador durante 1 hora, e, 30 mA por gel e 6 W usado no gel separador por aproximadamente 7,5 horas. Estes valores foram escolhidos, depois de ter sido feita uma otimização univariada. Os parâmetros elétricos foram fornecidos por uma fonte de alimentação (Pharmacia Biotech, modelo EPS 1001).

A separação eletroforética foi realizada mantendo-se a temperatura entre 10-15°C para evitar distorções das bandas, e, conseqüentemente, problemas de resolução. A fim de comparação, a cada corrida eletroforética foram colocados em uma canaleta do gel, 30 µL do padrão de massa molar (MBI Fermentas, Hanover, EUA), que incluía as proteínas β-galactosidase (116,0 kDa), albumina de soro bovino (66,2 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), lactato desidrogenase (35,0 kDa), endonuclease restrição *Bsp981* (25,0 kDa), β-lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima (14,4 kDa). Anteriormente à aplicação no gel, o padrão protéico também foi aquecido em banho-maria por 5 minutos, conforme a recomendação do fabricante.

Ao término da separação das proteínas (identificado pela linha de azul de bromofenol), o gel foi lavado com água desionizada durante 5 minutos para a remoção do excesso de SDS. Em seguida, o mesmo foi corado durante 2 horas, sob leve agitação, usando solução de azul de Coomassie G-250 a 1% (m/v) preparado com 45% (v/v) de

metanol, 45% (v/v) de água desionizada e 10% (v/v) de ácido acético glacial. O excesso de azul de Comassie G-250 foi removido utilizando solução denominada descolorante, composta por água desionizada, metanol e ácido acético glacial na mesma proporção citada acima. Esta solução foi trocada a cada hora, até que fosse possível visualizar apropriadamente as bandas de proteínas.

Depois das etapas de coloração e descoloração, as imagens dos géis foram capturadas por meio de *scanner*. Em seguida, foi realizada a análise das imagens empregando o programa *Gel-Pro Analyzer* versão 3.1 (Media Cybernetics, Maryland, EUA). Este programa permite obter, de modo mais preciso, as massas molares das bandas de proteínas das amostras. Ele também é capaz de estimar a quantidade de proteína presente. A massa da proteína foi calculada por meio de uma curva de calibração construída a partir do padrão protéico, onde foi possível estabelecer a relação entre o volume (densidade óptica) e a massa de proteína em cada banda.

3.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para a extração das enzimas foi adotado, com algumas modificações, o procedimento descrito por Fornazier, *et al.* [25]. Desta forma, as amostras de folhas provenientes do cultivo com solo e vermicomposto, do tratamento com Zn(II) e, finalmente, do tratamento com a solução mista, foram coletadas e lavadas com água desionizada. Em seguida, foi feita a maceração das mesmas em almofariz usando nitrogênio líquido. O tampão extrator usado para a avaliação da atividade enzimática foi constituído por 100 mmol L⁻¹ de tampão fosfato de potássio (pH=7,5) contendo 1 mmol L⁻¹ de EDTA, 3 mmol L⁻¹ de DTT e 4% (m/v) polivinilpirrolidona. A proporção entre a amostra e o volume de tampão extrator foi de 1:3 (m/v). Todo o procedimento de extração das enzimas foi conduzido a 4°C com auxílio de banho de gelo. O homogeneizado adquirido em cada amostra foi centrifugado a 8500 g por 30 minutos, sendo o sobrenadante separado e estocado em alíquotas a -80°C até a realização das análises.

As atividades das enzimas catalase (CAT) e glutathiona redutase (GR) foram determinadas de acordo com o protocolo descrito por Ferreira, *et al.* [26]. A atividade da CAT foi feita por meio de análise espectrofotométrica. Para isso, foi usado 1 mL de

tampão fosfato de potássio a 100 mmol L^{-1} (pH=7,5) e $2,5 \text{ }\mu\text{L H}_2\text{O}_2$ a 30% (v/v). Este último, adicionado imediatamente antes da análise. A reação foi iniciada pelo acréscimo de $25 \text{ }\mu\text{L}$ de amostra, sendo a atividade determinada pela degradação de H_2O_2 ocorrida em 1 minuto por meio do monitoramento da absorbância a 240 nm . Já a atividade da GR foi realizada espectrofotometricamente a 30°C . Neste caso, foi utilizada a mistura de 1 mL de solução de 100 mmol L^{-1} de tampão fosfato de potássio (pH=7,5), 1 mmol L^{-1} de 5,5-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB), 1 mmol L^{-1} de glutathiona oxidada (GSSG) e $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH). O início da reação foi feito pelo acréscimo de $50 \text{ }\mu\text{L}$ do extrato protéico. A atividade da glutathiona redutase foi estimada pela redução da GSSG monitorada a 412 nm durante 1 minuto.

Especificamente, para avaliar a atividade da superóxido dismutase (SOD) foi empregada a eletroforese em gel de poli(acrilamida em condições não-desnaturantes. Para isso, foram usados $25 \text{ }\mu\text{g}$ de proteína de cada amostra colocados em gel de 8% (m/v) de acrilamida. Na separação eletroforética foi aplicada uma corrente constante de 15 mA por gel. A quantidade de $25 \text{ }\mu\text{g}$ de SOD proveniente de fígado bovino foi submetida às mesmas condições de separação.

A atividade de SOD foi determinada, com algumas modificações, também de acordo com Ferreira, *et al.* [26]. Após a separação eletroforética, o gel foi lavado com água desionizada. Em seguida, o mesmo foi incubado no escuro com uma solução constituída por 100 mmol L^{-1} de tampão fosfato de potássio (pH=7,8), 1 mmol L^{-1} de EDTA, $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de nitroazul de tetrazólio (NBT), 0,3% (v/v) de TEMED e $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ de riboflavina. Depois de 30 minutos, o gel foi lavado 3 vezes com água desionizada, sendo, então, exposto à luz até o surgimento de bandas sob o fundo de coloração escura. A reação fotossensível foi cessada ao ser aplicada a solução de ácido acético a 7% (v/v).

3.7. OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA A SEPARAÇÃO POR 2D-PAGE

Na eletroforese bidimensional usa-se uma série de substâncias e procedimentos para obter uma separação eficiente, que são, normalmente, distintos daqueles

empregados na eletroforese em uma dimensão. Por este motivo, é necessário efetuar uma investigação mais detalhada das condições do preparo da amostra a fim de se alcançar um maior número de proteínas separadas em um único gel. Desta forma, buscou-se alcançar o melhor procedimento para remoção de interferentes presentes nos extratos protéicos das folhas de girassol, obtidos conforme descrito no item 3.3.

No processo de otimização foram usadas as folhas oriundas do plantio em solo e vermicomposto, uma vez que, esta amostra não apresenta a interferência adicional provocada pela presença dos íons metálicos contaminantes.

Inicialmente, foi testado o extrato protéico adquirido de acordo com procedimento proposto por Bellato, *et al.* [22]. Neste caso, o extrato protéico foi submetido ao processo de precipitação com solvente orgânico para eliminar os interferentes presentes na amostra (como sais, grupos fenólicos, pigmentos e surfactantes aniônicos). Para isso, foram usados 1 mL de extrato protéico e 3 mL da mistura de acetona e metanol na proporção de 3:1 (v/v) a 0°C. Para garantir uma precipitação quantitativa, a solução resultante foi deixada em repouso por 24 h a -20°C. Após este período, a amostra foi centrifugada a 1800 g para separação e eliminação do material solúvel.

Para as proteínas extraídas com o outro tampão (*Tampão 2*) foram testados dois processos de precipitação de acordo com Carpentier, *et al.* [14]. A primeira precipitação foi realizada por meio da utilização de solução de acetato de amônio a 0,1 mol L⁻¹ preparado em metanol. Já no segundo caso, foi empregada a solução de 20% (m/v) de ácido tricloacético (TCA) com 0,2% (m/v) de DTT solubilizados em acetona. Estas precipitações foram feitas utilizando-se 1 mL de extrato protéico e 5 mL dos agentes precipitantes, sendo conduzidas a -20°C durante 24 h. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 1800 g e a parte solúvel removida. Os precipitados formados foram lavados três vezes com 3 mL de solução de 0,2% (m/v) de DTT preparada em acetona. Entre as etapas de limpeza, as amostras foram incubadas por 60 minutos a -20°C. As amostras foram centrifugadas após cada limpeza e os sobrenadantes descartados. Na última etapa do preparo da amostra o precipitado foi seco, a temperatura ambiente (ca. 25 °C), para eliminar o solvente orgânico ainda remanescente.

Todos estes ensaios foram conduzidos em triplicata. A concentração de proteína presente após cada precipitação foi determinada utilizando o método de Bradford [24].

Para isso, as amostras foram diluídas a um volume final de 5 mL com tampão Tris-HCl a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH=6,8).

As precipitações foram realizadas novamente e as proteínas resultantes das diferentes precipitações foram ressolubilizadas em 300 μL de tampão composto por 7 mol L^{-1} de uréia, 2 mol L^{-1} de tiouréia, 2% (m/v) de CHAPS, 0,5% (v/v) de anfólitos, 1% (m/v) de DTT e 0,002% (m/v) de azul de bromofenol. Estas ressolubilizações foram conduzidas por 5 minutos à temperatura ambiente. Após este período, realizou-se a centrifugação da solução resultante por 2 minutos a 8000 *g* para retirar qualquer resíduo sólido que ainda permanecesse na amostra. Com este procedimento, as amostras estavam em condições apropriadas para ser realizada a focalização isoeétrica das proteínas.

Desta forma, foi possível comparar a eficiência destes dois tampões na extração das proteínas, visto que eles possuíam componentes ou concentrações diferentes. Além disso, foi investigado o efeito das diferentes precipitações na aquisição de géis bidimensionais com resolução apropriada.

3.7.1. SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA EM DUAS DIMENSÕES (2D-PAGE)

Primeiramente, as proteínas foram separadas pelo ponto isoeétrico em fitas de 13 cm com valores de pH variando entre 3 a 10. Estas fitas continham gel de poliacrilamida, onde o gradiente de pH foi formado pela presença de anfólitos. Para a focalização isoeétrica, foram aplicados 300 μL de amostra em uma canaleta do aparato sobre o qual as fitas foram colocadas. Em seguida, foram adicionados cerca de 2000 μL de óleo mineral sobre cada fita para evitar o ressecamento da mesma. O gel das fitas foram rehidratados a temperatura ambiente por, no mínimo, 12 horas. Após este período, as fitas foram levadas ao sistema focalizador para que o programa formado pelas seguintes etapas fosse aplicado: (1) 500 V até 500 Vh, (2) 1000 V até 800 Vh, (3) 10000 V até 11300 Vh e (4) 10000 V até 3000 Vh. O tempo da última etapa pode ser prolongado, caso, durante a execução do programa inicial, a amostra não tenha atingido o final da fita. Este fato é observado pela linha de azul de bromofenol. Em média, o programa foi executado durante 5,5 h.

Ao término da focalização, as fitas foram equilibradas em duas etapas. Na primeira delas, foram usados 10 mL da solução contendo 6 mol L⁻¹ de uréia, 2% (m/v) de SDS, 30% (v/v) de glicerol, 50 mmol L⁻¹ de Tris-HCl a 1,5 mol L⁻¹ (pH=8,8), 0,002% de azul de bromofenol e 1% (m/v) de DTT para cada fita. Na segunda etapa, foi usado a mesma solução, porém, neste caso, o DTT foi substituído por 2,5% (m/v) de iodoacetamida. Cada etapa de equilíbrio da fita foi executada por 15 minutos, sob leve agitação.

Em seguida, as fitas foram aplicadas em géis de poliacrilamida a 12,5% previamente preparado em placa de 180 x 160 x 1,5 mm. Foi adicionado, sob um pequeno pedaço de papel de filtro, 10 µL de padrão de massa molar (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) contendo as proteínas β-fosforilase (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa). Após ser acomodada apropriadamente cada fita e o padrão sob o gel de poliacrilamida, foi adicionada uma solução aquecida (ca. 40°C) de agarose a 0,5% (m/v). Desta forma, a agarose, ao ser polimerizada, proporcionava um contato efetivo entre a fita e o gel, evitando, assim, o aparecimento de bolhas de ar.

A separação das proteínas, de acordo com a MM, foi realizada aplicando-se 25 mA por gel e 100 W durante aproximadamente 5,5 h. Depois deste período, o gel foi lavado com água desionizada. Em seguida, as proteínas foram fixadas utilizando uma solução contendo ácido acético a 10% (v/v) e etanol a 40% (v/v) durante 1 h. A solução fixadora foi removida e o gel lavado novamente com água desionizada durante 10 minutos, sob agitação, por 3 vezes. As proteínas presentes no gel foram reveladas utilizando azul de Coomassie G-250 coloidal [27]. Este corante consistiu de uma solução de sulfato de amônio a 8% (m/v), ácido fosfórico a 1% (v/v), azul de Coomassie G-250 a 0,08% (m/v) e metanol a 20% (v/v) (adicionado por último). A solução corante ficou em contato com o gel durante 48 horas, e depois foi removida por sucessivas lavagens feitas com água desionizada até que fosse possível obter um bom contraste entre as bandas e a parte do gel sem proteínas.

O gel foi, por fim, escaneado por meio do equipamento *Image Scanner* (Amershan Bioscience). A imagem adquirida foi analisada pelo programa de tratamento de imagens *ImageMaster 2D Platinum* (Genebio, Genebra, Suíça) versão 6.0, que permite adquirir uma estimativa do pI e MM das proteínas, bem como calcular o número de *spots* obtidos no gel, além de apresentar as imagens tridimensionais dos *spots*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Depois de terem sido realizados os estudos referentes ao desenvolvimento do girassol, foi investigada a interferência das diferentes condições de cultivo na expressão das proteínas. Para isso, foi determinada a concentração de proteínas totais presentes em cada parte da planta utilizando o método de Bradford [24]. Este método é baseado na interação entre as moléculas de azul de Coomassie G-250 e os grupos ácidos e básicos das proteínas. Este reagente liga-se, preferencialmente, aos resíduos de aminoácidos básicos e aromáticos (especialmente a arginina). As moléculas de azul de Coomassie G-250 também apresentam interações mais fracas com os resíduos de histidina, lisina, tirosina, triptofano e fenilalanina. Entretanto, o método de Bradford não determina eficientemente proteínas com massas molares menores que 5 kDa. Desta forma, esta análise não tem sensibilidade para detectar pequenos peptídeos [28,29].

Os resultados das concentrações de proteínas totais nas amostras de girassóis estão organizados na Tabela 2.1. De modo geral, nota-se que as proteínas estão localizadas em maior quantidade nas folhas e que as raízes possuem a menor quantidade.

Tabela 2.1 – Concentrações de proteínas totais (média±desvio padrão, n=3) em cada parte do girassol (massa úmida) determinadas pelo método de Bradford.

TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO (mg g ⁻¹)		
	Folha	Caule	Raiz
Cd(II)	7,7±0,2 cd*	2,6±0,1 b	0,86±0,03 e
Cu(II)	7,7±0,3 d	2,91±0,05 b	1,37±0,01 c
Pb(II)	7,9±0,6 bcd	2,53±0,02 b	0,94±0,04 e
Zn(II)	8,9±0,5 abcd	3,8±0,2 a	1,17±0,02 d
Solução Mista	9,0±0,4 ab	2,1±0,2 c	1,69±0,06 b
Solo	7,9±0,3 bcd	2,70±0,06 b	2,14±0,03 a
Solo+Verm.	9,7±0,6 a	1,0±0,1 d	0,91±0,01 e

* Valores das médias de uma mesma parte do girassol seguida por letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

Em relação às proteínas das folhas, o método de Bradford não permitiu verificar variação significativa entre os tratamentos aplicados no cultivo de girassóis, de acordo com a avaliação estatística realizada por meio do teste Tukey. No caule, foi observada uma maior concentração de proteínas no tratamento com Zn(II). Já na raiz, uma maior quantidade de proteínas foi detectada ao ser usado somente solo como substrato, seguida das raízes das plantas cultivadas sob contaminação com a solução mista e com Cu(II). Estes dados são concordantes com as informações apresentadas na Tabela 1.1, onde, nestes casos, houve uma maior absorção de fósforo realizada pelas plantas sob as condições mencionadas.

A concentração de proteínas encontradas nas folhas (7,7 a 9,7 mg g⁻¹) foi similar ao valor reportado por Sairan, *et al.* [30]. No trabalho citado, foi observada uma concentração entre 5,0 a 9,0 mg g⁻¹ nas diferentes folhas presentes em uma mesma planta. Neste caso, foram avaliadas do primeiro ao décimo pares de folhas de girassol. Já Singh, *et al.* [31], mencionam que as folhas de girassol apresentaram *ca.* de 22,0 mg g⁻¹ de proteína, entretanto, as plantas foram cultivadas usando 10 kg de substrato por pote. Desta forma, a maior quantidade de proteína nas folhas, provavelmente, é por causa da maior disponibilidade de nutrientes nesta situação.

Os níveis de proteínas encontrados no sistema caulinar e radicular não foram comparados com os dados da literatura devido à ausência de informações em condições de cultivo semelhantes a adotadas neste trabalho. Geralmente, os estudos descritos na literatura são realizados em meio hidropônico.

4.2. SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DO TIPO SDS-PAGE

Um volume de 30 µL dos extratos protéicos, contendo *ca.* de 90 µg de proteína, foram submetidos, juntamente com o padrão de MM, à corrida eletroforética nas condições descritas no item 3.5. O perfil de massa molar das proteínas das folhas de girassol está disposto na Figura 2.1.

Com a separação eletroforética foi possível observar que a composição protéica das folhas provenientes de diferentes condições de plantio apresentou resultados distintos. Nas folhas dos girassóis cultivados somente em solo (Figura 2.1(f)), verificou-se

que as bandas protéicas não ficaram bem definidas e se apresentaram em menor número. Já no tratamento com solo e vermicomposto (Figura 2.1(g)), as folhas apresentaram uma composição protéica maior, visto que houve o acréscimo das bandas números 1, 9 e 10. Isto é um indicativo que a adição de nutrientes procedentes do vermicomposto proporcionou uma maior síntese de proteínas. Além disso, geralmente, nesta condição, as intensidades das bandas de proteínas foram maiores que naquelas cultivadas em outros tratamentos.

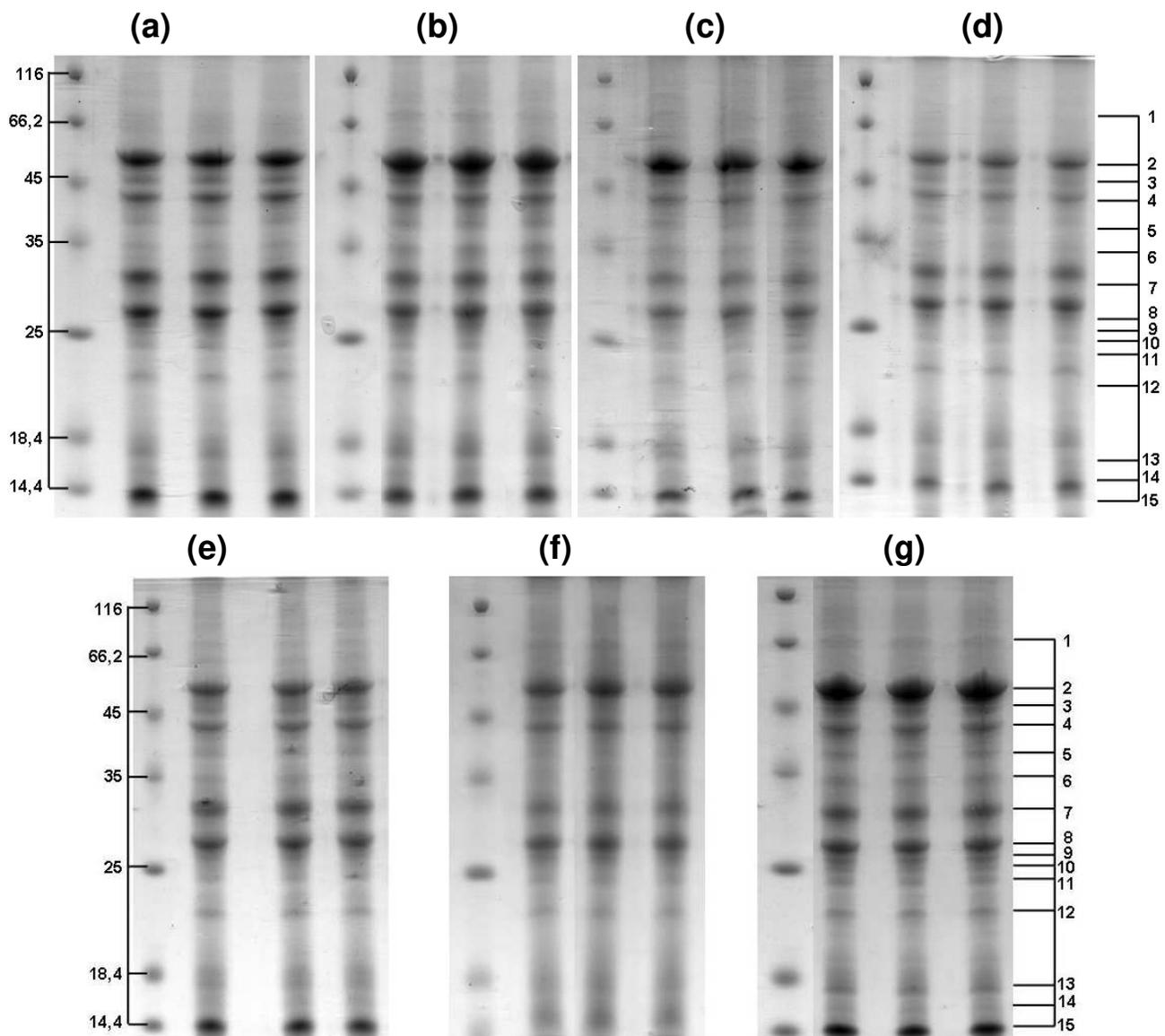


Figura 2.1 – Géis dos extratos protéicos das folhas: (a) tratamento com Cd(II), (b) Cu(II), (c) Pb(II), (d) Zn(II), (e) Solução Mista, (f) Solo e (g) Solo+Verm. A primeira coluna de cada gel apresenta os padrões de massas molares (116,0-14,4 kDa). Os números de 1 a 15 (lado direito da Figura) identificam as bandas formadas em cada condição de cultivo.

Ao serem adicionados os íons metálicos aos substratos foi notado que, de modo geral, este procedimento provocou alterações na composição das proteínas, comprovado pelo desaparecimento de algumas bandas ou pela menor intensidade das mesmas. A menor intensidade prediz que proteínas de MM semelhantes deixaram de ser sintetizadas, ou, então, foram degradadas durante o ciclo de vida do girassol. Esta tendência é mais evidente nas amostras de folhas do tratamento com Zn(II) (Figura 2.1(d)) e com a solução mista (Figura 2.1(e)). Já as amostras de folhas do tratamento com Cu(II) (Figura 2.1(b)) foi a menos afetada em termos de nível protéico. Este comportamento é justificado pelo fato do mesmo ser um micronutriente importante e estar presente em níveis apropriados nas folhas como constatado na Tabela 1.4.

Os dados quantitativos referentes à interferência dos íons metálicos na composição das proteínas que corroboram com as afirmações feitas estão demonstrados na Tabela 2.2. A quantidade de proteína presente em cada banda foi calculada de acordo com o procedimento descrito no item 3.5. A amostra de folhas do tratamento solo e vermicomposto apresentou o maior teor protéico (ca. 97 ± 4 μg). Os teores de proteínas nas folhas contaminadas apresentaram um decréscimo de até 63%. As bandas número 2 e 15 dos tratamentos com Zn(II) e com a solução mista exemplificam esta tendência. O teor protéico nestas bandas foi reduzido em ca. 70 e 60%, respectivamente, ao ser comparado com as mesmas bandas provenientes do cultivo em solo e vermicomposto sem contaminação. Nas folhas procedentes do tratamento com Zn(II) foi verificado, ainda, a supressão da banda número 6 (MM entre 34 a 35 kDa). Ressalta-se que em ambos os casos (contaminação com Zn(II) e com a solução mista), os níveis de Zn(II) atingiram concentrações fitotóxicas como constatado no Capítulo 1.

Sugere-se que o zinco tenha sido o principal elemento responsável pela alteração na composição protéica. Apesar da concentração de Cd(II) também ter atingido níveis fitotóxicos nas folhas do tratamento com solução mista, foram detectadas modificações em menor escala quando este íon foi adicionado individualmente. Por sua vez, o zinco é facilmente assimilado pelas plantas. Além disso, o mesmo pode substituir elementos essenciais presentes em sítios funcionais, inativando as enzimas. Por exemplo, o Zn(II), por possuir raio atômico semelhante ao Fe(II), pode interferir na utilização do ferro na síntese de clorofila realizada pelas folhas [32].

A presença em excesso dos íons metálicos nos girassóis pode conduzir direta ou indiretamente a uma série de eventos que afetam profundamente o metabolismo de organismos vivos. Especificamente nas proteínas, os íons metálicos, por meio da formação de espécies de oxigênio reativas, induzem a proteólise, ocasionando, assim, uma redução no nível de proteínas. As proteínas podem ser também modificadas devido à oxidação das cadeias laterais dos aminoácidos (por exemplo a tripsina) com a introdução de grupos carbonilas. Desta maneira, a funcionalidade da proteína é comprometida [33]. As espécies de oxigênio reativas provocam, ainda, a fragmentação das cadeias de peptídeos, a agregação de produtos de reação de ligação cruzada e a oxidação dos centros Fe-S destruindo, assim, a função enzimática [34].

Ressalta-se que somente ao ser feita a separação eletroforética das amostras foi possível perceber modificações no proteoma do girassol, visto que, de acordo com Tabela 2.1 as concentrações de proteínas nas folhas não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. Isto pode ser explicado pelo fato de que no caso da determinação da concentração de proteínas totais realizadas pelo método de Bradford, como mencionado, são determinados os polipeptídeos com massa molar acima de 5 kDa, inclusive possíveis fragmentos de proteínas provenientes da degradação devido a presença das espécies de oxigênio reativas. Já ao ser feita a separação das proteínas por eletroforese, obteve-se um detalhamento específico das bandas de proteínas formadas dentro da faixa avaliada (14,5 a 116 kDa).

Tabela 2.2 – Quantidade de proteína (média±desvio padrão, n=3) presente em cada banda. Estimativa realizada por meio do programa *Gel-Pro Analyzer*, versão 3.1.

BANDA		QUANTIDADE (µg)						
Identificação	MM (kDa)	TRATAMENTO						
		Cd(II)	Cu(II)	Pb(II)	Zn(II)	Solução Mista	Solo	Solo+Verm.
1	78	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	2,1±0,3
2	52-54	11,3±0,5	16±1	13,2±0,9	5,7±0,3	6,1±0,1	11±1	20±3
3	46-48	2,0±0,2	1,8±0,1	2,0±0,3	1,8±0,2	1,0±0,1	1,9±0,3	2,4±0,2
4	42-43	5,1±0,1	5,1±0,1	4,7±0,4	3,4±0,3	4,4±0,6	4,9±0,4	7,2±0,3
5	38-39	1,6±0,1	3,1±0,4	1,9±0,2	1,7±0,3	2,2±0,1	0,7±0,1	4,6±0,1
6	34-35	1,8±0,1	5,8±0,4	3,9±0,2	- ^a	2,8±0,6	- ^a	6,7±0,2
7	31-32	7,6±0,2	6,6±0,3	5,1±0,3	5,2±0,1	6,8±0,3	7,1±0,8	9±1
8	27-28	9,6±0,4	9,9±0,2	5,0±0,2	6,0±0,8	8,4±0,4	9,5±0,3	10,0±0,8
9	26	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	4,8±0,4
10	25	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	1,6±0,2
11	24,5	0,8±0,1	2,1±0,1	2,0±0,2	0,7±0,1	0,4±0,1	0,9±0,1	3,2±0,2
12	22-22,5	1,8±0,1	5,7±0,6	5,6±0,3	3,5±0,4	1,8±0,1	3,6±0,3	6,8±0,7
13	17,5-18	2,9±0,3	6,1±0,2	5,8±0,4	3,7±0,5	4,0±0,2	5,7±0,4	7,5±0,7
14	15,5	1,1±0,1	1,2±0,2	0,9±0,1	0,7±0,1	- ^a	- ^a	- ^a
15	14-14,5	6,9±0,3	6,7±0,4	4,3±0,1	3,9±0,3	5,6±0,6	3,0±0,2	11±2
Total* (µg)		52±1	70±1	54±1	36±1	45±1	48±2	97±4

-^a proteínas não detectadas pelo sistema de coloração com azul de Coomassie G-250.

* $S = \sum_{i=1}^n M_i$ e $I_S^2 = \sum_{i=1}^n I_i^2$, onde S é o somatório das massas, M é a massa de proteína em cada banda e I a incerteza em cada medida.

A princípio, havia sido proposto que as proteínas presentes no caule e na raiz também deveriam ser separadas por eletroforese. Segundo a literatura, a maioria dos íons metálicos presentes no substrato ficam acumulados no sistema radicular e conseqüentemente poderiam influenciar mais intensamente na composição protéica desta parte específica da planta [26,35]. No entanto, quando foi efetuada a corrida eletroforética nestas amostras não foram adquiridas bandas definidas. Nas amostras de caule, as proteínas presentes não estavam em concentrações apropriadas para serem detectadas.

Além disso, as proteínas da raiz presentes apresentavam pequena massa molar (<14,4 kDa), não estando, assim, dentro da faixa avaliada. Para adequar esta última amostra seria preciso aumentar a concentração de acrilamida no gel e adotar um outro padrão de massa molar. Uma outra alternativa para contornar os problemas encontrados nestas amostras seria empregar o sistema de coloração das proteínas com prata. Este sistema de detecção apresenta melhor sensibilidade (entre 20 a 200 vezes mais sensível que procedimentos baseados no uso do azul de Coomassie G-250) com capacidade de detectar proteínas acima de 0,1 ng [4,9,23]. Ele não foi adotado porque a prata poderia interferir na quantificação dos íons metálicos (a ser discutida no Capítulo 3). A Figura 2.2 mostra o perfil dos géis obtidos nestas amostras.

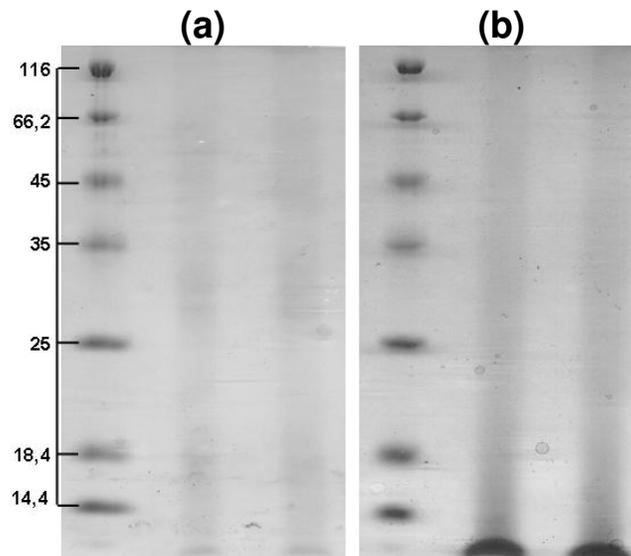


Figura 2.2 – Géis representativos das amostras de extrato protéico do caule e da raiz do girassol: (a) caule do tratamento com Zn (II) e (b) raiz do tratamento com solo. Em ambos os casos, estas amostras foram as que apresentaram maior concentração de proteínas de acordo com os dados dispostos na Tabela 2.1.

Algumas das proteínas presentes nas folhas podem ser associadas com informações a respeito das estruturas primárias e terciárias de proteínas do girassol (*Helianthus annuus* L.), disponíveis em bancos de dados especializados [36]. Neste caso, a comparação foi feita baseada apenas na informação referente à massa molar da banda de proteína estimada pelo programa *Gel-Pro Analyzer*, versão 3.1. Observa-se que este programa fornece dados com um desvio padrão de 3% para tal parâmetro.

A banda mais proeminente (banda número 2, com MM entre 52 a 54 kDa) pode ser correlacionada com a ribulose bifosfato carboxilase (54,07 kDa). Esta proteína, conhecida

como rubisco, encontra-se presente nas folhas de muitas plantas. Nos cloroplastos, ela participa do ciclo de Calvin, o qual é responsável pela fixação de CO₂ durante o processo de fotossíntese. A razão da carboxilação depende da quantidade desta proteína [37]. Nos girassóis contaminados houve um decréscimo acentuado da produção do rubisco, principalmente quando foi usada a solução de Zn(II). Esta banda pode conter, ainda, a catalase (56,75 kDa). Em girassóis, são identificadas 8 isoformas da catalase que contribuem para diversos processos fisiológicos [38].

As proteínas com MM de 34,5 kDa encontradas nas folhas podem ser atribuídas à presença de 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico oxidase (34,89 kDa). Esta proteína participa da síntese do etileno. Tal substância é um hormônio atuante na germinação, crescimento, desenvolvimento e senescência das plantas. A produção do etileno é um importante parâmetro usado como indicador de estresse oxidativo, já que há formação de radicais peróxidos na conversão de 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico oxidase em etileno. De acordo com Hagemeyer e Breckle [39], a biossíntese do etileno depende da concentração de íons metálicos e da interação entre os mesmos. Desta forma, a redução da quantidade de 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico oxidase sugere que houve um decréscimo na produção de etileno nos girassóis, principalmente no tratamento com Zn(II).

Na literatura, está disponível o fragmento da proteína desidrina (26,5 kDa) que tem a função de proteger as plantas contra a falta de água e das baixas temperaturas, além de evitar que as membranas e macromoléculas sejam desnaturadas [40]. Somente foram detectadas proteínas com MM semelhante nas folhas das plantas cultivadas em solo e vermicomposto (bandas número 9 e 10 da Figura 2.1(g)).

4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para verificar se as plantas submetidas à contaminação com íons metálicos apresentaram estresse oxidativo, e conseqüentemente a série de danos observados no Capítulo 1, foi estudada a atividade de algumas enzimas. Desta forma, os resultados obtidos nesta análise poderiam corroborar com todas as modificações verificadas na composição protéica das folhas. A escolha das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione redutase (GR) foi feita baseada no fato das mesmas serem

espécies importantes no processo de dismutação de ROS produzidas em resposta a uma série de estresse abiótico e biótico, incluindo o estresse oxidativo induzido por íons metálicos [35]. Outras análises que avaliassem parâmetros tais como o nível de peroxidação lipídica, atividade da ascorbato peroxidase, teor de fitoquelatinas, peróxido de hidrogênio e ascorbato também poderiam fornecer informações sobre possível estresse oxidativo apresentado pela planta [34,35].

A SOD é a primeira enzima de defesa contra os danos provocados pelas ROS, sendo considerada o mecanismo central. Esta enzima catalisa a formação do peróxido de hidrogênio a partir de radicais superóxidos. Sendo assim, plantas com elevadas atividades de SOD aumentam a tolerância ao estresse oxidativo [35]. A atividade da SOD foi avaliada por meio de separação em gel nativo de poliacrilamida apresentado na Figura 2.3. Na contaminação com Zn(II) (Figura 2.3(c)) foi observada uma maior atividade desta enzima comparando-a com o tratamento com solo e vermicomposto (Figura 2.3(b)), principalmente ao ser considerada a isoenzima mais eletronegativa. Entretanto, no tratamento com a solução mista (Figura 2.3(d)) foi constatado um comportamento oposto, ou seja, houve uma diminuição da atividade desta enzima. Apesar destes resultados, em ambas as situações, a presença dos contaminantes provocaram estresse oxidativo na planta [31] visto que, os níveis da atividade da enzima foram alterados em comparação com o controle. No entanto, as folhas das plantas contaminadas com a solução mista estavam mais susceptíveis aos efeitos provocados pelo aumento dos níveis de ROS.

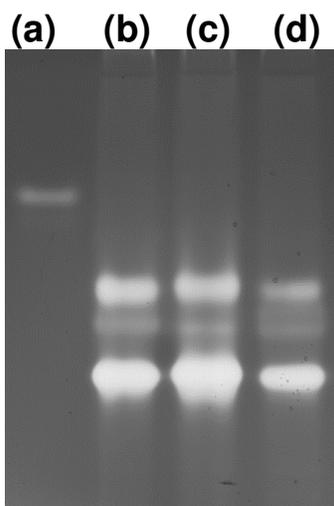


Figura 2.3 – Atividade da superóxido dismutase (SOD) em gel nativo: (a) padrão de SOD de fígado bovino, (b) amostra de folhas do plantio em solo e vermicomposto, (c) tratamento com Zn(II) e (d) com a solução mista.

Por sua vez, a catalase está diretamente envolvida na dismutação de peróxido de hidrogênio formado particularmente no peroxissoma. A atividade da CAT nas folhas de girassol mostrada na Figura 2.4(a) apresentou níveis semelhantes entre os tratamentos avaliados. Isso indica que a atividade desta enzima antioxidante não foi estimulada e nem suprimida devido à presença dos íons contaminantes no meio de cultura. Desta forma, as moléculas de H_2O_2 produzidas pela presença da maior quantidade de SOD não foram degradadas eficientemente pela CAT. Ressalta-se ainda que, o nível da atividade de CAT encontrada nas folhas de girassol neste trabalho foi o mesmo reportado por Rios-Gonzalez, *et al.* [41].

Por outro lado, como pode ser visto na Figura 2.4(b) a atividade da glutatona redutase (GR) apresentou variação significativa entre as amostras. Neste caso, foi observado um aumento de até 135% na resposta desta enzima pelo fato das plantas terem sido expostas à contaminação por íons metálicos. Este acréscimo foi mais evidente ao ser aplicado o tratamento com Zn(II) durante o cultivo dos girassóis. O nível da GR encontrado nas folhas provenientes do tratamento solo e vermicomposto foi similar ao reportado por Gallego, *et al.* [42]. Embora a atividade da GR tenha aumentado, não é possível estabelecer se tal aumento foi ocasionado por alguma isoenzima de GR específica. Esta maior atividade da GR promove a desintoxicação nos organismos por proteger os grupos tióis das enzimas, regenerar o ascorbato e reagir quimicamente com oxigênio singlete e radicais hidroxilas [25,43]. Além disso, esta proteína mantém a glutatona na sua forma reduzida para que as fitoquelatinas sejam sintetizadas [26].

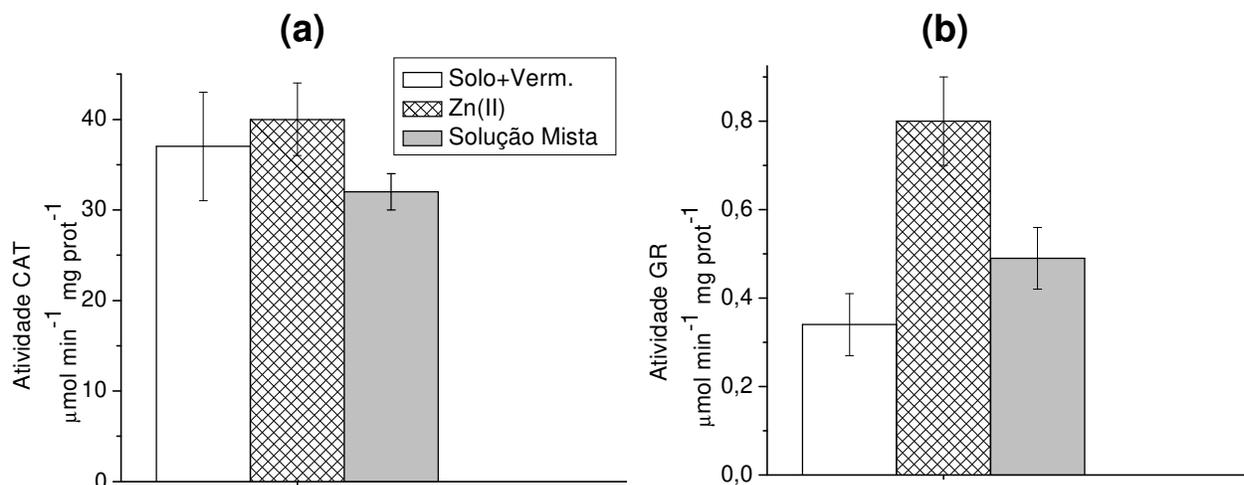


Figura 2.4 – Atividade enzimática presente nos extratos protéicos das folhas determinada espectrofotometricamente: (a) catalase (CAT) e (b) glutatona redutase (GR).

É importante mencionar que as plantas utilizam-se de vários outros mecanismos para evitar ou minimizar os prejuízos provocados pela presença de espécies de oxigênio reativas. Sendo assim, é necessário avaliar se a exposição de plantas aos íons metálicos causa um efeito nocivo ou estimulante às enzimas no processo de desintoxicação [25,26,35].

De modo geral, com os ensaios realizados, foi possível constatar que as folhas das plantas contaminadas simultaneamente com os quatro íons metálicos apresentaram menores atividades para as enzimas antioxidantes SOD e GR ao serem comparadas com o tratamento com Zn(II), o que demonstra o quadro de exaustão da planta frente à dose excessiva de contaminantes. Assim, as respostas fisiológicas e bioquímicas observadas como menor crescimento, diminuição na massa vegetal produzida, degradação das proteínas e até mesmo a morte das plantas se justificam. Já os girassóis contaminados com o Zn(II) apresentaram um melhor mecanismo de defesa, visto que os danos sofridos pelos mesmos foram abrandados.

4.4. OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA 2D-PAGE

Na primeira tentativa de separar as proteínas das folhas dos girassóis cultivados no tratamento solo e vermicomposto usando eletroforese bidimensional, foi testado com algumas modificações, o procedimento descrito por Bellato, *et al.* [22]. Neste caso, aproximadamente 900 µg de proteínas foram aplicadas em uma fita de 13 cm com pH linear variando de 3 a 10. A focalização isoeétrica foi conduzida até atingir a voltagem acumulada de 18 kV h, sendo para isso necessárias 5 horas. O perfil eletroforético adquirido está apresentado na Figura 2.5. Segundo o programa *ImageMaster 2D Platinum*, versão 6.0 (GE Healthcare) foi possível detectar apenas 39 proteínas (*spots*). As proteínas possuíam massa molar entre 81,4 a 16,0 kDa com pI de 3,5 a 9,4. Dentre as proteínas separadas, observou-se que a maioria possuía caráter ácido. Ressalta-se que nesta amostra existem várias proteínas que são isoformas. Estas proteínas possuem massas molares similares e pI distintos devido a pequenas diferenças na cadeia de polipeptídeos, porém desempenham a mesma função. O primeiro conjunto de isoformas (número 1, vide Figura 2.5) contem proteínas de MM de 52,7 kDa. Estas isoformas correspondem a

segunda banda detectada no gel SDS-PAGE (vide Figura 2.1). O outro conjunto de isorformas tem MM de 27,5 kDa, também presente no gel da Figura 2.1.

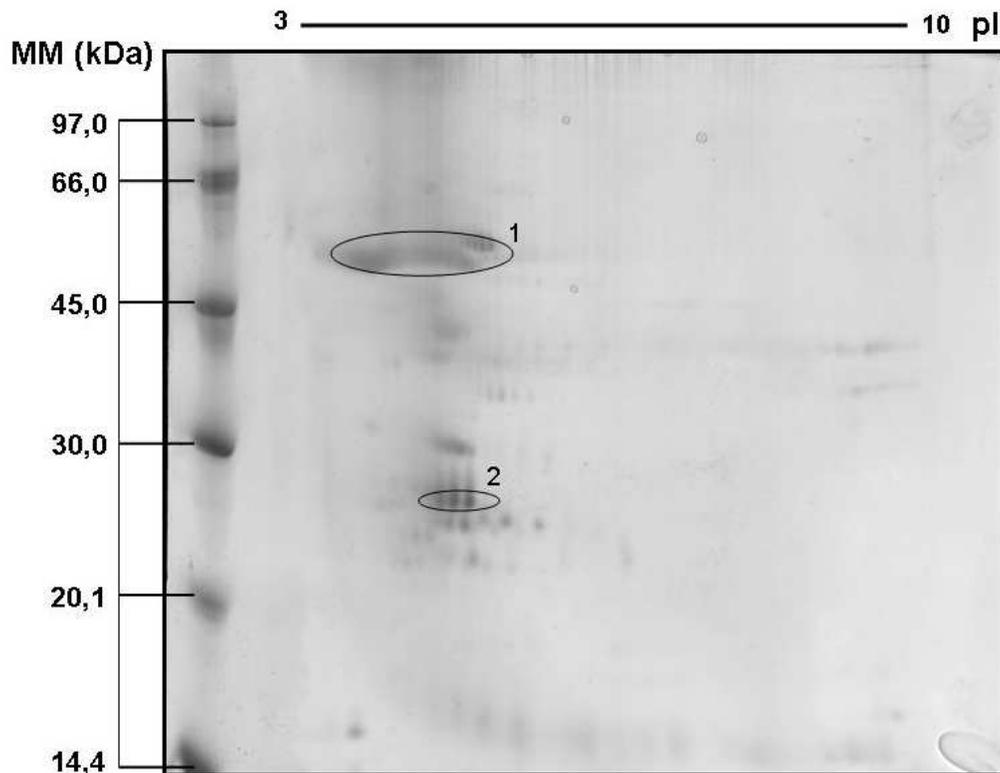


Figura 2.5 – 2D-PAGE das proteínas de folhas de girassol do cultivo em solo e vermicomposto extraídas com o *Tampão 1*. Fita de 13 cm, pH de 3 a 10. Padrão de massa molar de 97,7 a 14,4 kDa. Gel com dimensões de 130 x 130 x 1,5 mm.

De acordo com o perfil eletroforético obtido na separação por SDS-PAGE da mesma amostra, existem outras proteínas que ainda não foram observadas. Por este motivo, foi necessário avaliar outros parâmetros, tanto de extração quanto de precipitação das proteínas, a fim de alcançar uma separação bidimensional mais apropriada.

Optou-se por utilizar um tampão de extração similar àquele aplicado para a separação por SDS-PAGE, apesar do mesmo possuir componentes que apresentam alguns inconvenientes para a separação 2D-PAGE. Sendo assim, foi adotado um preparo da amostra mais meticuloso para minimizar, ou mesmo, eliminar os interferentes presentes. Para isso, foram aplicados dois métodos de precipitação seguida de sucessivas etapas de limpeza do precipitado formado. A Figura 2.6 apresenta o comportamento da amostra submetida ao procedimento descrito.

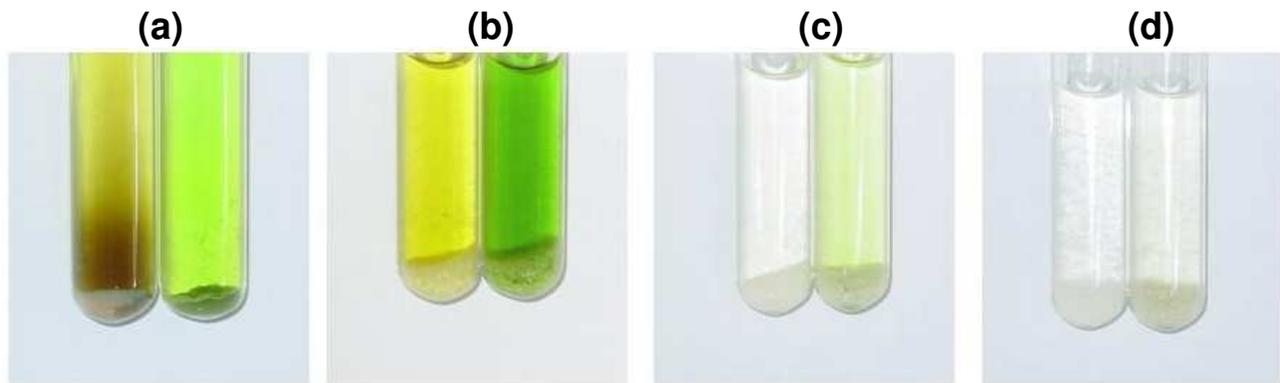


Figura 2.6 – Etapas do preparo da amostra protéica utilizando precipitação com acetato de amônio em metanol (tubo de ensaio à esquerda) e com TCA e DTT em acetona (tubo de ensaio a direita): (a) amostra precipitada depois de 24h, (b) primeira etapa de limpeza do precipitado com DTT em acetona, (c) segunda limpeza com a mesma solução e (d) terceira etapa de limpeza.

Aparentemente, o agente precipitante acetato de amônio foi o mais eficiente na remoção dos interferentes, principalmente no que se refere à clorofila. Entretanto, quando foi realizada a separação 2D-PAGE, este fato não foi confirmado como demonstrado na Figura 2.7(a). Na amostra precipitada com acetato de amônio em metanol (Figura 2.7(a)) foi detectada uma menor quantidade de proteínas (apenas 58 *spots*). Isto pode ser explicado por problemas de solubilização do precipitado. Ao ser adicionada a solução de ressolubilização percebeu-se ainda a presença de material particulado. Desta forma, a transferência das proteínas para a fita não foi quantitativa. Por outro lado, a amostra precipitada com TCA e DTT em metanol apresentou um gel com 73 *spots* (Figura 2.7(b)). O número de proteínas separadas somente não foi maior devido a problemas de resolução. A quantidade de proteína aplicada (ca. 3 mg) foi excessiva, merecendo ser melhor avaliada.

Todavia, destaca-se que o procedimento aplicado exibiu resultados satisfatórios, demonstrando a importância de ser realizado um preparo de amostra apropriado.

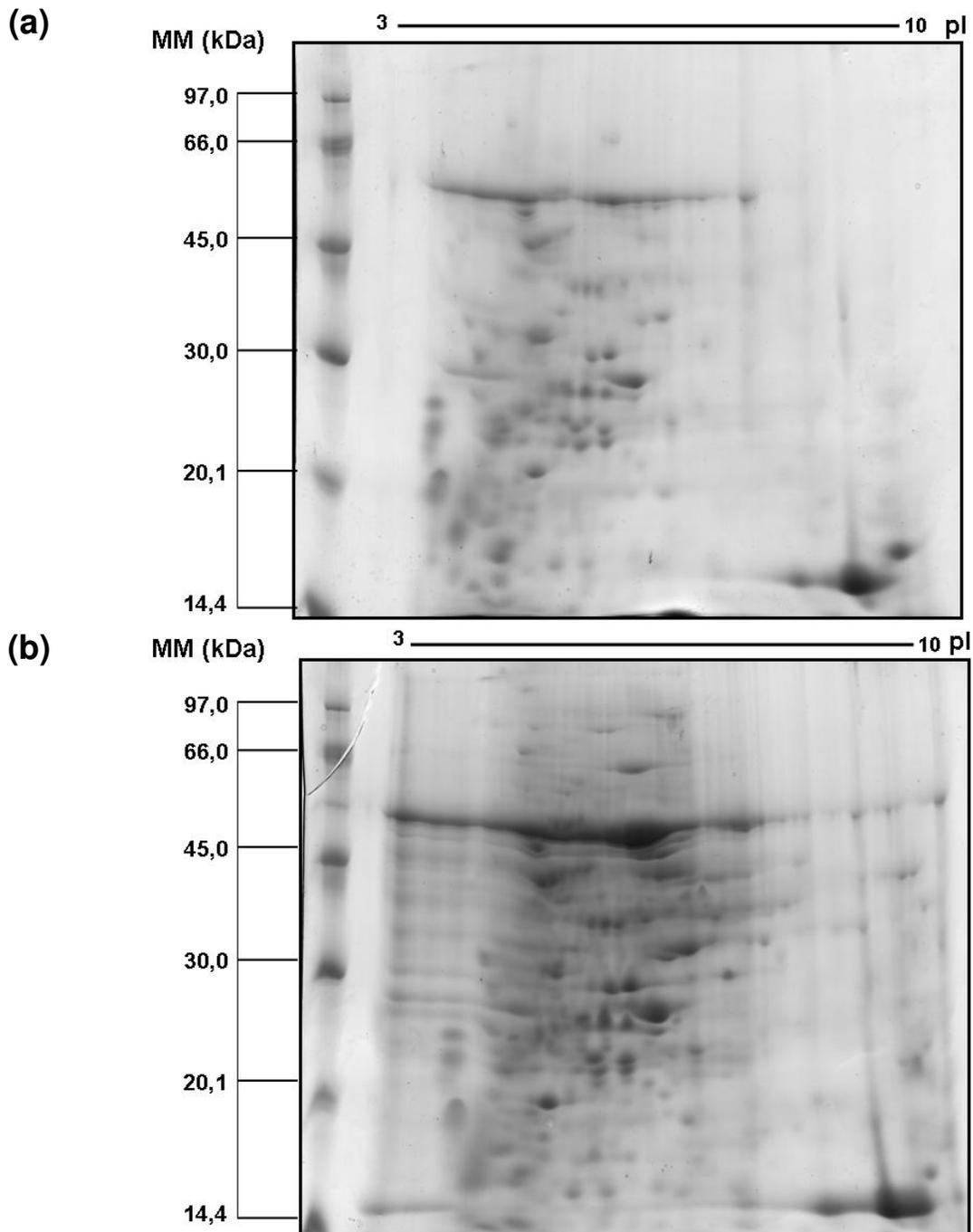


Figura 2.7 – Géis 2D-PAGE das proteínas de folhas de girassol do cultivo em solo e vermicomposto extraídas com o *Tampão 2*: (a) amostra precipitada com acetato de amônio em metanol e (b) amostra precipitada com TCA e DTT em acetona. Fita de 13 cm, pH de 3 a 10. Padrão de massa molar de 97,7 a 14,4 kDa. Géis com dimensões 130 x 130 x 1,5 mm.

Para otimizar a quantidade de proteína foi feito novamente todo o procedimento de precipitação da amostra e de 2D-PAGE. Entretanto, a quantidade de proteína aplicada foi

reduzida em 20 e 40%. Os resultados adquiridos estão expostos na Figura 2.8.

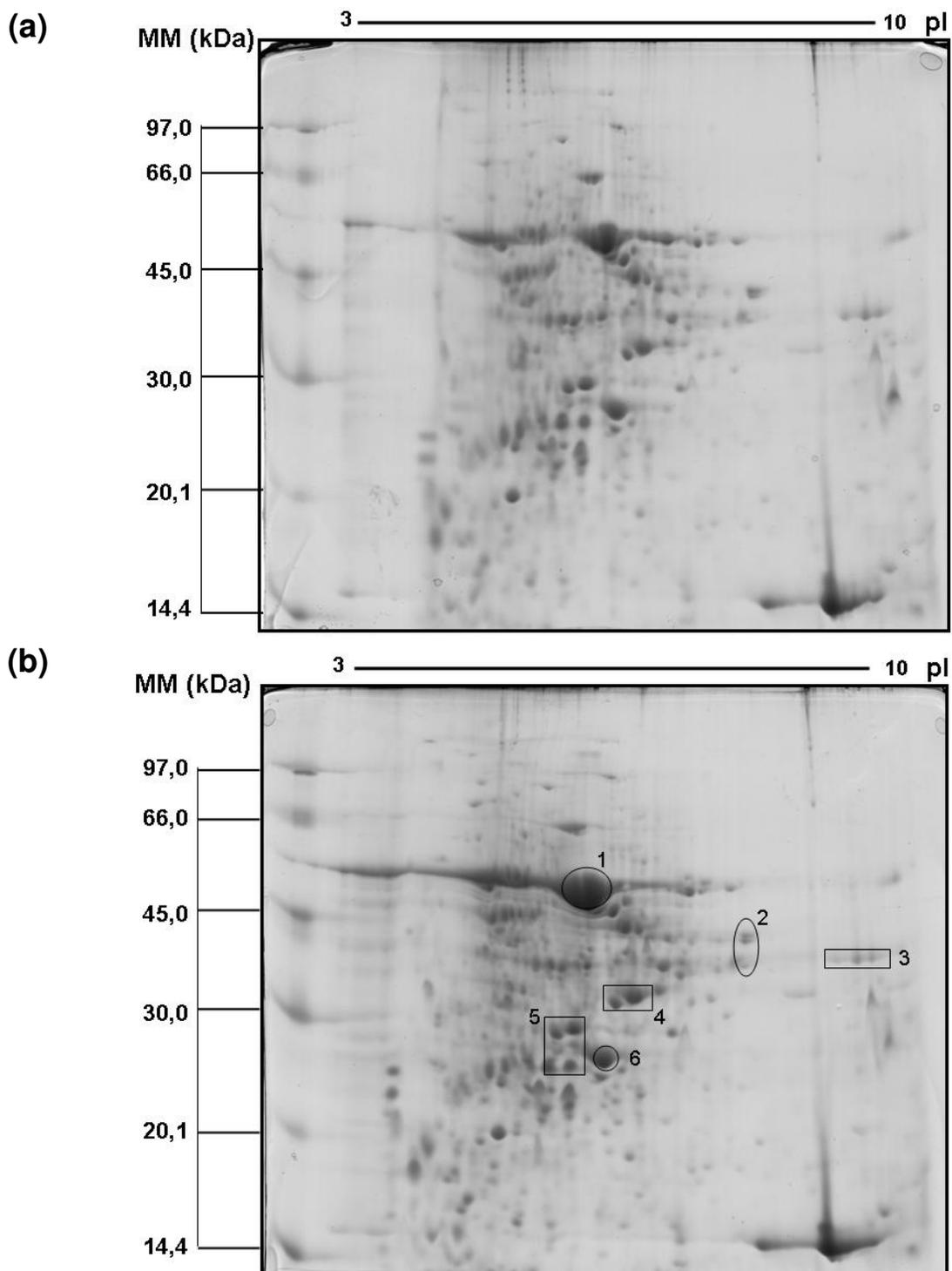


Figura 2.8 – Géis 2D-PAGE das proteínas de folhas de girassol do cultivo em solo e vermicomposto extraídas com o *Tampão 2* e precipitadas com TCA e DTT em acetona: (a) 1,8 mg de proteína e (b) 2,4 mg de proteína. Os conjuntos de proteínas são identificados pelos números de 1 a 6. Maiores detalhes vide legenda da Figura 2.7.

As amostras apresentaram perfil eletroforético semelhante. Segundo o programa *ImageMaster 2D Platinum*, versão 6.0, no gel onde foram aplicados 1,8 mg de proteína (Figura 2.8(a)) foram observados 228 *spots*. Já na amostra contendo 2,4 mg (Figura 2.8(b)) foram detectados um maior número de proteínas separadas (264 *spots*), além dos *spots* apresentarem maior intensidade. Sendo assim, as condições empregadas para a obtenção deste último gel foram escolhidas como sendo a condição otimizada. Neste gel foram detectadas proteínas com massas molares entre 110,6 kDa a 13,5 kDa com *pI* variando entre 3,7 a 10,4. A Tabela 2.3 exemplifica os dados quantitativos de alguns conjuntos de proteínas (vide Figura 2.8).

Tabela 2.3 – Informações de algumas proteínas mostradas na Figura 2.8(b) obtidas por meio do programa *ImageMaster 2D Platinum*, versão 6.0.

Identificação	MM (kDa)	pI	% Volume do Spot
1	52,2	5,7	12,30
2	42,5	7,9	0,52
	37,8	7,9	0,49
3	40,7	9,6	0,15
	39,8	9,3	0,32
	39,5	9,0	0,36
4	32,4	6,5	2,16
	31,4	6,2	0,75
5	28,1	5,7	1,61
	28,0	5,4	0,68
	24,5	5,7	0,71
	24,4	5,4	0,95
6	25,6	6,1	2,70

Os mesmos parâmetros de extração, precipitação e quantidade de proteína foram usados nas folhas de girassol oriundas da contaminação com a solução de Zn(II) e com a solução mista. Os perfis eletroforéticos destas amostras estão dispostos na Figura 2.9.

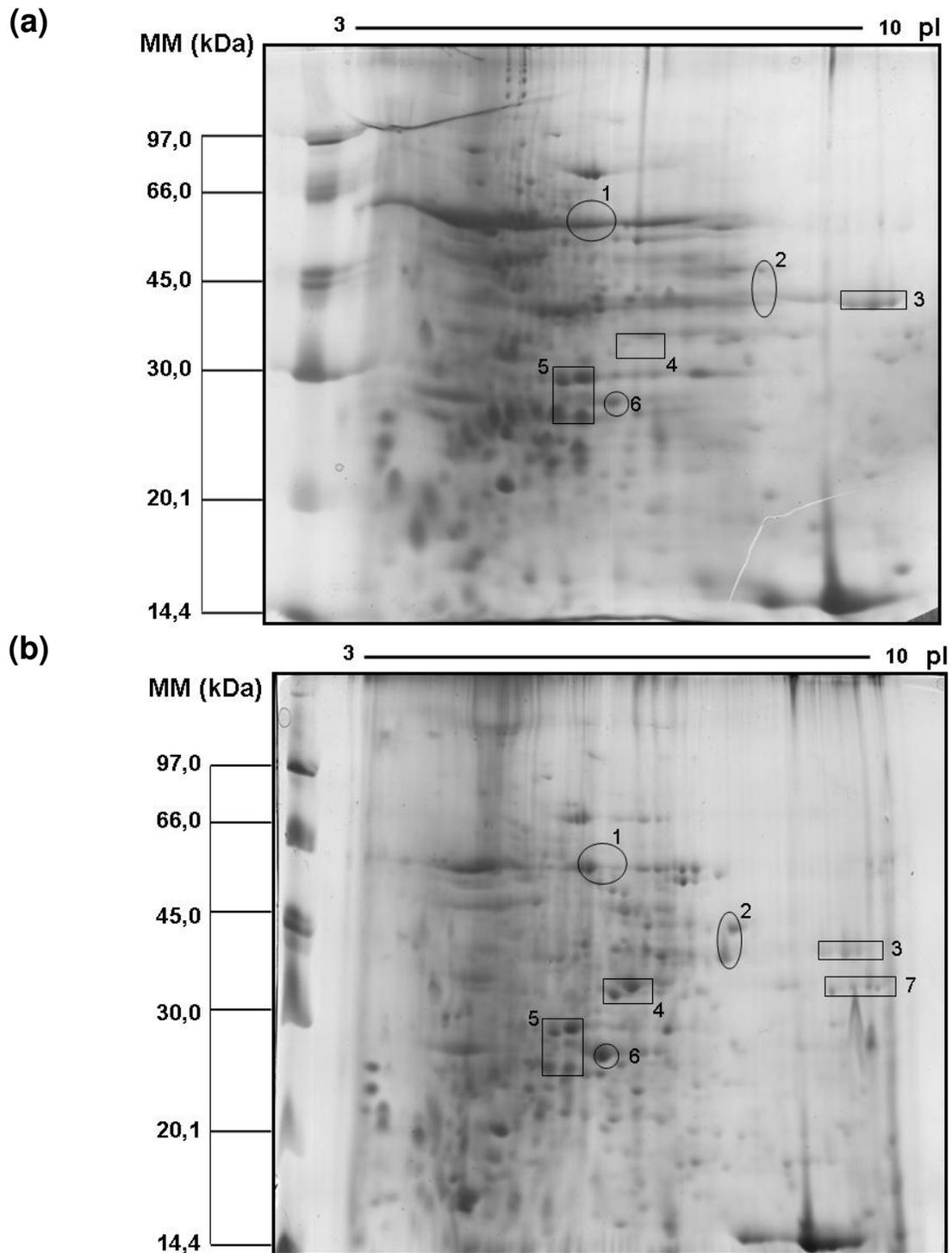


Figura 2.9 – Géis 2D-PAGE das proteínas de folhas de girassol: (a) tratamento com Zn(II) e (b) tratamento com a solução mista. Maiores detalhes vide legenda da Figura 2.8.

Foram detectados problemas de resolução nas proteínas destas amostras, embora tenham sido empregadas as mesmas condições de extração e precipitação das proteínas das folhas do cultivo em solo e vermicomposto. Provavelmente, isto ocorreu devido a

presença de impurezas iônicas que dificultaram a separação das proteínas de acordo com o seu pl. Os íons podem interagir com a proteína induzindo a modificação o que conseqüentemente, dificulta a sua focalização [6,11].

Apesar das dificuldades na separação foi possível notar diferenças na composição protéica nestas amostras. Ao ser efetuada a contaminação com Zn(II), foram detectados apenas 106 *spots* (Figura 2.9(a)). Na referida amostra, foi observado uma diminuição preponderante nos conjuntos de *spots* 1, 2, 4 e 6 ao serem comparadas com a amostra sem contaminação (Figura 2.8(b)). Na amostra contaminada com a solução mista (Figura 2.9(b)), também foram observados menos *spots* (ca. 135). Entretanto, as intensidades dos *spots* foram similares aos detectados na amostra sem contaminação. A Figura 2.10 apresenta o perfil tridimensional de alguns *spots* para comparação.

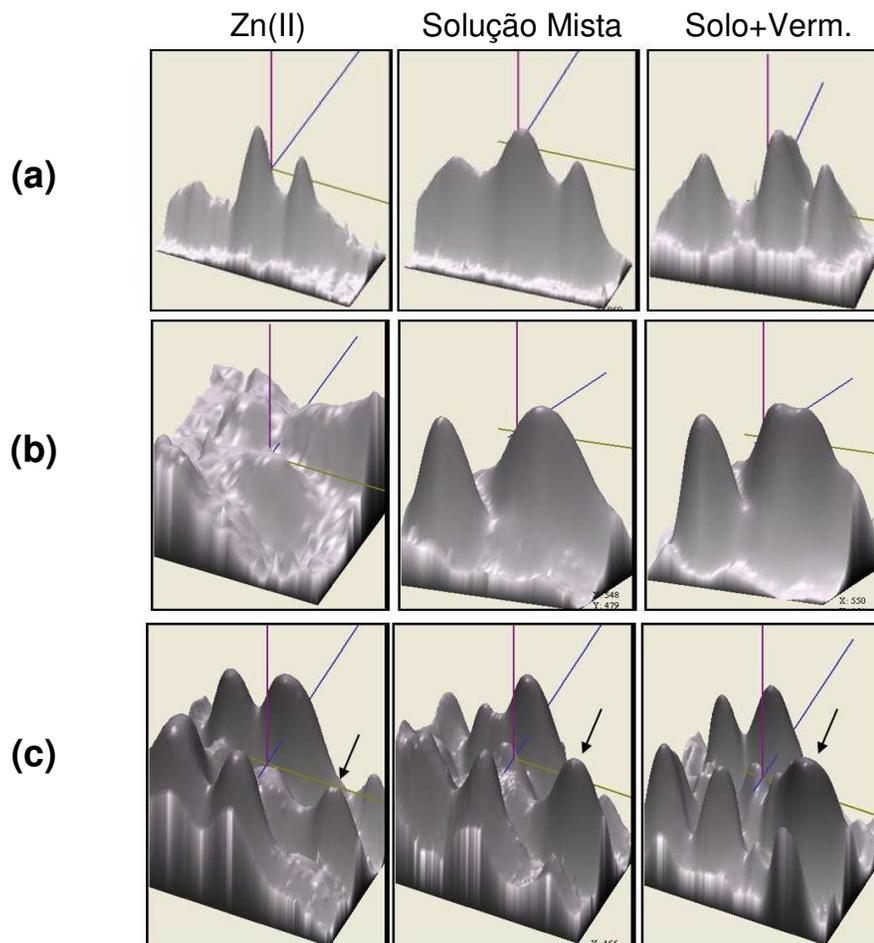


Figura 2.10 – Exemplos das imagens tridimensionais dos *spots*: (a) proteínas agrupadas no conjunto 3, (b) proteínas pertencentes ao conjunto 4 e (c) proteínas dos conjuntos 5 e 6 de acordo com a Figura 2.8. O *spot* 6 está sinalizado por uma seta. Maiores detalhes vide legenda da Tabela 2.3.

Estes dados são concordantes com a separação SDS-PAGE, onde bandas de massas molares semelhantes tiveram sua expressão consideravelmente atenuada na amostra de folhas proveniente da contaminação com Zn(II) e com a solução mista ao serem comparadas com o tratamento com solo e vermicomposto. Destacam-se, principalmente, as duas proteínas do conjunto 4 (Figura 2.8(b)), que simplesmente não foram mais detectadas nas folhas do tratamento com Zn(II). Segundo informações de bancos de dados especializados, nestes *spots* pode estar contida uma proteína transportadora de Fe(II) com MM de 33,67 kDa e pI de 6,47. Esta proteína é a principal reguladora da homeostase de ferro divalente em plantas. Ela pode também mediar o transporte de íons metálicos como cádmio, cobalto e zinco, caso haja deficiência de Fe(II) [36].

Na amostra submetida à contaminação com a solução mista, enfatiza-se a presença do conjunto de novas proteínas identificado pelo número 7 de acordo com a Figura 2.9(b). Estas proteínas, aparentemente são isoformas que possuem MM de aproximadamente 35 kDa e pI entre 9,2 a 9,9. Segundo o banco de dados Swiss-Prot [35], na *Arabidopsis thaliana* (planta usada como modelo) existe uma proteína com características idênticas no que diz respeito a MM e ao pI. Esta proteína é a peroxidase que tem como função remover o peróxido de hidrogênio, oxidar outros agentes redutores tóxicos, controlar a biossíntese e a degradação da lignina, além de responder à condição de estresse em plantas, induzido por agentes patogênicos e/ou por estresse oxidativo. Esta enzima tem como cofatores o cálcio e o grupo heme.

Com a separação eletroforética bidimensional foi possível designar, com maior precisão, as diferenças na composição protéica entre as amostras de folhas de girassol. Com este procedimento foram identificadas quais foram as proteínas que possivelmente participaram ativamente no combate ao estresse oxidativo. As proteínas mais proeminentes foram aquelas de 32,4 kDa (pI=6,5), 31,4 kDa (pI=6,2) e 25,6 kDa (pI=6,1) das folhas das plantas procedentes do tratamento com Zn(II) (proteínas presentes nos conjuntos 4 e 6, Figura 2.9(a)) e as proteínas de 35 kDa (pI entre 9,2 a 9,9) das folhas das plantas do tratamento com a solução mista (identificada pelo conjunto 7, Figura 2.9 (b)).

Estas proteínas precisam ser ainda caracterizadas por meio de técnicas de espectrometria de massas para dar início a elucidação das suas funções. Entretanto, esta

tarifa trará uma série de desafios, visto que, nem mesmo o genoma do girassol foi completamente estabelecido.

5. CONCLUSÕES PARCIAIS

A interferência da contaminação em nível protéico foi investigada, inicialmente por meio da determinação da concentração de proteínas totais em cada parte da planta. No entanto, com os resultados obtidos, não foi observado danos expressivos na composição das proteínas. Apenas com a separação eletroforética foi possível constatar mudanças significativas.

Os girassóis expostos a diferentes contaminações apresentaram alterações na composição das proteínas indicadas pela diminuição acentuada, inclusive com a supressão de algumas delas. Este comportamento foi mais evidente ao ser efetuada a contaminação com a solução de zinco e com a solução mista. Acredita-se que os girassóis, principalmente aqueles contaminados com a solução de zinco, efetuaram ajustes bioquímicos, envolvendo diferentes mecanismos, para reduzir os efeitos nocivos devido à presença excessiva de íons metálicos. Este fato foi confirmado por meio da análise da atividade enzimática realizada nas folhas. Nas folhas contaminadas com zinco e com a solução mista foram constatadas a formação de espécies de oxigênio reativas que conduziram ao estresse oxidativo. Este evento foi comprovado pelo aumento da atividade da superóxido dismutase e da glutathione redutase nas folhas contaminadas com a solução de zinco, e pela diminuição da primeira enzima e pelo aumento da segunda nas folhas contaminadas com a solução mista, ao serem comparadas com as folhas das plantas sem contaminação.

Um maior esclarecimento sobre as modificações na composição protéica das folhas somente foi alcançado quando executada a separação das mesmas utilizando a técnica 2D-PAGE. Ressalta-se que, depois de várias tentativas, obteve-se um gel bidimensional com boa resolução. Para isso, foi utilizado um tampão extrator com componentes bastante simples, sendo este, muito similar àquele usado na separação eletroforética do tipo SDS-PAGE. No preparo da amostra, a etapa primordial foi a eliminação dos interferentes por

meio de precipitação. Os melhores resultados foram adquiridos ao ser utilizado o agente precipitante formado por ácido tricloroacético e ditiotreitól em acetona.

A análise dos perfis eletroforéticos das amostras permitiu confirmar que as folhas das plantas contaminadas com o zinco foram as mais prejudicadas em nível protéico. Entretanto, enfatiza-se que serão necessários mais estudos para que seja possível identificar quais são estas proteínas e quais as funções metabólicas que elas desempenham na planta. Somente assim, será possível afirmar o motivo da planta contaminada com zinco não ter apresentado comprometimentos significativos em termos fisiológicos, pelo menos até o período de cultivo avaliado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Lehninger, A. B., Nelson, D. L. e Cox, M. M., *Princípios de Bioquímica*. Sarvier, São Paulo, Brasil, 1995.
- [2] Voet, D., Voet, J. G. e Pratt, C. W., *Fundamentals of biochemistry*. John Wiley & Sons, London, UK, 1999.
- [3] Holme, D. J e Peck, H., *Analytical Biochemistry*, Longman, New York, USA, 1998.
- [4] Melvin, M., *Electrophoresis*, John Wiley & Sons, London, UK, 1987.
- [5] Silva-Júnior, J. G., *Eletroforese de Proteínas – Guia Teórico-Prático*, Interciência, Rio de Janeiro, Brasil, 2001.
- [6] Berkeman, T. e Stenstedt, T., *2-D Electrophoresis – Principles and Methods*, Amershan Bioscences, Piscataway, USA, 2002.
- [7] Lanças, F. M., Silva, J. C. R., Bicudo, R. C. e Benassi Neto, M., *A química analítica do proteoma*. **Revista Analítica**, 6(2003)60.
- [8] Pimenta, A. M. C., *Os desafios do Proteoma*. **Ciência Hoje**, 192(2003)16.
- [9] Görg, A., Weiss, W. e Dunn, M. J., *Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomic*. **Proteomics**, 4(2004)3665.
- [10] Rabilloud, T., *Solubilization of proteins for electrophoretic analyses*. **Electrophoresis**, 17(1996)813.
- [11] Shaw, M. M. e Riederer, B. M., *Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis*. **Proteomics**, 3(2003)1408.

- [12] Wang, W., Scali, M., Vignani, R., Spadafora, A., Sensi, E., Mazzuca, S. e Cresti, M., *Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds*. **Electrophoresis**, 24(2003)2369.
- [13] Islam, N., Lonsdale, M., Upadhyaya, N. M., Higgins, T. J., Hirano, H. e Akhurst, R., *Protein extraction from mature rice leaves for two-dimensional gel electrophoresis and its application in proteome analysis*. **Proteomics**, 4(2004)1903.
- [14] Carpentier, S. C., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R. e Panis, B., *preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissue: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis*. **Proteomics**, 5(2005)2497.
- [15] O'Farrel, P. H., *High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins*. **Journal of Biological Chemistry**, 250(1975)4007.
- [16] Park, S. H. e Bean, S. R., *Investigation and optimization of the factors influencing sorghum protein extraction*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51(2003)7050.
- [17] Giavalisco, P., Nordhoff, E., Lehrach, H., Gobom, J. e Klose, J., *Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis*. **Electrophoresis**, 24(2003)207.
- [18] Hames, B. D. e Rickwood, D., *Gel electrophoresis of proteins*, IRL Press, New York, USA, 1990.
- [19] Alfenas, A. C., *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins – Fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos*, UFV, Viçosa, Brasil, 1998.
- [20] Laemmli, U. K., *Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4*. **Nature**, 227(1970)680.
- [21] McCarthy, J., Hopwood, F., Oxley D., Laver, M., Castagna, A., Righetti, P. G., Williams, K. e Herbert, B., **Carbamylation of proteins in 2-D electrophoresis - Myth or reality?** *Journal of Proteome Research*, 3(2003)239-242.
- [22] Bellato, C. M., Garcia, A. K. M., Mestrinelli, F., Tsai, S. M., Machado, M. A. e Meinhardt, L. W., *The induction of differentially expressed proteins of Xylella fastidiosa with citrus extract*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 35(2004)235.
- [23] Dunn, M. J. e Corbett, J. M., *Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*. **Methods in Enzymology**, 271(1996)177.
- [24] Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. **Analytical Biochemistry**, 72(1975)248.
- [25] Fornazier, R. F., Ferreira, R. R., Pereira, G. J. G., Molina, S. M. G., Smith, R. J. Lea, P. J. e Azevedo, R. A., *Cadmium stress in sugar cane callus cultures: Effects on antioxidant enzymes*. **Plant Cell, Tissue and Organic Culture**, 71(2002)125.

- [26] Ferreira, R. R., Fornazier, R. F., Vitória, A. P., Lea, P. J. e Azevedo, R. A., *Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress*. **Journal of Plant Nutrition**, 25(2002)327.
- [27] Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi L. e Righetti. P. G., *Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis*. **Electrophoresis**, 25(2004)1327.
- [28] Compton, S. e Jones, C. G., *Mechanism of dye response and interference in the Bradford Protein Assay*. **Analytical Biochemistry**, 151(1985)369.
- [29] Lucarini, A. C. e Kilikian, B. V., *Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances*. **Biotechnology Techniques**, 13(1999)149.
- [30] Sairam, R. K., Singh, D. V. e Srivastava, G. C., *Changes in activities of antioxidant enzymes in sunflower leaves of different ages*. **Biologia Plantarum**, 47(2003)61.
- [31] Singh, S., Saxena, R., Pandey, K., Bhatt, K. e Sinha, S., *Response of antioxidants in sunflower (*Helianthus annuus L.*) grown on different amendments of tannery sludge: its metal accumulation potential*. **Chemosphere**, 57(2004)1663.
- [32] Rout, G. R. e Das, P., *Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc*. **Agronomie**, 23(2003)3.
- [33] Palma, J. M., Sandalio, L. M., Javier-Corpas, F., Romero-Puertas, M. C., McCarthy, I. e del Río, L. A., *Plant proteases, protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes*. **Plant Physiology Biochemistry**, 40(2002)521.
- [34] Scandalios, J. G., *Oxidative stress: molecular perception and transduction of signal triggering antioxidant gene defenses*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 38(2005)995.
- [35] Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P. J. e Azevedo, R. A., *Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier*. **Functional Plant Biology**, 32(2005)481.
- [36] Banco de dados Swiss-Prot, disponível no site <http://au.expasy.org/sprot/>, acessado em fevereiro de 2005.
- [37] Berg, J. M., Tymoczko, J. L. e Stryer, L., *Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, USA, 2002.
- [38] Bailly, C., Leymarie, J., Lehner, A., Rousseau, S., Côme, D. e Corbineau, F., *Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying*. **Journal of Experimental Botany**, 55(2004)475.
- [39] Hagemeyer, J. e Breckle, S. W., *Growth under trace element stress – in Plant Root* (Waisel, Y., Eshel, A. and Kafkai, U. eds), Marcel Dekker, New York, USA, 1996, pp. 415-433.

- [40] Allagulova, C. R., Gimalov, F. R., Shakirova, F. M. e Vakhitov, V. A., *The plant dehydrins: Structure and putative functions*. **Biochemistry**, 68(2003)945.
- [41] Rios-Gonzalez, K., Erdei, L. e Lips, H., *The activity of antioxidant enzymes in maize and sunflower seedlings as affected by salinity and different nitrogen sources*. **Plant Science**, 162(2002)923.
- [42] Gallego, S. M., Benavides, M. P. e Tomaro, M. L., *Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress*. **Plant Science**, 121(1996)151.
- [43] Arora, A., Sairam, R. K. e Srivastava, G. C., *Oxidative stress and antioxidative system in plant*. **Current Science**, 82(2002)1227.

CAPÍTULO 3

*Avaliação quali e quantitativa de algumas
metaloproteínas presentes nas
folhas de girassol*

1. OBJETIVOS

Neste capítulo foram efetuadas avaliações de algumas possíveis metaloproteínas presentes nas folhas de girassol. Neste caso, foram estudadas as modificações na quantidade de íons metálicos ligados às proteínas de acordo com o tipo de tratamento empregado no cultivo das plantas. Ressalta-se que este estudo foi realizado somente nas proteínas separadas por SDS-PAGE. Quando os experimentos foram efetuados ainda não havia sido estabelecido sequer o protocolo de extração das proteínas para a separação bidimensional.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. METALÔMICA

Os íons metálicos e suas implicações têm sido investigados de forma independente em muitos campos científicos, tais como: bioquímica, química bioinorgânica, ciências farmacêuticas, medicina, toxicologia, agricultura, meio ambiente, entre outras. Tais áreas apresentam uma profunda inter-relação com os íons metálicos do ponto de vista biológico. Desta forma, é desejável que a ciência dos biometais seja promovida como sendo uma área multidisciplinar, capaz de integrar os campos científicos interessados na relação metal/organismo [1].

Para facilitar esta integração, em 2002, Hiroki Haraguchi propôs o termo “metalômica” para definir a ciência dos biometais. Os principais objetivos da metalômica são verificar a distribuição das espécies metálicas e semimetálicas, bem como elucidar os aspectos fisiológicos e funcionais das biomoléculas que contenham íons metálicos em suas estruturas presentes nos organismos. Este pesquisador ainda definiu o termo metaloma como o conjunto de espécies metálicas e semimetálicas, na forma livre ou complexada presente em um sistema biológico (células, tecidos, fluidos ou organismos) [1,2].

O termo metaloproteoma se refere a todas as proteínas que contenham em suas estruturas íons metálicos que estejam inseridas no proteoma de um organismo (ou de um tecido) sob determinado conjunto de condições em um dado estágio de desenvolvimento. Conseqüentemente, as metaloproteínas e suas interações com os íons metálicos podem ser consideradas como marcadores biológicos de alterações patológicas e fisiológicas [2].

Os estudos realizados na metalômica são considerados de mesma importância científica que aqueles feitos na genômica e na proteômica. Isto ocorre porque os íons metálicos desempenham um papel importante na atividade biológica. A maioria destes íons metálicos faz ligações com ácidos orgânicos, proteínas, polissacarídeos ou fragmentos de DNA. No caso da ligação envolvendo o íon metálico e as proteínas, são formadas as biomoléculas denominadas metaloproteínas, *metal-binding* proteínas e as metaloenzimas (catalisadores biológicos usados para regular reações e funções fisiológicas) que serão discutidas em maiores detalhes a seguir. As sínteses e as funções metabólicas exercidas pelos genes (DNA e RNA) e pelas proteínas não podem ser realizadas sem a presença de vários íons metálicos e das metaloenzimas [2-5].

Estudos metalômicos, usados para identificação e/ou quantificação de íons metálicos e semimetálicos, podem fornecer informações sobre [1-5]:

- 1) a distribuição dos mesmos entre os compartimentos de uma célula;
- 2) a sua coordenação (incorporado a qual biomolécula ou complexado a qual bioligante), sendo possível efetuar estudos de especiação;
- 3) a concentração de uma espécie metálica específica;
- 4) a estrutura da biomolécula.

Para a realização de estudos metalômicos, diversas técnicas analíticas são utilizadas, especialmente, para a análise de metaloproteínas. Neste caso, as técnicas são combinadas para obter informações a respeito das espécies metálicas, bem como para identificar a massa molar e a estrutura da molécula. Estas técnicas podem ser divididas em três conjuntos descritos resumidamente na Figura 3.1. Tais técnicas devem possuir características apropriadas, capazes de superar os desafios que envolvem a análise de especiação. Frequentemente, as espécies metálicas de interesse estão presentes em níveis extremamente baixos, requerendo, assim, o uso de detectores que apresentem

elevada sensibilidade. Além disso, se faz necessário o uso de técnicas de separação eficientes, acopladas a esses detectores, para aumentar a seletividade e ajudar na distinção entre as espécies similares oriundas de um mesmo ou de diferentes elementos [5].

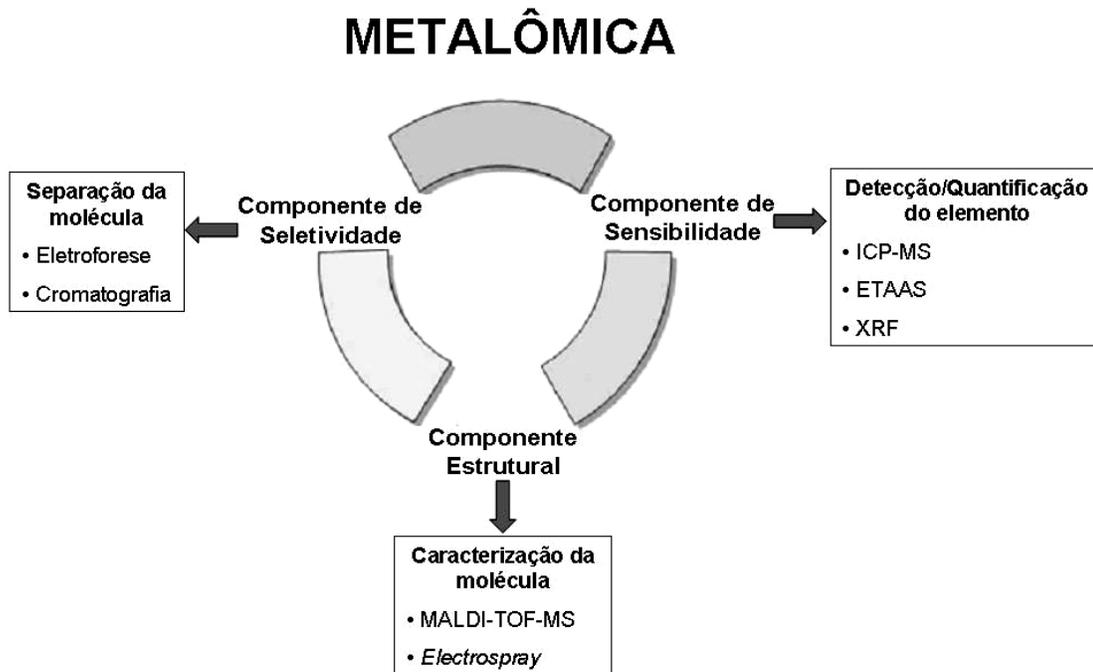


Figura 3.1 – Principais técnicas usadas em estudos metalômicos [5].

2.2. METALOPROTEÍNAS E *METAL-BINDING* PROTEÍNAS

Elementos em baixas concentrações, como íons metálicos, representam um papel importante na atividade biológica. Sendo assim, a investigação destas espécies químicas em tecidos vegetais e em órgãos humanos é indispensável para a compreensão de suas funções. Como mencionado, a maioria destes íons metálicos faz ligações específicas com proteínas ou enzimas [6].

As metaloproteínas e as *metal-binding* proteínas representam uma grande parcela do número total das proteínas [7]. Estima-se que cerca de 40% de todas as proteínas e enzimas contenham íons metálicos em suas estruturas. Ao serem examinadas as informações disponíveis em bancos de dados específicos, aproximadamente 25% das proteínas contém pelo menos um átomo de metal coordenado. De acordo com o

histograma disponível na Figura 3.2, o ferro e o zinco são os íons metálicos mais comumente encontrados nas proteínas [8].

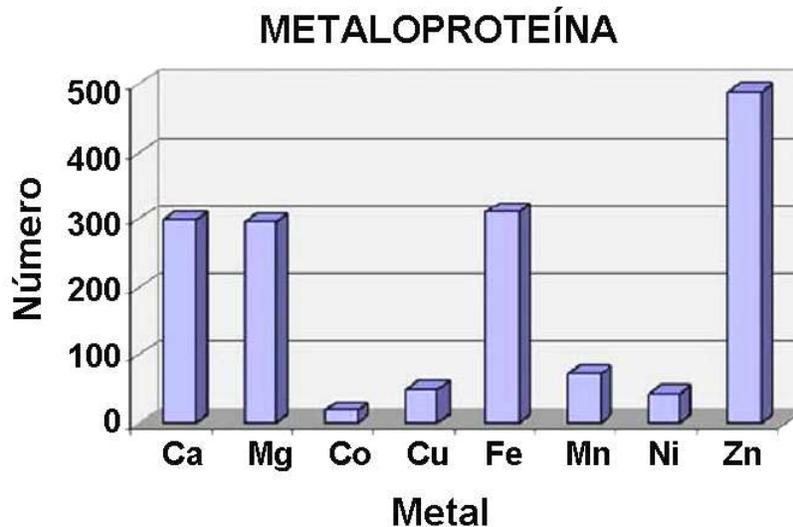


Figura 3.2 – Representação do número de metaloproteínas depositadas no banco de dados especializado até abril de 2005. Adaptação da referência [8].

As metaloproteínas e as *metal-binding* proteínas são responsáveis por muitos processos metabólicos, tais como conversão de energia biológica em fotossíntese e respiração, além de serem fundamentais em processos que governam a expressão e a regulação de genes. Este grupo de moléculas também desempenha a função de sinalizadores de processos bioquímicos como diferenciação celular e crescimento em plantas [9,10]. Elas também exercem o papel de catalisador, transporte e de armazenamento [11,12].

Para se formar as metaloproteínas é preciso que a proteína em questão possua uma arquitetura adequada, ou seja, contenha número e tipo de ligante apropriado. Este ligante necessariamente deve possuir uma geometria correta, capaz de encapsular e ativar o íon metálico. Uma única arquitetura pode ser capaz de acomodar uma grande variedade de íons metálicos [11]. Os peptídeos contêm diversos grupos funcionais em suas cadeias laterais que podem coordenar íons metálicos, tais como os grupos cisteína ($\text{HOOCCHCH}_2\text{SHNH}_2$) e metionina ($\text{HOOCCHCH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3\text{NH}_2$), que coordenam os íons metálicos com afinidade ao enxofre presente nestes grupos. Pode ser também incluída a

histidina, que após a desprotonação, contém átomos de nitrogênio disponíveis para a coordenação [13].

As metaloproteínas são consideradas distintas, em termos de definição, das *metal-binding* proteínas ou dos complexos metal-proteínas. Nas primeiras, o íon metálico interage fortemente com as proteínas por meio de interações de elevada afinidade, que são mantidas mesmo durante a manipulação da amostra. Já nas *metal-binding* proteínas, as interações são de baixa afinidade sendo facilmente rompidas [14-16]. Sendo assim, são consideradas metaloproteínas todas as proteínas que formam, em um determinado ambiente químico, complexos termodinamicamente estáveis com os íons metálicos e que são estáveis quando submetidas a um procedimento analítico [2].

Em geral, as proteínas interagem fracamente com os íons monovalentes, tais como K(I) e Na(I). Entretanto, os íons divalentes, tais como Ca(II) e Mg(II), apresentam interações moderadas com as proteínas. Os íons de metais de transição, tais como Cu(II), Fe(II), Mn(II), Mo(II) e Zn(II), devido às suas características (densidades, raios atômicos pequenos e interação por meio de forças eletrostáticas), apresentam interações mais fortes, constituindo, assim, as metaloproteínas [14,15].

Os principais grupos de interesse envolvendo as metaloproteínas incluem as metaloenzimas, as proteínas transportadoras de íons metálicos e, finalmente, as proteínas que indicam a presença de estresse por íons metálicos [16,17].

As metaloenzimas são enzimas que apresentam como cofatores íons metálicos usados para ativar e estabilizar a estrutura das mesmas. Como exemplos, podem ser citadas a superóxido dismutase, as metaloproteinases e as proteínas quinase. As metaloproteinases são proteínas especializadas em quebrar as ligações peptídicas entre os aminoácidos, sendo responsáveis pelos processos de senescência e apoptose celular, entre outros. Já as proteínas quinase provocam a modificação química de outras proteínas pela introdução de um grupo fosfato, alterando a sua função (processo conhecido por fosforilação) [17].

As proteínas transportadoras são ricas em grupos cisteínas, tais como a albumina e a transferrina, sendo apropriadas para transportar tanto íons de elementos essenciais quanto aqueles não-essenciais. Esta classe de proteínas regula os níveis de íons metálicos dentro do organismo.

Alguns organismos acionam, como mecanismo de defesa, a síntese de proteínas capazes de complexar o excesso de íons metálicos. Este grupo é conhecido como metalotionina (MT). As metalotioninas apresentam baixa massa molar (6-7 kDa) sendo caracterizadas pelo elevado teor de cisteínas (30%). Elas possuem elevada afinidade para associar com íons de metálicos pertencentes à família dos elementos de transição (especialmente com o Cd, Cu, Hg e Zn) [18].

Tem sido realizado um grande esforço para compreender as metaloproteínas e as *metal-binding* proteínas. Os principais objetivos consistem em identificar o ligante e determinar a estequiometria do mesmo na proteína. Incluem-se, ainda, informações a respeito das suas estruturas, sobre as funções dos sítios metálicos. Destaca-se, especialmente, a tentativa de se entender as implicações biológicas destas interações.

2.3. FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X

A espectrometria por fluorescência de raios-X (XRF, do inglês *X-Ray Fluorescence Spectrometry*) é uma técnica não-destrutiva, capaz de identificar elementos que apresentam números atômicos maiores que o oxigênio, em amostras sólidas e líquidas. Para isso, os elementos presentes na amostra são excitados por meio da absorção de um feixe primário de raios-X, ocasionando o decaimento dos mesmos com emissão de linhas características de fluorescência. A fluorescência emitida é detectada e, então, identificada de acordo com a sua energia usando um detector que separa cada componente do espectro por energia ou comprimento de onda [19,20].

Quando é necessária maior sensibilidade e resolução para a identificação dos elementos, pode ser empregada a fluorescência de raios-X com radiação síncrotron (SRXRF, do inglês *Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence Spectrometry*). Com o emprego da SRXRF pode-se alcançar um limite de detecção absoluto da ordem de 10^{-12} a 10^{-15} g e um limite de detecção relativo com valores entre $\mu\text{g g}^{-1}$ a ng g^{-1} , em amostras com massas na ordem de microgramas. As características favoráveis descritas da SRXRF permitem que a mesma seja usada em análises multielementares de bandas de proteínas [6]. Embora a SRXRF possa ser aplicada na análise de íons metálicos em proteínas, existem poucos trabalhos disponíveis na literatura.

Um exemplo de aplicação desta técnica na análise de íons metálicos em proteínas foi desenvolvido por Gao, *et al.* [21]. Neste estudo, foi realizada a separação e a detecção de proteínas de citosol de fígado humano para a determinação de Fe(III), Cu(II) e Zn(II) por meio da SRXRF. O procedimento adotado incluía a separação das proteínas por cromatografia de filtração em gel e também por focalização isoeétrica. A amostra de citosol continha proteínas com MM entre 10 e 25 kDa. Em duas bandas foram identificados íons zinco, em 11 bandas íons ferro e, finalmente, o cobre em uma das bandas.

Gao, *et al.* [6] também usaram a SRXRF na análise de proteínas de citosol de fígado humano. Porém, neste caso, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE. O gel obtido foi imediatamente seco após a corrida eletroforética para reduzir significativamente o *background* (radiação de fundo) resultante do efeito Compton. Com esta metodologia foi possível distinguir 35 bandas de proteínas e identificar e comparar a distribuição de várias metaloproteínas. Neste trabalho, foram identificadas 6 bandas contendo íons zinco, 4 bandas contendo íons ferro e 1 banda com íons cobre. Em um trabalho mais recente, Gao, *et al.* [22] separaram por focalização isoeétrica, proteínas em amostras de tecido de citosol hepático de indivíduos com e sem carcinoma. Com o procedimento adotado também foi verificada a distribuição de cobre, ferro e zinco nas proteínas.

No trabalho de Weseloh, *et al.* [23] foi usado SDS-PAGE para separar as proteínas provenientes de amostra sintética composta por apoazurina (proteína que possui ligações não covalentes com íons metálicos) e amostra de tecido de ratos, que receberam dieta rica em selênio. Após a separação das proteínas nestas amostras, foi feita a avaliação da distribuição de vários elementos (Ca, Cl, Fe, Se, Sn e Zn) por SRXRF, ao longo da direção da corrida eletroforética, sem ter sido feita a etapa de coloração dos géis. Neste caso, foi possível fazer a análise de íons metálicos ligados às proteínas presentes, em concentrações acima de 100 ng de metaloproteínas por grama de mistura protéica.

Recentemente, Verbi, *et al.* [24] utilizaram a técnica de μ -SRXRF (do inglês, *micro Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence Spectrometry*) para mapear espécies químicas presentes em proteínas procedentes de calos embriogênicos de *Citrus* previamente separadas por SDS-PAGE. Nas bandas analisadas foi observada uma distribuição heterogênea de vários íons metálicos. Especificamente nas bandas de 86 e 14 kDa foi detectada uma variação no nível de ferro. Já na banda de 53 kDa constatou-se alterações

nos teores de Ca, Cu, Fe, K e Zn. Os resultados obtidos sugeriram que as proteínas apresentavam afinidades diferentes por íons metálicos.

Para investigar os íons metálicos ligados às proteínas do girassol foi usada a fluorescência de raios-X com radiação síncrotron. Por esta razão, maiores detalhes serão fornecidos a respeito da radiação síncrotron e da linha experimental disponível no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) usada neste trabalho.

2.3.1. RADIAÇÃO SÍNCROTRON

A radiação síncrotron é uma fonte de raios-X que possui elevada intensidade (10^3 a 10^6 vezes mais forte que a fonte de raios-X convencional), que abrange uma ampla faixa do espectro eletromagnético (desde o infravermelho até os raios-X), além de ter polarização linear e ser altamente colimada [19]. Ela é formada a partir da radiação eletromagnética emitida por elétrons altamente energéticos, que circulam em um acelerador ou anel de armazenamento.

A energia presente nos aceleradores de grande porte é da ordem de gigaelectronvolts (GeV). No caso do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, localizado na cidade de Campinas, SP, os elétrons possuem uma energia de 1,37 GeV. Esta energia é produzida por meio de um canhão eletrostático, onde os elétrons são gerados e pré-acelerados a energia de 80 mil eV. Em seguida, eles são acelerados até 120 megaelectronvolts (MeV) em um acelerador linear. Estes elétrons são transportados para um acelerador circular intermediário para adquirirem a energia de 500 MeV. O ápice de energia dos elétrons é alcançado no acelerador principal ou anel de armazenamento, onde os elétrons podem ficar retidos por várias horas (em torno de 14 horas) [25].

A luz síncrotron (emitida tangencialmente à curvatura dos elétrons) é resultado do desvio da trajetória do feixe de elétrons realizado pela ação de eletroímãs presentes no anel de armazenamento. Este anel, na verdade, tem o formato de um poliedro, possui seis seções retas e seis pontos de inflexão da trajetória que completam a circunferência. Para realizar os experimentos, foram construídas linhas que coletam a luz síncrotron. O tipo de pesquisa e do experimento a ser realizado depende da faixa da energia definida para cada linha de luz. Desta forma, a luz síncrotron pode ser utilizada em estudos de diversas áreas como: física, biologia, química, medicina, entre outras [25,26].

Nas linhas de luz são selecionados e, então, focalizados o comprimento de onda de interesse. No final das mesmas, são acopladas estações experimentais que permitem a análise do material desejado [26]. Dentre todas as onze linhas disponíveis no LNLS, destaca-se a linha de fluorescência de raios-X (D09B – implementada em 1998) empregada neste trabalho.

Na estação experimental da linha de XRF do LNLS, o feixe de luz é focalizado, permitindo a criação de um feixe com diâmetro da ordem de μm . Isto torna possível examinar áreas microscópicas de amostras para se obter informações sobre a distribuição de espécies químicas presentes [27]. Para isso, a amostra é colocada em uma plataforma que controla o seu posicionamento por meio de um sistema de controle remoto que a movimenta nos eixos X, Y e Z. Na estação experimental, também há uma câmera acoplada a um microscópio óptico convencional que possibilita monitorar a amostra antes e durante o processo de aquisição de dados [28]. Em geral, são colocados filtros de alumínio (usados para diminuir a intensidade do feixe de luz) para não danificar componentes da linha. Sendo assim, na linha de fluorescência do LNLS somente é possível detectar espécies químicas que possuam números atômicos maiores que do alumínio.

O sistema de detecção é composto por detectores de Ge ou Si/Li, posicionados a 90° no feixe de luz. Os detectores são usados para converter a energia de fótons de raios-X em pulsos de voltagem [26-28].

Neste trabalho de Tese, em virtude da grande variabilidade de proteínas e de dados gerados a partir da fluorescência de raios-X, a ferramenta quimiométrica rede neural Kohonen foi aplicada. Por este motivo, algumas considerações a respeito da mesma são descritas a seguir.

2.4. REDE NEURAL KOHONEN

Dentre as diversas ferramentas quimiométricas disponíveis, destaca-se a rede neural Kohonen. Este tipo de rede é capaz de reconhecer padrões, classificar e agrupar dados de acordo com as suas similaridades. Ao se empregar esta ferramenta é possível fazer com que dados multidimensionais sejam projetados em um ambiente bidimensional

mantendo a informação original. A fácil visualização da distribuição dos dados é uma das principais características desta ferramenta, resultando, assim, em um método mais amigável de classificação e interpretação de dados [29-31]. Esta é a principal vantagem desta rede comparada com outras rotinas de classificação, como por exemplo, a análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*). Ao ser utilizado a PCA é necessário trabalhar com um espaço n -dimensional formado pelos componentes principais (PCs), onde a avaliação dos dados é feita dois-a-dois. Este processo, muitas vezes, pode tornar a interpretação tediosa, além de dificultar a classificação.

Na rede neural Kohonen, o algoritmo usado para fazer com que dados multidimensionais sejam preservados dentro de um arranjo bidimensional é denominado mapas auto-organizáveis (SOM, do inglês *self-organizing maps*). O sistema SOM normalmente é baseado em uma única camada de neurônios disposta em um arranjo mono ou bidimensional [31].

Um esquema genérico da rede neural Kohonen está apresentado na Figura 3.3. Esta rede pode ter várias arquiteturas. Na Figura 3.3, tem-se uma rede com dimensão 7×7 contendo, ao todo, 49 neurônios representados pelas colunas “empacotadas” em uma caixa. Cada um destes neurônios possui níveis de pesos, que são dependes do número de variáveis estudadas. Estas variáveis podem ser, por exemplo, valores de absorbâncias, potenciais ou intensidades de fluorescência. Existem tantos níveis de pesos na rede de Kohonen quantas forem as variáveis. Já os dados de entrada são vetores denominados \mathbf{x}_s , sendo que cada vetor representa uma amostra. Por exemplo, se um conjunto de dados tem 30 amostras onde foram avaliadas as concentrações de 5 íons metálicos, serão inseridos 30 vetores \mathbf{x}_s na rede, sendo que cada neurônio da mesma terá 5 níveis de pesos.

O objetivo da rede neural Kohonen é o de mapear o vetor de entrada de modo que sinais similares excitem os mesmos neurônios, ou então, neurônios que estejam muito próximos. Para isso, o algoritmo gera um vetor peso para cada neurônio da rede. O neurônio que apresentar um vetor peso com menor diferença com o vetor de entrada é ativado e a amostra fica locada no mesmo. Sendo assim, o usuário pode assumir que as amostras que ficarem no mesmo neurônio ou em neurônios vizinhos apresentam correlações entre si, ou seja, tem o mesmo comportamento para a propriedade estudada.

Por outro lado, quanto mais longe as amostras estiverem localizadas na rede, maiores diferenças elas possuem [29-32].

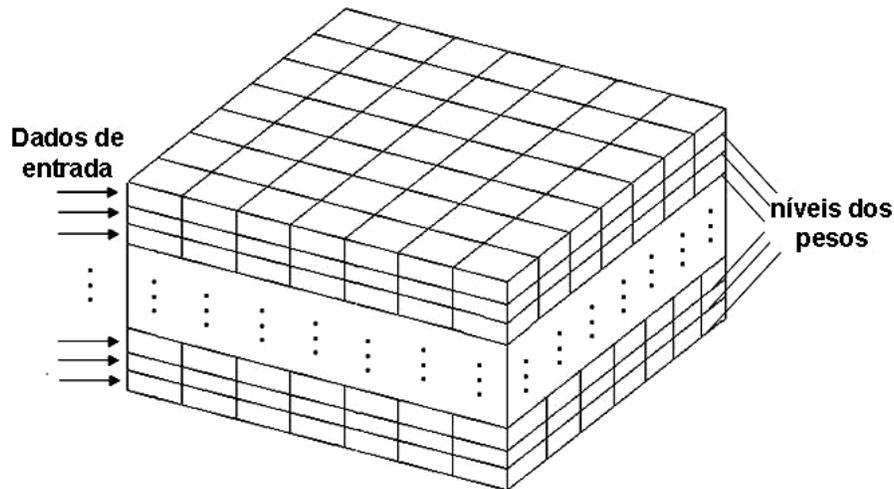


Figura 3.3 – Arquitetura típica da rede neural Kohonen. Os neurônios são representados por colunas inseridas em uma caixa. Todos os dados de entrada são colocados nos neurônios ao mesmo tempo.

As redes neurais de Kohonen podem ser aplicadas em inúmeras situações. A seguir, são enfatizados alguns exemplos em química analítica.

A rede neural Kohonen foi usada para classificar solos de regiões distintas do Brasil. Neste caso, os solos foram avaliados por infravermelho próximo. No trabalho, Fidêncio, *et al.* [33] empregaram 191 amostras de solo conhecidas e 50 tipos de amostras desconhecidas. Ao serem inseridos os dados a rede neural Kohonen (dimensão 21 x 21) classificou as amostras conhecidas em 4 grupos. Após a classificação das amostras conhecidas, foi aplicado o mesmo modelo de rede para as amostras desconhecidas. Foi possível classificar 45 amostras pertencentes a um dos 4 grupos.

Em outra situação [32], a rede neural Kohonen foi aplicada aos dados de concentração de 14 elementos químicos, obtidos por ICP OES, em amostras de algas provenientes do continente Antártico. Com o procedimento adotado, os autores conseguiram classificar as algas em três grupos taxonômicos. Dentre as espécies químicas avaliadas, o nível de cobre demonstrou ser um importante elemento para estudos de taxonomia de algas.

Brodnjak-Voncina, *et al.* [34] fizeram a distinção de amostras de óleos vegetais de acordo com a sua procedência usando a rede neural Kohonen. Para isso, a composição

de ácidos graxos presentes nos óleos foi determinada por meio de cromatografia gasosa. Nas 132 amostras de óleos foram avaliadas 7 variáveis (palmítico, esteárico, oléico, linoléico, linolênico, eicosanoico e eicoseno). Em um trabalho mais recente, Fonseca, *et al.* [35] classificaram óleos minerais baseados na sua origem geográfica por meio da rede neural Kohonen com elevado grau de exatidão.

Enfatiza-se, por fim, que o processamento dos dados realizado pela rede neural Kohonen envolve uma série de equações e cálculos matemáticos que não foram enfocados neste Capítulo de Tese. O uso desta ferramenta quimiométrica foi feito exclusivamente para auxiliar nos estudos com as metaloproteínas.

2.5. TÉCNICAS DE QUANTIFICAÇÃO DE ÍONS METÁLICOS

Devido à elevada complexidade e ao baixo nível de espécies metálicas em amostras biológicas, especialmente em metaloproteínas, é imprescindível o uso de técnicas que apresentem elevada sensibilidade e seletividade para a quantificação destas importantes espécies. Dentre as diversas técnicas capazes de quantificar íons metálicos serão enfatizados os principais aspectos da espectrometria atômica com atomização eletrotérmica e da espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente.

2.5.1. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA (ETAAS)

A espectrometria de absorção atômica é amplamente empregada na determinação de íons metálicos e semimetálicos em amostras biológicas. Dentre as diversas variações disponíveis, destaca-se a ETAAS. Nesta técnica, o analito é atomizado por aquecimento resultante da passagem de corrente elétrica pelo corpo do atomizador. Neste caso, a amostra líquida passa geralmente por três estágios de aquecimento. No primeiro deles, denominado etapa de secagem, o solvente é evaporado. Na segunda fase, designada etapa de pirólise, alguns concomitantes são removidos para melhorar o desempenho

analítico. Finalmente na última etapa, chamada de etapa de atomização o analito é atomizado [36].

Esta técnica apresenta baixos limites de detecção (entre ng kg^{-1} a $\mu\text{g kg}^{-1}$), podendo ser usada para a quantificação de elementos em baixas concentrações. Isto é possível pelo fato da amostra ser atomizada em um curto período. Isto faz com que ocorra uma melhora na eficiência de atomização. Além disso, a ETAAS requer pequenos volumes de amostras (5 a 100 μL) e apresenta elevada seletividade [36,37].

Devido às suas características favoráveis esta técnica pode ser empregada na quantificação de íons metálicos ligados a proteínas, após a separação por cromatografia líquida ou por eletroforese (capilar ou em gel) [13]. Entretanto, existem poucos trabalhos na literatura que reportam a utilização da ETAAS quando as proteínas são separadas por eletroforese em gel. A seguir são citados dois exemplos.

Scancar, *et al.* [38] usaram a cromatografia por exclusão e ETAAS para investigar a concentração de íons metálicos ligados a proteínas de soro e de fluído peritoneal de 12 pacientes que faziam hemodiálise. As frações protéicas oriundas da cromatografia foram avaliadas após serem separadas por SDS-PAGE. Os autores conseguiram identificar que o Al(III), Cu(II), Fe(III) e Zn(II) ligavam-se a diferentes proteínas com elevada massa molar. O alumínio estava ligado à transferrina, o cobre à albumina e o zinco às albuminas e às globulinas. Nos pacientes que faziam hemodiálise foi constatado um acúmulo de alumínio e de ferro. Por outro lado, os níveis de cobre e zinco permaneceram similares ao de pessoas sem nenhuma doença renal.

Wróbel, *et al.* [39] também empregaram ETAAS para averiguar em quais proteínas do soro humano o alumínio estava presente. Para isso, foi usada a eletroforese do tipo SDS-PAGE para separar as frações obtidas por cromatografia líquida de alta resolução. Neste trabalho, constatou-se que a transferrina foi a única proteína do soro que apresentava alumínio em sua estrutura (continha cerca de 90% do total de Al encontrado no soro humano). A presença da droga desferrioxamina (usada para seqüestrar Al em pacientes com disfunções renais) fazia com que o Al fosse parcialmente deslocado para proteínas com pequena massa molar.

2.5.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM FONTE DE PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE (ICP-MS)

A técnica de ICP-MS permite o acoplamento com diferentes técnicas de separação de biomoléculas (cromatografia líquida e gasosa, além de eletroforese capilar e em gel). Isto possibilita fazer a especiação de espécies metálicas e semimetálicas tornando-a uma importante ferramenta analítica. Os analitos de interesse podem estar complexados com proteínas de elevada massa molar, metalotioneínas, selenoproteínas, além de carboidratos [40].

A fonte de excitação desta técnica é um plasma indutivamente acoplado formado por argônio (ICP) usado para gerar íons que são, posteriormente, introduzidos no espectrômetro de massas. Estes íons são acelerados, separados magneticamente e, então, identificados de acordo com a razão massa/carga. Normalmente, no espectrômetro de ICP-MS é usado um detector quadrupolo, o qual pode ser composto por uma célula de reação/colisão usada para suprimir as interferências isobáricas e poliatômicas. Além disso, o detector de massas oferece a possibilidade de ser operado em modo de alta sensibilidade com baixa resolução ou em alta resolução e baixa sensibilidade. Com estas características, a técnica de ICP-MS é extensamente utilizada por ser possível fazer análise multielementar e por possuir grande seletividade e baixos limites de detecção (na ordem de ng L^{-1}). Os limites de detecção alcançados por esta técnica são melhores do que aqueles obtidos por ICP OES, além de serem melhores ou compatíveis com os alcançados por ETAAS [41]. Ela também possui a capacidade de quantificar, simultaneamente e em uma mesma amostra, constituintes majoritários e elementos em baixas concentrações. Por meio desta técnica é possível também monitorar as transformações das espécies químicas durante o tratamento da amostra ou mesmo na separação [3].

Apesar desta série de vantagens citadas, o uso da ICP-MS apresenta alguns problemas. Os inconvenientes estão relacionados à composição do solvente usado na separação por cromatografia líquida de alta resolução ou eletroforese capilar. Quantidades excessivas de solventes orgânicos podem resultar em instabilidade do plasma, além da formação de resíduos de carbono que podem se acumular em várias partes do equipamento como injetor e cones. Da mesma forma, alta salinidade na fase móvel da

cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica pode causar deposição de sais no nebulizador e nos cones, provocando perda de sensibilidade. A presença de matrizes complexas também pode ocasionar a supressão do sinal analítico devido a efeitos que desfocam o feixe de íons [42,43].

Na literatura, são encontrados vários exemplos onde o ICP-MS é empregado para a quantificação de íons metálicos ligados às proteínas, principalmente quando a separação destas biomoléculas é feita por eletroforese capilar. A utilização da eletroforese em gel ainda é pouco explorada para esta finalidade. Normalmente quando as proteínas são separadas por eletroforese em gel, é feito o acoplamento entre a técnica de ablação a laser e ICP-MS, a qual é denominada LA-ICP-MS (do inglês, *Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*). Esta técnica é baseada na retirada *in situ* dos analitos presentes na amostra com um feixe de *laser*. Estes analitos são conduzidos ao ICP por meio de um fluxo contínuo de argônio, sendo os mesmos detectados no espectrômetro de massas. Desta forma, obtém-se um eletroferograma onde é possível correlacionar a quantidade de um determinado elemento químico em função da sua posição no gel [44].

O trabalho pioneiro usando LA-ICP-MS foi desenvolvido por Neilsen, *et al.* [45]. Neste caso, as amostras de soro humano enriquecidas com cobalto foram submetidas à separação eletroforética em uma e em duas dimensões realizadas em gel de agarose. Em seguida, foi feita a análise dos géis usando *laser* interfaceado com o ICP-MS. Com este estudo foi possível identificar, com um limite de detecção de 0,29 ng, as principais proteínas do soro que continham cobalto.

As metaloproteínas contidas no citoplasma de *Escherichia coli* foram detectadas e quantificadas por Binet, *et al.* [46] por LA-ICP-MS. Para isso, foi realizada a separação das metaloproteínas usando eletroforese em gel nativo. Alguns destes microorganismos se desenvolveram sob a contaminação de Cd e Zn. Por este motivo, as concentrações destes íons metálicos foram determinadas. Nos microorganismos sob contaminação, foram verificados níveis mais elevados destes íons ao serem comparadas com as proteínas provenientes de microorganismos que cresceram sem a presença dos contaminantes.

Becker, *et al.* [47] detectaram com sucesso as intensidades relativas de Al, Cu, S, Si, P e Zn em 5 proteínas de cérebro humano usando LA-ICP-MS após separação por 2D-PAGE. Em um trabalho mais recente [48], os mesmos autores determinaram a

concentração de Cu, Fe e Zn em proteínas de cérebro humano de pessoas que apresentavam a doença de Alzheimer. Entretanto, neste trabalho, foi feito o enriquecimento das amostras com os isótopos dos elementos avaliados, antes das proteínas serem separadas por 2D-PAGE. A medida da razão isotópica obtida por LA-ICP-MS indicou que certas proteínas apresentavam uma composição isotópica natural de Cu, Fe e Zn, ou seja, estas proteínas já continham os íons metálicos avaliados. Desta forma, os autores concluíram que as mesmas permaneceram suficientemente estáveis durante as condições desnaturantes da separação eletroforética.

Lustig *et al.* [49] fizeram a detecção de prata em amostras de soro de rato e de seres humanos utilizando ICP-MS. A separação das proteínas nestas amostras foi feita por eletroforese bidimensional. Os autores estudaram a influência de vários componentes do tampão na manutenção da ligação prata-proteína. Eles constataram que a uréia na concentração de 9 mol L⁻¹ e SDS até 0,1% (m/v) não ocasionaram problemas nesse sentido. Entretanto, os reagentes CHAPS e DTT fizeram com que cerca de 90% das ligações entre o íon metálico e proteínas fossem rompidas.

Quando não se dispõe de um LA-ICP-MS é necessário fazer a decomposição do gel de poliacrilamida, onde estão inseridas as proteínas, para que os íons metálicos ligados às mesmas sejam quantificados. Por este motivo, alguns pontos relevantes a respeito da decomposição deste material serão tratados a seguir.

2.6. DECOMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS

As principais técnicas de espectrometria atômica usadas na análise de géis são designadas, primariamente, para a análise de amostras líquidas. Neste caso, a introdução da amostra é feita por nebulização, vaporização eletrotérmica ou por geração de vapor químico [50]. Desta forma, os analitos presentes nos géis devem ser primeiro solubilizados por digestão ácida. Entretanto, este processo é relativamente demorado e com muitas etapas que podem comprometer a análise.

Em geral, o processo de decomposição de amostras tem sido considerado como um dos pontos críticos na química analítica, principalmente quando tem-se como objetivo determinar elementos em baixas concentrações. Como já mencionado, ele pode não ser

eficiente, além de ser lento, dependendo da matriz da amostra ou do tipo de analito de interesse.

2.6.1. SISTEMA FECHADO COM AQUECIMENTO POR RADIAÇÃO MICROONDA

A decomposição de materiais sólidos, incluindo géis de poliacrilamida, pode ser realizada usando diferentes sistemas. Dentre eles, destaca-se a decomposição por microondas à alta pressão pelo fato de ser usado quantidades reduzidas de reagentes, ser executado em menor tempo, evitar a perda de espécies voláteis e possíveis problemas de contaminação, comparados com os procedimentos que utilizam aquecimento convencional. Neste tipo de decomposição, o recipiente usado deve ser transparente às microondas, quimicamente inerte, resistente ao ataque ácido e capaz de suportar altas temperaturas e pressões. Normalmente, os frascos ou copos de reação utilizados para esta finalidade são feitos de politetrafluoretileno (PTFE) ou perfluoralcóxi (PFA) [51].

Neste sistema, a radiação microondas, fornecida por um magnetron, afeta intensamente a rotação de dipolos elétricos e a condução iônica de líquidos, provocando um rápido aquecimento por meio da absorção direta da energia [51]. O aquecimento causa um aumento na pressão devido à evaporação dos ácidos empregados e da produção de gases durante a decomposição. Normalmente, são usados ácidos tais como HCl, HNO₃, HClO₄ e H₂SO₄. O aumento de pressão é benéfico pelo fato de aumentar o ponto de ebulição destes ácidos, aumentando, conseqüentemente, a capacidade de destruição da matriz da amostra. Geralmente, são usadas misturas de ácidos minerais concentrados para oxidar a matéria orgânica. O poder de oxidação depende da composição desta mistura e da adição de peróxido de hidrogênio que altera as condições do sistema [51,52]. Dentre os reagentes disponíveis, o ácido nítrico é o mais utilizado por possuir ponto de ebulição relativamente baixo, por ser obtido em pureza elevada (por intermédio de destilação abaixo do ponto de ebulição) e ser mais fácil de manusear. Ele diminui o risco de explosão comparado aos outros reagentes tornando a decomposição mais segura [53-55].

A utilização da radiação microondas na decomposição de amostras possibilitou avanços em termos de reprodutibilidade, rapidez e eficiência. Foi possível desenvolver equipamentos que permitiram um maior controle das condições de trabalho e,

conseqüentemente, maior segurança para o analista. Isso fez com que o processo de decomposição fosse aplicado a diversos tipos de amostras e analitos. A seguir, é apresentada uma variação desta tecnologia que amplia a sua utilização para outros tipos de amostras.

2.6.2. DECOMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS POR COMBUSTÃO ASSISTIDA POR RADIAÇÃO MICROONDA

No sistema de decomposição descrito anteriormente, como já mencionado, são usados ácidos concentrados. Estes ácidos, geralmente, não são compatíveis com diversas técnicas analíticas. Sendo assim, é necessário efetuar a sua remoção ou mesmo a sua diluição. Além disso, o uso de ácidos concentrados pode ocasionar concentrações elevadas de íons metálicos nos brancos analíticos devido a problemas de contaminação. Para contornar os problemas que envolvem o processo de decomposição, Flores *et al.* [56] propuseram um procedimento que aproveita as vantagens das técnicas de combustão, bem como, dos sistemas que utilizam as microondas. Tal processo é denominado decomposição por combustão assistida por microondas.

Para o desenvolvimento do sistema proposto, foi feita uma adaptação no forno de microondas disponível comercialmente (marca Anton Paar, modelo *Multiwave 3000*). Neste caso, colocou-se no interior do frasco do forno de microondas um dispositivo de quartzo utilizado como suporte para amostra. A configuração deste suporte, bem como as principais partes do sistema está apresentada na Figura 3.4.

Neste procedimento, a combustão de amostras orgânicas é feita em frascos fechados de quartzo pressurizados com oxigênio. A combustão é iniciada pela radiação microondas com auxílio de papel embebido em solução de nitrato de amônio. Uma vez iniciada a irradiação, são necessários aproximadamente 10 s para que a combustão da amostra seja efetuada. Destaca-se que o suporte de amostra usado permite que seja efetuada uma etapa de refluxo após a combustão. Desta forma, possíveis partículas que tenham ficado aderidas às paredes dos frascos são transferidas para a solução absorvedora, o que auxilia na decomposição. Além disso, o suporte protege o frasco da chama formada no processo. A temperatura alcançada durante a combustão é da ordem

de 1300°C. Esta temperatura assegura a completa destruição da matriz orgânica e até mesmo de compostos relativamente estáveis [57].

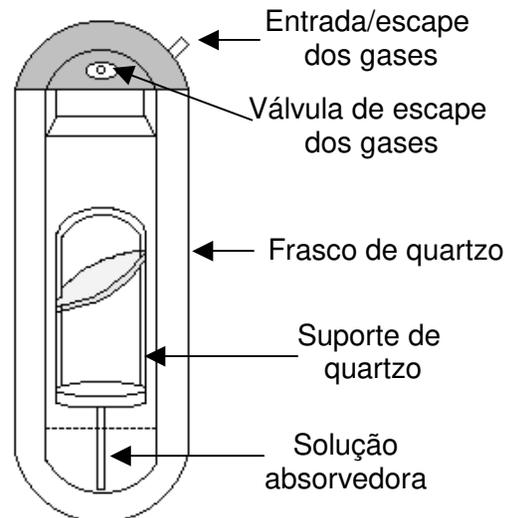


Figura 3.4 – Sistema de decomposição por combustão iniciada por microondas. Adaptado de Mesko, *et al.* [58].

Este sistema foi aplicado para a decomposição de amostras certificadas de fígado de boi e de leite em pó, sendo obtida uma boa recuperação dos analitos (resultados superiores a 96%) e baixo teor de carbono residual (em torno de 0,4%) [56,58]. Desta forma, é possível realizar, com eficácia e em poucos minutos, a digestão de amostras com elevados teores de matéria orgânica e com consumo mínimo de reagentes. Além disso, podem ser usadas soluções ácidas bastante diluídas para absorver os analitos de interesse, não sendo necessária efetuar a remoção do excesso de ácido, considerada uma etapa que apresenta uma grande fonte de erros devido à contaminação e possíveis perdas do analito.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

- Balança analítica, marca Mettler, modelo AE200;
- Chapa aquecedora, marca Marconi, modelo MA239;

- Destilador sub-ebulição, marca Marconi, modelo MA075;
- Espectrômetro de absorção atômica com chama, marca Perkin-Elmer, modelo AAnalyst 300;
- Espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica, marca Perkin-Elmer, modelo AAnalyst 600, equipado com corretor Zeeman longitudinal e auto-amostrador modelo AS-800;
- Espectrômetro de emissão atômica com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP OES), marca Perkin-Elmer, modelo Optima 4300 DV;
- Espectrômetro de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), marca Perkin Elmer, modelo ELAN DRC II Axial Field Technology;
- Espectrômetro de Fluorescência de raios-X com radiação síncrotron – SRXRF (disponível no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron);
- Forno de microondas tipo cavidade, marca Provecto Analítica, modelo DGT 100 *Plus*;
- Forno de microondas tipo cavidade, marca Anton Paar, modelo Multiwave 3000;
- Lâmpadas de catodo oco ou de descarga (EDL);
- Sistema desionizador Milli-Q, marca Millipore, modelo Quantum™ cartridge;
- Vidrarias apropriadas.

3.2. REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes empregados, como nos capítulos anteriores, são de alta pureza. Além disso, as soluções foram preparadas usando água desionizada. Especificamente para o preparo das soluções-padrão de várias espécies químicas, foi usado ácido nítrico sub-destilado 0,2% v/v nas determinações realizadas por ETAAS e 2% v/v nas quantificações por ICP OES.

- Ácido nítrico sub-destilado, HNO_3 (Merck);
- Dihidrogeno fosfato de amônio, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $\text{MM} = 115,03 \text{ g mol}^{-1}$ (Ecibra);
- Nitrato de paládio hidratado, $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MM} = 230,41 \text{ g mol}^{-1}$ (Aldrich);

- Nitrato de magnésio hexahidratado, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MM} = 256,41 \text{ g mol}^{-1}$ (Merck);
- Peróxido de hidrogênio, H_2O_2 30% (v/v) (Merck);
- Solução de lantânio 10% (m/v) preparada a partir de La_2O_3 , $\text{MM} = 325,8 \text{ g mol}^{-1}$ (Sigma), em 30% (v/v) de HCl.
- Soluções-padrão de várias espécies químicas (TecLab);

3.3. MAPEAMENTO DAS BANDAS DE PROTEÍNAS

As bandas de gel foram fixadas à uma plataforma de alumínio, utilizando fita adesiva. Esta plataforma se movimentava nas direções X, Y e Z por meio de um motor controlado por computador. Durante os experimentos, foram empregadas folhas de alumínio (espessura de 60 mm) para reduzir a energia de alguns componentes dos raios-X incidentes na amostra. Foi usado, também, um colimador de tântalo de 2 mm na entrada do detector, para se obter um feixe de radiação síncrotron de $230 \times 220 \mu\text{m}$. O detector utilizado para coletar o sinal de radiação proveniente da amostra foi de Ge.

A disposição dos instrumentos da linha de fluorescência de raios-X usadas na investigação das espécies químicas presentes nas amostras está mostrada na Figura 3.5.

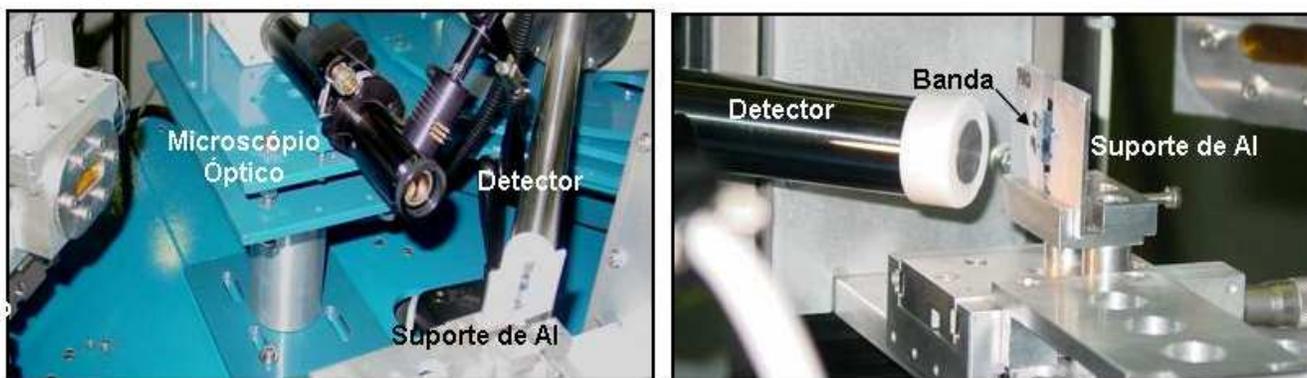


Figura 3.5 – Configuração do sistema utilizado para aquisição dos dados referentes ao mapeamento de espécies químicas presentes nas bandas de proteína.

Estabelecidas as condições de análise, as bandas de proteínas foram movimentadas ao longo do eixo X em um intervalo de 2 mm a partir do centro da amostra. Desta maneira, foram mapeados três pontos em cada uma delas. O tempo de coleta do espectro em cada ponto avaliado da amostra foi de 300 segundos. Os espectros adquiridos foram processados por meio do programa AXIL. Com este programa, foi possível 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 (por apresentar proporção constante na atmosfera).

3.4. TRATAMENTO DOS DADOS E SELEÇÃO DAS BANDAS PROTÉICAS USANDO REDE NEURAL KOHONEN

Devido ao grande número de bandas analisadas (43 bandas – provenientes de 4 condições de cultivo) e as várias espécies químicas identificadas por meio da análise de SRXRF, foi necessário o emprego de ferramenta quimiométrica para a interpretação dos dados. Dentre as diversas ferramentas quimiométricas disponíveis, foi escolhida a rede neural Kohonen por possui características apropriadas para selecionar amostras conforme já descrito.

Para a utilização da rede neural Kohonen foi necessário, primeiramente, efetuar o cálculo da média das intensidades de fluorescência de cada espécie química presente nos três pontos mapeados nas bandas. Em seguida, foi realizada a diferença entre os sinais das intensidades das espécies químicas das amostras e os sinais das intensidades das espécies químicas no branco analítico. Neste caso, o branco analítico selecionado foi a banda de lactato desidrogenase (35,0 kDa), uma proteína que compunha o padrão de massa molar.

O grupo de dados adquiridos foi organizado em uma matriz constituída por 43 amostras (bandas protéicas) e 11 variáveis (Ca, Cl, Co, Cr, Fe, K, Mn, Ni, S, Ti e Zn) detectadas por SRXRF. Cada linha desta matriz correspondia a uma amostra distinta. Durante o processo de classificação, realizado pelo algoritmo SOM, os dados foram auto-escalados para todas as variáveis. Para isso, as intensidades de fluorescência foram

centradas e divididas pelo desvio-padrão. Foram testadas várias arquiteturas para a rede a fim de se obter uma classificação satisfatória, ou seja, uma rede que tivesse um número apropriado de neurônios e que possibilitasse o agrupamento de amostras com características semelhantes.

A caixa de ferramentas do SOM versão 2.0 utilizada neste estudo está disponível no *site* <http://www.cis.hut.fi/projects/somtoolbox/> [59]. O ambiente computacional usado no processamento dos dados foi o Matlab® version 6.1.

3.5. DECOMPOSIÇÃO DAS BANDAS PROTÉICAS

3.5.1. COMBUSTÃO ASSISTIDA POR RADIAÇÃO MICROONDA

As bandas de proteínas selecionadas pela ferramenta quimiométrica Rede Neural Kohonen foram primeiramente recortadas de forma cuidadosa e secas à temperatura de aproximadamente 50°C até massa constante. Posteriormente, elas foram pesadas (ca. 3 mg) e colocadas no suporte de quartzo que continha um papel filtro (ca. 10 mg) umedecido com 35 µL de NH₄NO₃ a 6 mol L⁻¹ (iniciador da combustão). Este papel de filtro foi previamente tratado com solução de ácido nítrico a 10% (v/v) em banho de ultra-som durante 20 minutos a 60°C para remoção de possíveis contaminantes.

Após a montagem do sistema, os suportes foram inseridos dentro dos frascos de quartzo contendo 5 mL de solução de HNO₃ sub-destilado a 4 mol L⁻¹, que foi usada para absorver os analitos. Em seguida, os frascos foram fechados e colocados no rotor do forno de microondas para ser, então, efetuada a pressurização dos mesmos com oxigênio por 2 minutos, até atingir uma pressão em torno de 15 bar. Ao término deste procedimento, o rotor foi levado ao forno de microondas e o programa selecionado para a combustão das amostras foi iniciado. Este programa consistia em aplicar a potência máxima de 1400 W por 5 minutos. Neste intervalo, ocorria a combustão da amostra e também o refluxo da mesma.

As amostras foram resfriadas por 20 minutos aproveitando o sistema de refrigeração do equipamento. Em seguida, os frascos foram cuidadosamente abertos para

aliviar a pressão existente. As soluções resultantes foram aferidas a 12 mL com água desionizada em recipientes graduados de polipropileno. Os íons metálicos Cr, Mg, Ni, Pb e Zn foram quantificados por ICP-MS. Já a quantificação de Ba, K e Na foi realizada por ICP OES. As decomposições das amostras foram feitas em triplicata.

Este procedimento apresenta melhoras significativas em termos de agilidade ao ser comparado com o procedimento de decomposição assistida por microondas convencional (procedimento descrito a seguir). Neste caso, o resfriamento das amostras acontecia mais rapidamente, além de não haver a necessidade de eliminar o excesso de ácido nítrico, diminuindo, assim, o risco de contaminação.

3.5.2 DECOMPOSIÇÃO À ALTA PRESSÃO MEDIADA POR RADIAÇÃO MICROONDA

Algumas bandas de proteínas oriundas dos 7 tratamentos propostos para o cultivo dos girassóis também foram escolhidas para serem avaliadas quantitativamente. Para isso, primeiramente, elas foram secas à temperatura de *ca.* 50 °C até massa constante e pesadas. Em seguida, elas foram colocadas em frasco de Teflon[®] juntamente com 4 mL de HNO₃ sub-destilado e 1 mL de H₂O₂ a 30% (v/v). As amostras foram deixadas em pré-digestão por 1 hora. Depois deste período, os frascos foram fechados e colocados no suporte. O sistema montado foi introduzido no carrossel do forno de microondas.

O programa de decomposição empregado foi o mesmo sugerido por Verbi, *et al.* [24]. A programação consistia de 2 etapas descritas a seguir: (1) 400 W por 3 minutos e (2) 790 W por 5 minutos. Este programa foi executado duas vezes para garantir que as decomposições fossem eficientes, sendo o processo realizado em forno de microondas tipo cavidade (Provecto Analítica, modelo DGT 100 *Plus*). Ao término das decomposições, os frascos foram removidos do forno de microondas e colocados sob refrigeração até o resfriamento completo dos mesmos (*ca.* 2 h). Em seguida, os frascos foram cuidadosamente abertos e as soluções obtidas transferidas para béqueres. Foi realizada a evaporação lenta do excesso de ácido nítrico em chapa aquecedora a aproximadamente 60°C (até quase *secura*). Posteriormente, as amostras foram filtradas e os volumes finais das mesmas foram ajustados com solução de HNO₃ sub-destilado a 0,2% (v/v) em balão volumétrico de 5 mL. Todas as decomposições foram efetuadas em triplicata.

As concentrações dos íons metálicos Cd, Cu, Fe, Mn e Pb foram quantificadas por ETAAS. Nas determinações de Fe foi usado como modificador químico a solução de $Mg(NO_3)_2$ a 0,15% (m/v). Para o Mn foi empregada a solução de $Pd(NO_3)_2$ a 0,05% (m/v) e $Mg(NO_3)_2$ a 0,03% (m/v), com a mesma finalidade.

Especificamente, a quantificação do Ca foi feita utilizando a técnica de absorção atômica com chama (FAAS, do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometer*). Para isso, durante a diluição da amostra foi acrescentada solução de La_2O_3 a 10% (m/v), de modo a se obter uma concentração final de La de 0,1% (m/v).

Em todas as quantificações, as condições de análise foram às mesmas recomendadas pelo fabricante [60].

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. MAPEAMENTO DAS BANDAS COM SRXRF

As bandas protéicas das folhas usadas na análise exploratória realizada por SRXRF estão descritas na Tabela 3.1. Foi possível identificar várias espécies químicas por meio desta análise. Na Figura 3.6 são exemplificados os espectros de raios-X adquiridos. Pode-se perceber as linhas de emissão de diversos elementos, apesar da intensa radiação de fundo (entre 5 a 12 keV). Esta radiação de fundo é atribuída ao efeito Compton provocado pelo fato das proteínas estarem inseridas em um gel de poliacrilamida que continha elevados teores de água [6,21,24].

Tabela 3.1 – Identificação das amostras usadas na análise por SRXRF.

AMOSTRAS	IDENTIFICAÇÃO
Dez bandas de proteínas provenientes do tratamento com Zn(II)	A0(54,0)*, A1(46,0), A2(43,0), A3(38,0), A4(31,0), A5(27,5), A6(24,5), A7(22,0), A8(17,5) e A9(14,5)
Dez bandas de proteínas provenientes do tratamento com solução mista	B0(53,0), B1(48,0), B2(43,0), B3(34,0), B4(31,5), B5(27,5), B6(24,5), B7(22,5), B8(17,5) e B9(14,5)
Dez bandas de proteínas provenientes do cultivo em solo	C0(54,0), C1(48,0), C2(43,0), C3(38,0), C4(32,0), C5(27,5), C6(24,5), C7(22,5), C8(17,5) e C9(14,5)
Treze bandas de proteínas provenientes do cultivo em solo e vermicomposto	D0(53,0), D1(46,0), D2(42,0), D3(38,0), D4(34,0), D5(31,0), D6(27,5), D7(26,0), D8(25,0), D9(24,5), D10(22,5), D11(17,5) e D12(14,5)

* Valores em parênteses se referem a massa molar em kDa das proteínas que foram estimadas pelo programa *Gel-Pro Analyzer*, versão 3.1.

Com o procedimento descrito, foi verificado que o Ca, Co, K e Zn estavam ligados às proteínas na maioria das bandas estudadas. Por sua vez, as linhas de emissão dos elementos Cr, Fe e Ni foram observadas em menores intensidades e somente em algumas bandas. Já as espécies químicas Mn, S e Ti foram detectadas em proteínas de bandas específicas. De modo geral, estes resultados indicam que as espécies químicas distribuíram-se diferentemente nas proteínas.

As espécies metálicas (Ca, Co, Fe, Ni e Zn) encontradas nas proteínas das folhas são justamente aquelas mais abundantes nas metaloproteínas, segundo informações disponibilizadas por Shi, *et al.* [8]. Outros elementos como Na e Mg, mesmo sendo nutrientes das plantas e serem integrantes de algumas proteínas, não foram detectados por SRXRF. Isso aconteceu pelo fato de ter sido empregado o filtro de alumínio para proteger o detector, impedindo que as espécies com números atômicos menores que o Al fossem observadas.

A presença das outras espécies químicas se justifica pelas seguintes razões. O titânio foi identificado, provavelmente, devido à contaminação oriunda da fita adesiva usada para fixar as bandas. O cloro e o enxofre estavam presentes nas bandas por serem constituintes do gel e da própria proteína, respectivamente. Sendo assim, a detecção dos mesmos não apresenta a devida relevância nos estudos propostos.

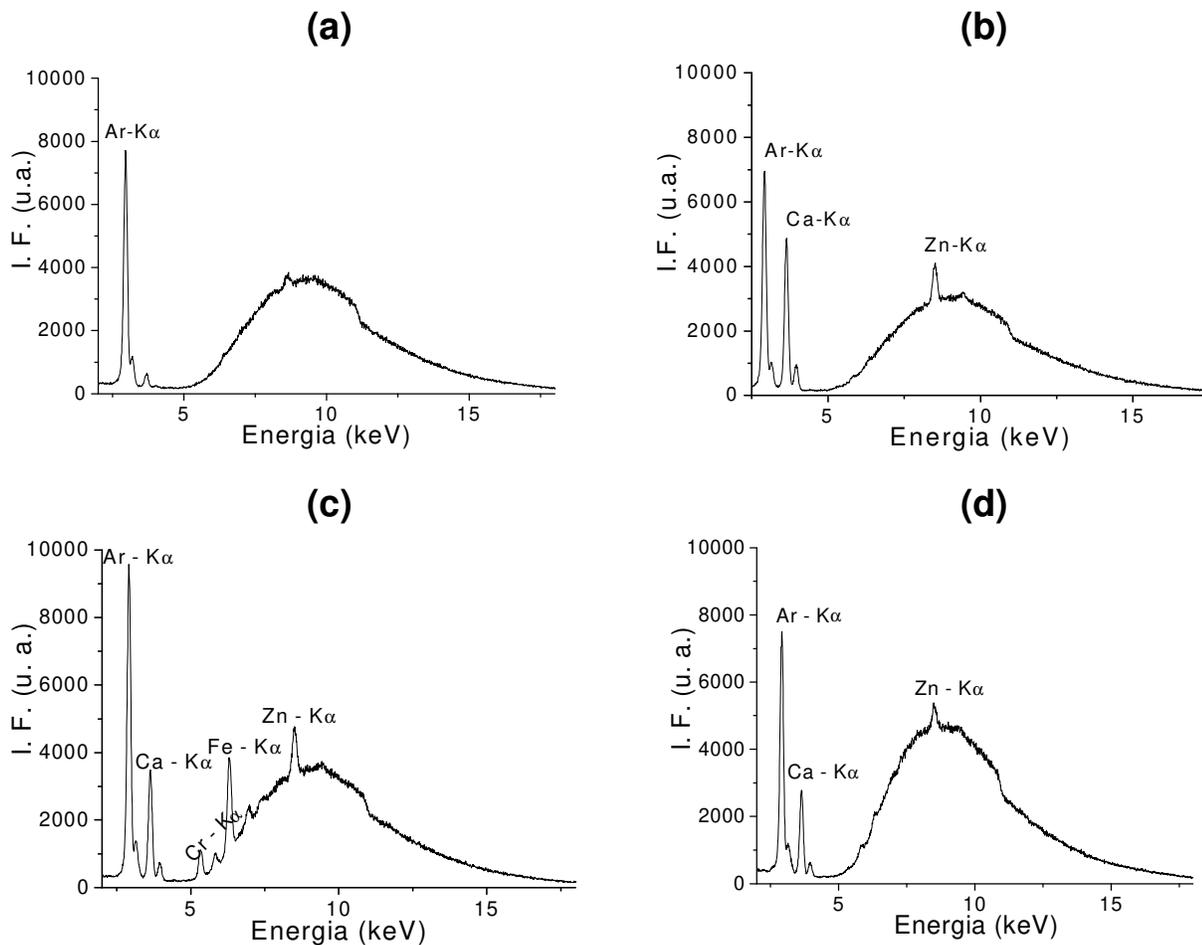


Figura 3.6 – Espectros de raios-X adquiridos na análise por SRXRF: (a) branco analítico, (b) proteína de 43 kDa do cultivo em solo, (c) proteína de mesma MM do tratamento com Zn(II) e (d) proteína de mesma MM do tratamento com a solução mista.

4.2. TRATAMENTO QUIMIOMÉTRICO DOS DADOS DE INTENSIDADES DE FLUORESCÊNCIA

Para o processo de classificação e interpretação dos dados das intensidades de fluorescência foi usada a rede neural Kohonen com um arranjo de 49 neurônios distribuídos na dimensão 7×7 . Este arranjo foi selecionado, visto que foi o melhor para agrupar as amostras que apresentavam características semelhantes. A matriz contendo os dados de entrada foi formada de acordo com as informações disponíveis na Tabela 3.2, onde cada linha desta matriz corresponde a uma amostra.

Tabela 3.2 – Intensidades de fluorescência (unidades arbitrárias) das bandas protéicas. Para a identificação das amostras, vide definição na Tabela 3.1.

AMOSTRAS	INTENSIDADES DE FLUORESCÊNCIA (u.a.)										
	Ca	Cl	Co	Cr	Fe	K	Mn	Ni	S	Ti	Zn
A0	-	12	43	-	12	39	-	-	-	-	6
A1	-	13	27	-	-	18	-	-	-	-	-
A2	121	12	28	33	140	21	-	-	-	-	86
A3	-	11	26	99	349	21	-	22	-	-	70
A4	358	9	25	-	-	28	-	-	-	-	118
A5	364	13	24	12	74	32	-	-	-	-	123
A6	379	13	31	-	-	36	-	-	-	-	162
A7	827	12	27	-	-	51	-	-	-	-	228
A8	1435	7	22	-	-	29	-	-	-	-	67
A9	1246	8	29	43	236	31	-	16	-	-	72
B0	18	36	20	-	-	53	-	-	-	-	62
B1	129	26	38	-	26	70	-	-	-	-	97
B2	133	27	39	-	32	68	-	-	-	-	135
B3	2	14	34	-	46	24	-	-	-	3	84
B4	-	14	27	-	67	36	-	-	-	9	93
B5	-	12	26	189	681	28	-	37	5	-	69
B6	-	14	33	-	5	12	-	-	-	-	-
B7	28	20	87	-	21	26	-	-	-	8	62
B8	-	15	241	-	146	14	-	-	-	21	146
B9	-	14	37	124	492	14	-	26	-	-	48
C0	375	12	36	-	53	19	-	-	-	-	158
C1	375	11	27	-	-	21	-	-	-	-	136
C2	480	11	27	-	-	18	-	-	-	-	158
C3	718	9	59	560	2000	23	43	120	-	-	235
C4	849	8	28	-	-	30	-	-	-	-	299
C5	746	8	24	-	-	27	-	-	-	-	242
C6	956	6	32	66	377	29	-	36	-	-	351
C7	591	9	27	-	-	19	-	-	-	-	222
C8	708	12	31	-	-	23	-	-	-	-	243
C9	730	12	42	58	380	27	-	28	-	-	232
D0	-	13	30	-	-	10	-	-	-	-	5
D1	-	16	35	-	-	18	-	-	-	-	23
D2	55	14	34	185	647	20	-	38	-	-	41
D3	-	13	37	-	-	16	-	-	-	-	8
D4	-	12	31	-	-	12	-	-	-	-	-
D5	152	10	33	227	805	23	3	48	-	-	69
D6	-	13	40	-	-	12	-	-	-	-	-
D7	-	13	39	-	-	14	-	-	-	-	-
D8	-	17	53	-	5	20	-	-	-	-	-
D9	-	15	33	21	129	18	-	-	-	-	-
D10	-	15	54	-	6	21	-	-	-	1	-
D11	-	15	44	-	-	16	-	-	-	-	-
D12	-	14	35	19	110	14	-	-	-	-	-

- resultados menores que o branco analítico ou não detectados.

O mapa bidimensional gerado abrangendo as 43 amostras correlacionadas com as 11 variáveis (espécies químicas detectadas) está apresentado na Figura 3.7. Algumas amostras provenientes de um mesmo tratamento (identificadas por letra iguais) ficaram localizadas em um único neurônio ou em neurônios muito próximos. Este fato, como já mencionado, indica que as amostras não apresentam diferenças significativas para a característica estudada.

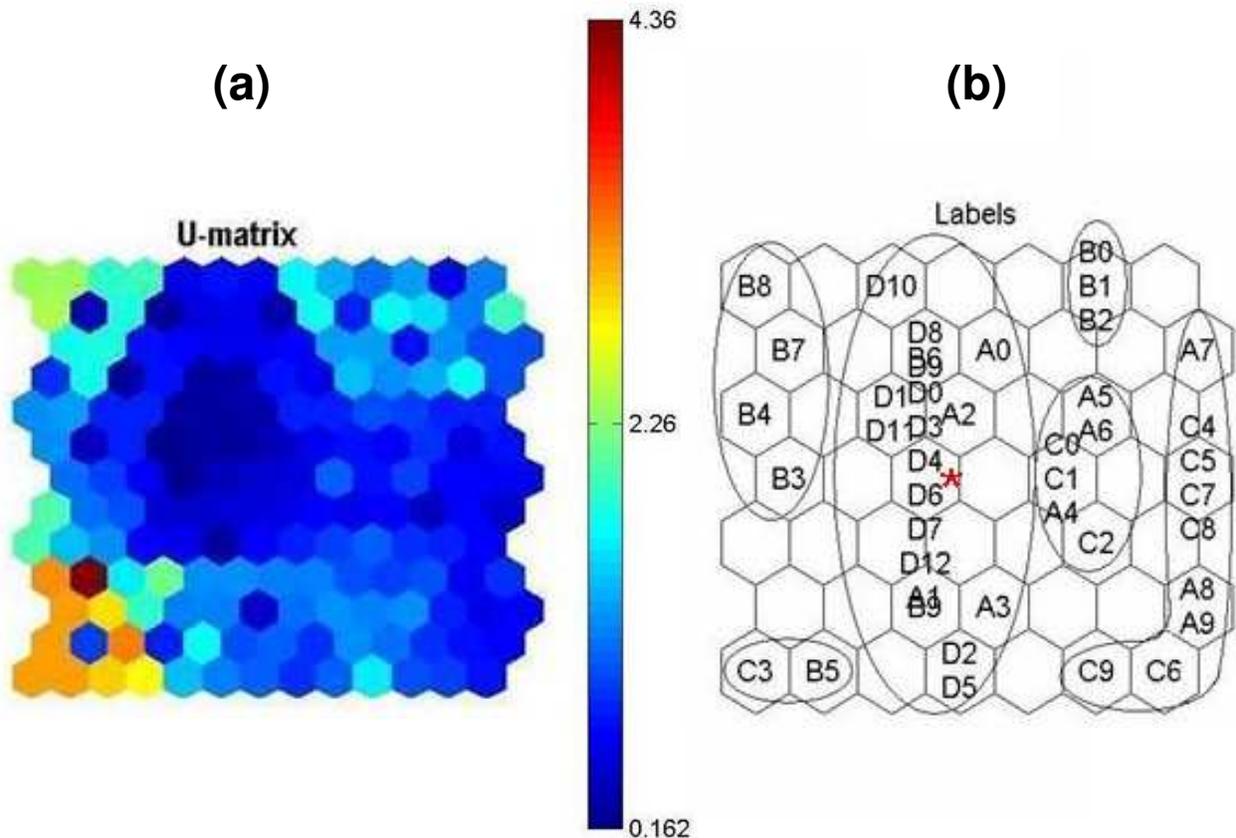


Figura 3.7 – Bandas de proteínas reduzidas ao espaço bidimensional. As amostras são classificadas em 6 grupos. (a) Matriz U – reúne a influência de todas as variáveis do sistema e (b) *Labels* – os quais apresentam os conjuntos de amostras. A barra contendo escala de cores apresenta as intensidades de fluorescência auto-escaladas.

Por intermédio da utilização da rede neural Kohonen, foi verificada a separação das amostras em seis grupos distintos. Estes grupos se formaram de acordo com as localizações das amostras nos neurônios, as distâncias entre os mesmos, e a correlação dos pesos destes neurônios e das amostras. A Figura 3.8 mostra os planos fornecidos pelo algoritmo SOM para cada espécie química. Considerando simultaneamente as Figuras 3.7 e 3.8, consegue-se relacionar cada banda com as espécies químicas

determinadas. Para isso, basta observar em qual neurônio da rede a amostra está localizada (Figura 3.7(b)) e identificar a mesma posição nos mapas intermediários (Figura 3.8). Desta forma, é possível notar as intensidades de fluorescência da banda protéica para todas as espécies químicas.

Um agrupamento importante, por conter grande parte das amostras, pode ser observado na parte central do mapa (Figura 3.7(b)) onde estão inseridas todas as bandas de proteínas das folhas dos girassóis cultivados em solo e vermicomposto (identificadas pela letra D) e algumas oriundas do tratamento com Zn(II) (A) e com a solução mista (B). Ressalta-se, ainda, que a maioria das amostras do plantio em solo e vermicomposto ficou localizada em um mesmo neurônio (marcado com um asterisco em vermelho), mostrando a grande similaridade entre as medidas para estas amostras.

Três bandas protéicas do tratamento com a solução mista (B0, B1 e B2) com elevadas massas molares (53, 48 e 43 kDa, respectivamente) estavam posicionadas em um mesmo neurônio e separadas do restante das bandas provenientes do mesmo tratamento. Esta separação pode ser atribuída às intensidades acentuadas dos elementos Cl e K. Uma outra parte das amostras deste cultivo (B3, B4, B7 e B8) foi reunida pela presença de Ti e Co.

Um grupo bastante interessante foi constituído pelas amostras B5 e C3. Estas amostras apresentaram intensidades significativas para as espécies químicas Cr, Mn, Fe e Ni, além de intensidade atenuada para o Zn.

O restante das amostras do tratamento com Zn(II) e aquelas oriundas do cultivo em solo (exceto C3) ficaram aglomeradas em dois grupos. O menor grupo foi formado por bandas de proteínas de elevada massa molar das amostras de solo (C0, C1 e C2) e por bandas com massa molar intermediária para as amostras contaminadas com Zn (A5 e A6). O outro grupo foi composto por proteínas de pequena massa molar das amostras do tratamento com Zn(II) (A7, A8 e A9) e das amostras originadas do plantio com solo (C4 a C9). Em geral, estas amostras apresentaram altas intensidades de fluorescência para o Ca e o Zn. Um resultado bastante coerente, visto que estes íons metálicos são importantes nutrientes das plantas e podem favorecer a formação das metaloproteínas.

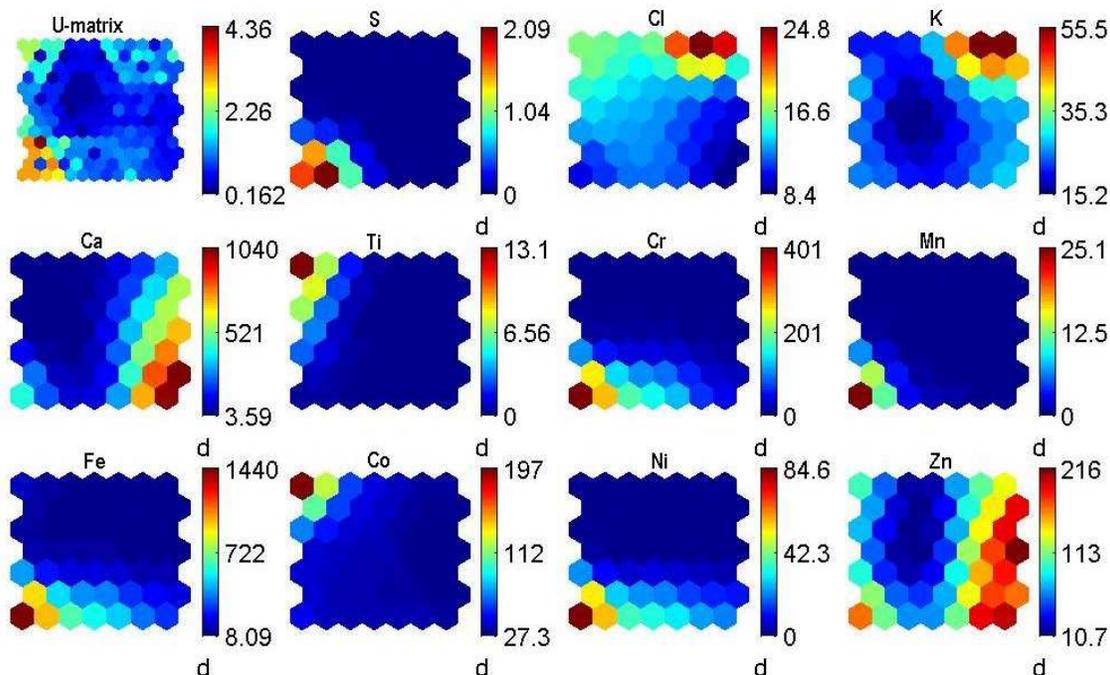


Figura 3.8 – Mapas dos componentes das bandas de proteínas. Cada mapa apresenta a intensidade de fluorescência de uma espécie química detectada por SRXRF. A barra contendo escala de cores apresenta as intensidades de fluorescência auto-escaladas.

A formação dos seis grupos pela análise do mapa gerado pela rede neural Kohonen (Figura 3.7) permitiu selecionar algumas bandas de proteínas com potencialidades para serem avaliadas quantitativamente, a fim de investigar a afinidade das proteínas por íons metálicos específicos. Dentre as bandas com altas intensidades de fluorescência foram escolhidas aquelas onde, preferencialmente, a quantidade de proteína entre os tratamentos foi alterada, segundo informações apresentadas na Tabela 2.2.

As bandas protéicas A9 e C9 (proteínas de 14,5 kDa procedentes do tratamento com Zn(II) e solo, respectivamente) foram escolhidas por apresentarem altas intensidades de fluorescência para o Ca e o Zn e serem menos intensas quando comparadas com a banda protéica de massa molar semelhante proveniente do cultivo com solo e vermicomposto. As amostras B3 e D4 (proteínas de 34 kDa originárias do tratamento com a solução mista e solo e vermicomposto, respectivamente) também foram selecionadas. Neste caso, devido ao fato de não terem sido identificadas proteínas com esta massa molar nas folhas das plantas cultivadas em solo e nas plantas contaminadas com Zn(II). As amostras B5 (27 kDa do tratamento com Zn(II)) e C3 (38 kDa do tratamento com solo)

também foram avaliadas quantitativamente por terem sido as únicas onde foram observadas intensidades significativas para os elementos Cr, Fe, Mn e Ni.

Neste conjunto de bandas protéicas foram realizados estudos a respeito das concentrações de íons metálicos, e, conseqüentemente, da formação e preservação das metaloproteínas de acordo com o substrato empregado no desenvolvimento dos girassóis. A fim de comparação, as bandas A3, A5, B9, C5, D3, D6 e D12 também foram avaliadas quantitativamente, por possuírem massas molares semelhantes àquelas selecionadas.

4.3. CONCENTRAÇÕES DE ÍONS METÁLICOS NAS BANDAS DE PROTEÍNAS

4.3.1. DECOMPOSIÇÃO USANDO COMBUSTÃO ASSISTIDA POR RADIAÇÃO MICROONDA

No conjunto de bandas de proteínas escolhido depois dos dados da análise de fluorescência de raios-X serem classificados usando a Rede Neural Kohonen foram realizados estudos relacionados às concentrações de íons metálicos. Também foram avaliados os comportamentos de algumas bandas com massa molar semelhante, provenientes dos outros tratamentos. Para isso, após a decomposição das amostras utilizando o sistema por combustão assistida por microondas, foi feita a quantificação dos íons metálicos nas soluções resultantes por meio das técnicas de ICP-MS ou ICP OES. Devido as características multielementares das técnicas de quantificação adotadas nesta etapa, foram investigados outros elementos não detectados na análise por SRXRF. Os resultados obtidos estão mostrados nas Tabelas 3.3 e 3.4.

Os valores expressos nestas Tabelas foram calculados em termos da massa de proteína presente em cada banda. Desta forma, primeiramente, foi efetuada a diferença entre as concentrações das amostras e do branco analítico. Em seguida, o valor resultante desta diferença foi multiplicado pela massa de proteína. Com este procedimento, normalizou-se a variação da quantidade de proteína de acordo com o tratamento empregado no cultivo dos girassóis. O branco analítico escolhido foi o mesmo adotado na

análise de fluorescência de raios-X (proteína de 35 kDa do padrão protéico, lactato desidrogenase). Portanto, os dados referentes à quantidade de íon metálico em cada banda são relativos a proteína lactato desidrogenase.

Tabela 3.3 – Quantidade de íons metálicos (média±desvio padrão, n=3) nas bandas de proteínas de folhas de girassóis quantificados por ICP-MS.

IDENTIFICAÇÃO	AMOSTRA	MASSA (pg)				
		Cr	Mg	Ni	Pb	Zn
	38 kDa					
C3	<u>Solo</u> (0,7)*	-	76±10	21±4	-	45±5
D3	Solo+Verm. (4,6)	-	920±83	69±9	23±4	1432±189
A3	Zn(II) (1,7)	-	129±20	-	-	615±110
	34 kDa					
D4	<u>Solo+Verm.</u> (6,7)	-	-	-	-	395±60
B3	<u>Solução Mista</u> (2,8)	4,9±0,6	-	-	-	-
	27,5 kDa					
C5	Solo (9,5)	-	1169±209	59±9	-	808±95
D6	Solo+Verm. (10,0)	-	-	63±1	-	-
A5	Zn(II) (6,0)	-	-	-	-	-
B5	<u>Solução Mista</u> (8,4)	6±1	-	88±7	-	-
	14,5 kDa					
C9	<u>Solo</u> (5,7)	-	-	-	-	-
D12	Solo+Verm. (11)	-	-	-	-	529±76
A9	<u>Zn(II)</u> (3,9)	-	-	47±7	7,4±0,8	66±12
B9	Solução Mista (5,6)	16±2	-	-	20±3	-

* massa de proteína em µg. Valores obtidos usando o programa *Gel-Pro Analyzer*, versão 3.1.

- amostras em concentrações menores que o branco analítico.

As amostras sublinhadas foram selecionadas por meio da Rede Neural Kohonen.

Tabela 3.4 – Quantidade de íons metálicos (média±desvio, n=3) nas bandas de proteínas quantificados por meio da técnica de ICP OES.

IDENTIFICAÇÃO	AMOSTRA	MASSA (pg)		
		Ba	K	Na
	38 kDa			
C3	<u>Solo</u> (0,7)*	-	-	229±24
D3	Solo+Verm. (4,6)	593±92	6601±1239	2337±400
A3	Zn(II) (1,7)	46±7	479±31	491±82
	34 kDa			
D4	<u>Solo+Verm.</u> (6,7)	98±4	369±20	-
B3	<u>Solução Mista</u> (2,8)	-	392±70	364±73
	27,5 kDa			
C5	Solo (9,5)	-	3126±48	3515±665
D6	Solo+Verm. (10,0)	-	3190±210	4180±140
A5	Zn(II) (6,0)	-	-	-
B5	<u>Solução Mista</u> (8,4)	-	-	-
	14,5 kDa			
C9	<u>Solo</u> (5,7)	-	182±34	547±57
D12	Solo+Verm. (11)	-	16729±3456	7463±810
A9	Zn(II) (3,9)	-	121±19	62±12
B9	<u>Solução Mista</u> (5,6)	-	118±22	-

* As características desta Tabela são as mesmas descritas na Tabela 3.3.

Os limites de detecção e quantificação dos íons metálicos nas determinações realizadas nestas análises estão mostrados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) obtidos experimentalmente nas amostras de bandas protéicas usando as técnicas de ICP-MS e ICP OES.

	Ba	Cr	K	Mg	Na	Ni	Pb	Zn
LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	2,6	1,1	33	393	5,8	5	1,6	11
LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	8,6	3,5	111	1309	19,4	18	5,4	36

A partir dos dados apresentados nas Tabelas 3.3 e 3.4 foi possível constatar que a quantidade de íons metálicos geralmente se altera dependendo da condição de cultivo, visto que bandas de proteínas com massas molares semelhantes apresentaram comportamentos diferentes. Normalmente, as proteínas dos girassóis oriundas do tratamento solo e vermicomposto apresentaram maiores níveis de íons metálicos. Para exemplificar esta tendência, pode ser citada a proteína de 38 kDa proveniente de tratamento distinto (identificada na rede neural Kohonen como **A3**, **C3** e **D3**). Neste caso, notou-se que tanto o tratamento com Zn(II) (**A3**) como o cultivo somente em solo (**C3**) fez com que houvesse uma diminuição acentuada, principalmente nos teores de Ba, K, Mg, Na e Zn ao ser confrontado com os teores encontrados na banda do tratamento com solo e vermicomposto (**D3**).

Por outro lado, nas bandas de proteínas com 34 kDa (**B3** e **D4**), observou-se que a contaminação com a solução mista não alterou os níveis de íons metálicos, exceto para Ba, Na e Zn. No entanto, proteínas de mesma massa molar não foram sintetizadas nas folhas originárias dos tratamentos com Zn(II), bem como naquelas do plantio somente com solo (vide Tabela 2.2).

Os dados expostos nas Tabelas 3.3 e 3.4 não podem ser comparados diretamente com a literatura por se tratar de um estudo inédito. No entanto, buscou-se demonstrar que os mesmos possuem coerência. Para isso, foi feito o cálculo em termos do número de moléculas de proteínas presente na banda e o número de átomos da espécie metálica em questão para obter a relação entre os mesmos.

A estimativa da relação entre o número de moléculas de proteínas e o número de átomos da espécie metálica foi realizada como descrito a seguir. A banda de 38 kDa proveniente do plantio em solo e vermicomposto (**D3**) e o elemento zinco foi considerado como exemplo.

1) Determinação da massa da molécula de proteína.

$$\begin{array}{l} 1 \text{ Da} \text{ ————— } 1,661 \times 10^{-24} \text{ g} \\ 38000 \text{ Da} \text{ ————— } X \text{ g} \\ X = 6,31 \times 10^{-20} \text{ g} \end{array}$$

2) Determinação do número de moléculas de proteína na banda.

$$\begin{aligned} 1 \text{ molécula} & \text{ — } 6,31 \times 10^{-20} \text{ g} \\ X & \text{ — } 4,6 \times 10^{-6} \text{ g} \\ X & = 7,29 \times 10^{13} \text{ moléculas} \end{aligned}$$

3) Determinação do número de átomos da espécie metálica.

$$\begin{aligned} 65,38 \text{ g} & \text{ — } 6,022 \times 10^{23} \text{ átomos} \\ 1432 \times 10^{-12} \text{ g} & \text{ — } X \\ X & = 1,32 \times 10^{13} \text{ átomos de zinco} \end{aligned}$$

4) Porcentagem de molécula de proteínas com átomos da espécie metálica em sua estrutura.

$$\begin{aligned} 7,29 \times 10^{13} \text{ moléculas} & \text{ — } 100\% \\ 1,32 \times 10^{13} \text{ átomos} & \text{ — } X \\ X & = 18\% \end{aligned}$$

Por analogia, nesta mesma banda, foi constatado que aproximadamente 4%, 140%, 31%, 84% do número de moléculas de proteínas presente na banda continha pelo menos um átomo de Ba, K, Mg e Na, respectivamente. Já na banda de 14,5 kDa do mesmo tratamento (**D12**), ao ser considerado somente os elementos químicos majoritários, foi observado que *ca.* 56%, 42% e 1% das moléculas de proteína (total de $4,57 \times 10^{14}$ moléculas) apresentavam pelo menos um átomo de K, Na e Zn, respectivamente. Estas estimativas são aceitáveis, visto que, uma única metaloproteína ou *metal-binding* proteína pode apresentar vários centros ativos formados por átomos de íons metálicos diferentes, ou, ainda, mais de um átomo de um mesmo elemento químico [61].

As proteínas avaliadas em relação à concentração de íons metálicos também podem ser correlacionadas com informações referentes às estruturas primárias de proteínas disponíveis em bancos de dados especializados.

Segundo pesquisas realizadas no banco de dados Swiss-Prot [62], no girassol existe uma proteína denominada quinona oxirredutase com massa molar de 33,2 kDa, que está envolvida na produção de lignina. Esta proteína apresenta como característica a capacidade de ligar-se com Zn(II). Ao ser realizada a separação das proteínas presentes

nas folhas de girassol, foram observadas bandas protéicas (34 kDa – **B3** e **D4**) com massa molar semelhante a quinona oxirredutase. Entretanto, somente foi detectado zinco na banda protéica proveniente do tratamento com solo e vermicomposto (**D4**). Isto é um indicativo que a quinona oxirredutase teve a sua quantidade reduzida no tratamento com a solução mista (**B3**).

Por outro lado, a metaloproteína L-ascorbato peroxidase com massa molar de 27,4 kDa, encontrada em folhas de *Arabidopsis Thaliana*, possui como cofatores um grupo heme (que contém íons ferro), um íon Ca(II) ou K(I) por unidade. Esta proteína tem como função remover o peróxido de hidrogênio dos cloroplastos e do citosol de plantas superiores [62]. Nas folhas de girassol foi constatada uma banda de proteína (27,5 kDa – **A5**, **B5**, **C5** e **D6**) com massa molar semelhante a da L-ascorbato peroxidase. Na banda proveniente do tratamento com Zn(II) (**A5**) e do tratamento com a solução mista (**B5**) não foi detectado íons do elemento potássio (vide Tabela 3.4). Por este motivo, tem-se um forte indício que o nível desta metaloproteína tenha sido modificado por causa da presença excessiva de íons metálicos.

4.3.2. DECOMPOSIÇÃO À ALTA PRESSÃO EM FORNO DE MICROONDA

Foi também realizado alguns testes nas bandas protéicas das folhas oriundas dos tratamentos Cd(II), Cu(II) e Pb(II). Desta forma, buscou-se verificar o comportamento das proteínas em termos de íons metálicos frente a estas contaminações. Para isso, foram escolhidas aleatoriamente algumas bandas de massas molares variadas destes tratamentos, além de algumas amostras originárias dos outros 4 tratamentos já avaliados.

Neste novo conjunto, as bandas protéicas foram decompostas em forno de microondas. Após a decomposição, optou-se por quantificar íons metálicos diferentes daqueles estudados na outra decomposição. Nesta análise, foram selecionados os íons Cd, Cu e Pb (por terem sido adicionados aos substratos) e os íons Ca, Fe e Mn (por terem sido detectados na análise de fluorescência de raios- X). Os resultados obtidos estão disponíveis na Tabela 3.6. Os dados disponíveis na referida Tabela foram calculados da mesma forma descrita no item 4.3.1. Primeiramente, efetuou-se a diferença entre as concentrações das amostras e do branco analítico. Em seguida, o valor obtido foi multiplicado pela massa de proteína presente em cada banda.

O cálcio e o ferro foram as espécies químicas avaliadas que apresentaram maiores níveis de concentração. Além disso, estes elementos estavam presentes em quase todas as bandas investigadas. Isto demonstra a grande relevância que os mesmos desempenham nos processos metabólicos e bioquímicos realizados pelas plantas.

Com os dados apresentados na Tabela 3.6, verificou-se, novamente, que diferentes quantidades de íons metálicos estavam presentes, dependendo da massa molar da banda protéica e/ou da condição utilizada durante o cultivo. Esta tendência já tinha sido observada nas bandas selecionadas pela ferramenta quimiométrica. As bandas de 34 e 14,5 kDa exemplificam a variação nos teores de íons metálicos nas proteínas de acordo com tratamentos distintos. A contaminação induziu a uma menor quantidade de íons metálicos nas proteínas.

Tabela 3.6 – Quantidade de íons metálicos nas bandas de proteínas provenientes de folhas de girassóis submetidas a diferentes condições de cultivo.

AMOSTRA	MASSA (pg)					
	Ca	Cd	Cu	Fe	Mn	Pb
38 kDa						
Cu(II) (3,1)*	18166±1007	1,4±0,1	11±2	460±93	49±3	6±1
Solo (0,7)	-	-	-	-	-	-
34 kDa						
Pb(II) (3,9)	-	-	23±4	238±35	14±2	6±1
Solo+Verm. (6,7)	12295±2245	9±2	47±13	1514±94	302±67	-
17,5 kDa						
Cd(II) (2,9)	7949±1401	-	17±2	508±66	-	-
Cu(II) (6,1)	14567±2367	-	25±1	543±67	64±5	10±2
Solução Mista (4,0)	7480±872	3±1	17±3	276±48	26±4	11±1
14,5 kDa						
Cd(II) (6,9)	-	-	-	-	-	-
Cu(II) (6,7)	-	-	-	128±40	-	-
Solo+Verm. (11)	-	10±2	39±3	3218±680	58±9	-

* massa de proteína em µg. Valores obtidos usando o programa *Gel-Pro Analyzer*, versão 3.1.

- amostras com concentrações menores que o branco analítico.

Os limites de detecção e quantificação dos íons metálicos nas determinações realizadas nesta análise estão apresentados na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 – Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) obtidos experimentalmente nas amostras de bandas protéicas usando as técnicas de ETAAS e FAAS (usado para quantificar o Ca).

	Ca	Cd	Cu	Fe	Mn	Pb
LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	12	0,01	0,12	0,3	0,09	0,4
LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	39	0,03	0,41	1,1	0,31	1,4

Uma consideração importante sobre os íons metálicos ligados às proteínas é que em ambas as quantificações os desvios padrões obtidos foram relativamente altos (ca. de 20%). Entretanto, ressalta-se que este tipo de amostra apresenta elevada heterogeneidade. Segundo trabalho de Verbi *et al.* [24] as espécies metálicas distribuem-se diferentemente ao longo de uma mesma banda de proteína gerando, desta forma, os níveis de erros observados. Existem problemas em se recortar, de forma reprodutível, a banda onde está inserida a proteína, por mais cuidadosa que seja executada esta operação, visto que, em uma mesma banda podem estar contidas proteínas diferentes de mesma massa molar.

Os dados dispostos nas Tabelas 3.3, 3.4 e 3.6 não podem ser relacionados diretamente com as informações adquiridas por meio da classificação utilizando a rede neural Kohonen. Esta classificação foi baseada somente nas intensidades de fluorescência de raios-X avaliadas em três pontos específicos da banda. Portanto, não foi considerada a variação de massa de proteína em cada amostra. Mesmo assim, de modo geral, existe concordância entre os dados qualitativos e quantitativos.

5. CONCLUSÕES PARCIAIS

Foi alcançado um panorama das espécies químicas que se ligaram às proteínas fazendo-se o mapeamento das bandas com fluorescência de raios-X. Neste caso, foi

ainda verificado que estas espécies distribuem-se de modo distinto e que a formação das metaloproteínas é influenciada pelo substrato onde o girassol se desenvolve.

O uso da ferramenta quimiométrica (rede neural Kohonen) foi útil para classificar e interpretar os dados de fluorescência. Isto possibilitou eleger as bandas que foram usadas para as investigações quantitativas em termos de íons metálicos. Desta forma, foi possível diminuir substancialmente o espaço amostral, focando somente nas bandas com potencialidades para serem estudadas.

Ao serem realizadas as avaliações das metaloproteínas em algumas bandas, foram observadas variações nos níveis dos íons metálicos dependendo da condição de cultivo. Estes dados foram adquiridos independentemente do processo de decomposição adotado, bem como da técnica de quantificação empregada. Geralmente, as proteínas provenientes de plantas desenvolvidas em solo e vermicomposto sem contaminação apresentaram níveis mais elevados de íons metálicos do que proteínas de mesmas massas molares oriundas dos outros tratamentos. Isso permitiu verificar que a formação, ou mesmo a permanência das metaloproteínas fosse dificultada pela contaminação. Sugere-se que estas metaloproteínas tenham participado de mecanismos para combater o estresse oxidativo devido a elevados níveis de espécies reativas de oxigênio provocado pela contaminação por íons metálicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Haraguchi, H., *Metallomics as integrated biometal science*. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 19(2004)5.
- [2] Szpunar, J., *Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics*. **Analyst**, 130(2005)442.
- [3] Jakubowski, N., Lobiski, R. e Moens, L., *Metallobiomolecules. The basis of life, the challenge of atomic spectroscopy*, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 19(2004)1.
- [4] Szpunar, J., *Metallomics: a new frontier in analytical chemistry*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 378(2004)54.

- [5] Gomez-Ariza, J. L., Garcia-Barrera, T., Lorenzo, F. e Arias, A., *Analytical characterization of bioactive metal species in the cellular domain (metallomics) to simplify environmental and biological proteomics*. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, 85(2005)225.
- [6] Gao, Y., Chen, C., Zhang, P., Chai, Z., He, W. e Huang, Y., *Detection of metalloproteins in human liver cytosol by synchrotron radiation X-ray fluorescence after sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*. **Analytica Chimica Acta**, 485(2003)131.
- [7] Banci, L., *Molecular dynamics simulations of metalloproteins*. **Current Opinion in Chemical Biology**, 7(2003)143.
- [8] Shi, W., Zhan, C., Ignatov, A., Manjasetty, B. A., Marinkovic, N., Sullivan, M., Huang, R. e Chance, M. R., *Metalloproteomics: High-Throughput Structural and Functional Annotation of Proteins in Structural Genomics*. **Structure**, 13(2005)1473.
- [9] Reddy, A. S. N. *Calcium: Silver bullet in signaling*. **Plant Science**, 160(2001)381.
- [10] Hepler, P. K. e Wayne, R. O., *Calcium and plant development*. **Annul Review Plant Physiology**, 36(1985)397.
- [11] Kennedy L. M., e Gibney, B. R., *Metalloprotein and redox protein design*. **Current Opinion in Structural Biology**, 11(2001)485.
- [12] Liu, C. e Xu, H., *The metal site as a template for metalloprotein structure formation*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 88(2002)77.
- [13] Szpunar, J., *Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques*. **Analyst**, 125(2000)963.
- [14] Garcia, J. S, Magalhães, C. S. e Arruda, M. A. Z., *Trends in metal-binding and metalloprotein analysis*. **Talanta**, 69(2006)1.
- [15] Herald, V. L., Heazlewood, J. L., Day, D. A. e Millar, A. H., *Proteomic identification of divalent metal cation binding proteins in plant mitochondria*. **Federation of European Biochemical Society Letters**, 537(2003)96.
- [16] Hay, R. W., **Bio-Inorganic Chemistry**, Ed. John Wiley & Sons, New York, USA, 1987.
- [17] Palma, J. M., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Romero-Puertas, M. C., McCarthy, I. e del Río, L. A., *Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes*. **Plant Physiology and Biochemistry**, 40(2002)521.
- [18] Butcher, H., Kennette, W., Collins O., Demoor, J. e Koropatnick, J., *A sensitive time-resolved fluorescent immunoassay for metallothionein protein*. **Journal of Immunological Methods**, 272(2003)247.

- [19] Souza, G. G. B., Santos, A. C. F., Rocco, M. L. M., Lucas, C. A., Boechat-Roberty, H. M. e Brito, A. N., *Fragmentação de moléculas pela luz Síncrotron e por elétrons rápidos*. **Química Nova**, 3(2001)311.
- [20] Lakowicz, J. R., **Principles of Fluorescence Spectrometry**, Kluwer Academic, New York, USA, 1999.
- [21] Gao, Y., Chen C., Chai, Z., Zhao, J., Liu, J., Zhang, P. e 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**, 127(2002)1700.
- [22] Gao, Y., Liu, Y., Chen, C., Li, B., He, W., Huang, Y. e Chai, Z., *Combination of synchrotron radiation X-ray fluorescence with isoelectric focusing for study of metalloprotein distribution in cytosol of hepatocellular carcinoma and surrounding normal tissues*. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 20(2005)473.
- [23] Weseloh, G., Kühbacher, M., Bertelsmann, H., Özaslan, M., Kyriakopoulos, A., Knöchel, A. e Behne, D., *Analysis of metal-containing proteins by gel electrophoresis and synchrotron radiation X-ray fluorescence*. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, 259(2004)473.
- [24] Verbi, F.M., Arruda, S. C.C., Rodríguez, A. P. M., Pérez, C. A., Arruda, M. A. Z., *Metal-binding proteins scanning and determination by combining gel electrophoresis, synchrotron radiation X-ray fluorescence and atomic spectrometry*. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 62(2005)97.
- [25] Ivanissevich, A., *Nova luz sobre a matéria*. **Ciência Hoje**, 32(2003)44.
- [26] Brum, J. A., *A pesquisa em nanociência e nanotecnologia no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron*. **Nanociência & Nanotecnologia**, 37(2002). Disponível no site <http://www.comciencia.br/reportagens/nanotecnologia/nano18.htm>, acessado em 07/11/04.
- [27] Perez, C. A., Radtke, M., Sanchez, H. J., Tolentino, H., Neuenschwander, R. T., Barg, W., Rubio, M., Bueno, M. I. S., Raimundo, I. M. e Rohwedder, J. J. R., *Synchrotron radiation x-ray fluorescence at the LNLS: Beamline instrumentation and experiments*. **X-Ray Spectrometry**, 28(1999)320.
- [28] Pereira Filho, E. R., Pérez, 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**, 57(2002)1259.
- [29] Melssen, W. J., Smits, J. R. M. e Buydens, G. K., *Using artificial neural networks for solving chemical problems. Part II Kohonen self-organizing feature maps and Hopfield networks*. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 23(1994)267.
- [30] Kohonen, T. **Self-Organizing Maps**, Springer, Berlin, Germany, 2001.

- [31] Simon, H., **Redes Neurais – Princípios e prática**, Bookman, Porto Alegre, Brasil, 2001.
- [32] Balbinot, L., Smichowski, P., Farias, S., Arruda, M. A. Z., Vodopivec, C. e Poppi, R., *Classification of Antarctic algae by applying Kohonen neural network with 14 elements determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry*. **Spectrochimica Acta Part B – Atomic Spectrometry**, 60(2005)725.
- [33] Fidêncio, P. H., Ruisánchez, I. e Poppi, R. J., *application of artificial neural networks to the classification of soils from São Paulo state using near-infrared spectrometry*. **Analyst**, 126(2001)2194.
- [34] Brodnjak-Voncina, D., Kodba, Z. C. e Novic, M., *Multivariate data analysis in classification of vegetable oils characterized by the content of fatty acids*. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 75(2005)31.
- [35] Fonseca, A. M., Biscaya, J. L., Aires-de-Sousa, J. e Lobo, A. M., *Geographical classification of crude oils by Kohonen self-organizing maps*. **Analytica Chimica Acta**, 556 (2006)374.
- [36] Welz, B., **Atomic Absorption Spectrometry**, 2 ed., VCH, Weinheim, Germany, 1985.
- [37] Skoog, D. A., West, D. M. e Holler F. J., **Fundamentals of Analytical Chemistry**, 7 ed., Thomson Learning, New York, 1996.
- [38] Scancar, J., Milacic, R., Benedik, M. e Krizaj, I., *Total metal concentrations in serum of dialysis patients and fractionation of Cu, Rb, Al, Fe and Zn in spent continuous ambulatory peritoneal dialysis fluids*. **Talanta**, 59(2003)355.
- [39] Wróbel, K., Gonzáles, E. B., Wróbel, K. e Sanz-Medel, A., *Aluminum and silicon speciation in human serum by ion-exchange high-performance liquid-chromatography electrothermal atomic-absorption spectrometry and gel-electrophoresis*. **Analyst**, 120(1995)809.
- [40] Sanz-Medel, A., Montes-Bayon, M. e Sanchez, M. L. F., *Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics*. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, 377(2003)236.
- [41] Moldovan, M., Krupp, E. M., Holliday, A. E. e Donard, O. F. X., *High resolution sector field ICP-MS and multicollector ICP-MS as tools for trace metal speciation in environmental studies: a review*. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 19(2004)815.
- [42] Álvarez-Llamas, G., de laCampa, M. R. F. e Sanz-Medel, A., *ICP-MS for specific detection in capillary electrophoresis*. **Trends in Analytical Chemistry**, 24(2005)28.
- [43] Rosen, A. L. e Hieltje, G. M., *Inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry for speciation analysis: applications and instrumentation*. **Spectrochimica Acta Part B**, 59(2004)135.

- [44] Lobinski, R., Schaumlöffel, D. e Szpunar, J. *Mass spectrometry in bioinorganic analytical chemistry*. **Mass Spectrometry Reviews**, 25(2006)255.
- [45] Neilsen, J. L., Abildtrup, A., Christensen, J., Watson, P., Cox, A. e McLeod, C. W., *Laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry in combination with gel electrophoresis: a new strategy for speciation of metal binding serum protein*. **Spectrochimica Acta Part B**, 53(1998)339.
- [46] Binet, M. R. B., Ma, R., Mcleod, C. W. e Poole, R. K., *Detection and characterization of zinc- and cadmium-binding proteins in Escherichia coli by gel electrophoresis and laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry*. **Analytical Biochemistry**, 318(2003)30.
- [47] Becker, J. S., Zoriy, M., Becker, J. S., Pickhardt, C. e Przybylski, M., *Determination of phosphorus and metals in human brain proteins after isolation by gel electrophoresis by laser ablation inductively coupled plasma source mass spectrometry*. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 19(2004)149.
- [48] Becker, J. S., Zoriy, M., Pickhardt, C., Przybylski, M. e Becker, J. S., *Investigation of Cu-, Zn- and Fe-containing human brain proteins using isotopic-enriched tracers by LA-ICP-MS and MALDI-FT-ICR-MS*. **International Journal of Mass Spectrometry**, 242(2005)135.
- [49] Lustig, S., Kimpe, J. D., Cornelis, R. e Schramel, P., *Development of native two-dimensional electrophoresis methods for the separation and detection of platinum carrying serum proteins: initial steps*. **Analytical Chemistry**, 363(1999)484.
- [50] Ma, R., McLeod, C. M., Tomlinson, K. e Poole, R. K., *Speciation of protein-bound trace elements by gel electrophoresis and atomic spectrometry*. **Electrophoresis**, 25(2004)2469.
- [51] Kingston, H. M. e Jassie, L. B., **Introduction to microwave sample preparation: theory and practice**, 2 ed., ACS, Washington, 1993.
- [52] Sun, Y. C., Chi, P. H. e Shiue, M. Y., *Comparison of different digestion methods for total decomposition of siliceous and organic environmental samples*. **Analytical Sciences**, 17(2001)1395.
- [53] Eilola, K. e Peramaki, P., *Microwave heated vapor-phase digestion method for biological sample materials*. **Journal of Analytical Chemistry**, 369(2001)107.
- [54] Sastre, J., Sahuquillo, A., Vidal, M. e Rauret, G., *Determination of Cd, Co, Pb and Zn in environmental samples: microwave-assisted total digestion versus aqua regia and nitric acid extraction*. **Analytical Chimica Acta**, 462(2002)59.
- [55] Bettinelli, M., Baroni, U. e Pastorelli, N., *Microwave-oven sample dissolution for the analysis of environmental and biological-materials*. **Analytical Chimica Acta**, 225(1989)159.

- [56] Flores, E. M. M., Barin, J. S., Paniz, J. N. G., Medeiros, J. A. e Knapp, G., *Microwave-Assisted Sample Combustion: A Technique for sample preparation in trace element determination*. **Analytical Chemistry**, 76(2004)3525.
- [57] Mesko, M. F., de Moraes, D. P., Barin, J. S., Dressler, V. L., Günter, K. e Flores, E. M. M., *Digestion of biological materials using the microwave-assisted sample combustion technique*, **Microchemical Journal**, 82 (2006)183.
- [58] Nogueira, A. R. A., Moraes, D. P., Flores, E. M. M., Krug, F. J., Knapp, G., Nóbrega, J. A., Barim, J. S. e Mesko, M. F., *Decomposições assistidas por radiação microondas*. CENA- USP, Piracicaba, 2006.
- [59] Kohonen, T., em: Alhoniemi, E., Himberg, J., Parhankanpgas, J., Vesanto, J. **SOM Toolbox**, disponível no site <http://www.cis.hut.fi/>.
- [60] *Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrometry* Perkim Elmer, Perkin Elmer Corporation, USA, 1994.
- [61] Wind, M. e Lehamann, W. D., *Element and molecular mass spectrometry – an emerging analytical dream team in the life sciences*. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 19(2004)20.
- [62] Banco de dados Swiss-Prot, disponível no site <http://au.expasy.org/sprot/>, acessado em fevereiro de 2005.

CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os estudos apresentados neste trabalho de Tese permitiram observar que a assimilação e a incorporação de espécies químicas deve ser feita de forma apropriada para o pleno funcionamento de um organismo. No caso dos girassóis, a exposição a um estímulo externo (contaminação por íons metálicos) provocou uma série de modificações.

De acordo com os dados apresentados no Capítulo 1, a presença de íons metálicos em excesso gerou desde alterações referentes a redução na altura das plantas e na biomassa produzida até fatores fisiológicos como necrose no caule. Estes efeitos foram mais evidentes nos girassóis contaminados com a solução mista, visto que, tais plantas apresentaram um elevado índice de mortalidade.

No Capítulo 2 buscou-se verificar as implicações da contaminação por íons metálicos em nível protéico por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida. Em ambas as contaminações avaliadas foi constatado mudanças na composição protéica. As alterações na composição protéica nas folhas de girassol foram mais significativas ao serem adotadas a contaminação com a solução de zinco e com a solução mista. Especificamente no tratamento com zinco, foi observado o aumento da atividade da superóxido dismutase, além da diminuição e, ainda, a supressão de algumas proteínas presentes nas folhas provenientes deste cultivo. Na análise do perfil do gel bidimensional foram detectadas apenas 106 proteínas, obtendo-se, portanto, uma redução de aproximadamente 60% no número de proteínas detectadas neste tratamento ao ser comparada com o tratamento solo e vermicomposto, onde foram observadas 264 proteínas. Por outro lado, na contaminação com a solução mista, foi verificada a diminuição da atividade da superóxido dismutase e da glutathione redutase e também a supressão de algumas proteínas, visto que, apenas 135 proteínas foram encontradas após a separação por meio da eletroforese bidimensional. No entanto, ressalta-se que foi constatado o surgimento de 4 novas proteínas.

Ao serem confrontadas simultaneamente as informações adquiridas nos dois primeiros Capítulos, notou-se que os girassóis apresentaram respostas distintas dependendo da contaminação gerada. Embora os girassóis contaminados com zinco tenham sofrido alterações mais significativas relacionadas às proteínas, este fato não refletiu em prejuízos para o seu desenvolvimento. Possivelmente, os girassóis submetidos

ao tratamento com zinco adotaram mecanismos bioquímicos mais eficientes para minimizar os efeitos adversos provocados por este tipo de contaminante.

No Capítulo 3 foi realizada uma avaliação mais aprofundada a respeito da influência da contaminação na composição protéica, considerando especificamente as metaloproteínas. Foi verificado que, normalmente, a presença da contaminação por íons metálicos interferiu na formação e/ou na preservação das metaloproteínas. Este evento foi confirmado pelo decréscimo nos teores de íons metálicos nas proteínas originárias de tratamentos envolvendo a contaminação ao serem comparadas com proteínas de massas molares semelhantes provenientes do tratamento com solo e vermicomposto.

A partir desta Tese fica evidente a necessidade de várias técnicas multidisciplinares para a abordagem de um sistema complexo que envolve a assimilação de íons metálicos e o desenvolvimento do girassol. Como perspectivas, torna-se fundamental a identificação das proteínas que tiveram as suas expressões modificadas, além daquelas metaloproteínas avaliadas. Somente desta forma será possível inferir a função destas proteínas e as implicações das mesmas no metabolismo do girassol. Contudo, a indisponibilidade do completo seqüenciamento do genoma do girassol faz com que a identificação das proteínas seja mais difícil, sendo este um outro futuro desafio.