



**MARCELO ANSELMO OSEAS DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO SELÊNIO E ZINCO NO METABOLISMO DO  
GIRASSOL POR MEIO DE UM ESTUDO METALÔMICO**

**CAMPINAS  
2012**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**MARCELO ANSELMO OSEAS DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO SELÊNIO E ZINCO NO METABOLISMO DO  
GIRASSOL POR MEIO DE UM ESTUDO METALÔMICO**

**ORIENTADOR: PROF. DR. MARCO AURÉLIO ZEZZI ARRUDA**

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA  
POR MARCELO ANSELMO OSEAS DA SILVA, E ORIENTADA PELO PROF.DR. MARCO  
AURÉLIO ZEZZI ARRUDA.**

---

**Assinatura do Orientador**

**CAMPINAS  
2012**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

Si38a Silva, Marcelo Anselmo Oseas da (1982-).  
Avaliação da influência do selênio e zinco no metabolismo do girassol por meio de um estudo metalômico / Marcelo Anselmo Oseas da Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Marco Aurélio Zezzi Arruda.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Metalômica. 2. ICP-MS. 3. Ablação a laser. 4. Eletroforese em gel. 5. Girassol. I. Arruda, Marco Aurélio Zezzi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:**

Evaluation of the effect of selenium and zinc in the metabolism of sunflowers through a metallomic study

**Palavras-chave em inglês:**

Metallomic  
ICP-MS  
Laser ablation  
Gel electrophoresis  
Sunflower

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:**

Marco Aurélio Zezzi Arruda [Orientador]  
Ricardo Antunes de Azevedo  
Márcia Andréia Mesquita da Veiga  
Lauro Tatsuo Kubota  
José Alberto Fracassi da Silva

**Data de defesa:** 29/08/2012



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, em especial ao Instituto de Química pela possibilidade de realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron pelo acesso para realização das análises para caracterização de proteínas.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas, por disponibilizar as sementes utilizadas neste trabalho.

Ao Prof. Marco Aurélio Zezzi Arruda pela orientação e amizade desde a iniciação científica.

A todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos funcionários do instituto de Química da UNICAMP que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Aos amigos que ao longo de nove anos fizeram ou fazem parte do Grupo de Espectrometria, Preparo de Amostras e Mecanização – GEPAM.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para que este trabalho se concretizasse.



## **Súmula Curricular**

### **1. Dados pessoais**

Marcelo Anselmo Oseas da Silva.

Brasileiro, natural de São Paulo, SP.

Endereço Eletrônico: oseasmar@gmail.com

### **2. Formação Acadêmica**

2008 - 2012     Doutorado em Ciências – Área de concentração: Química Analítica. Universidade Estadual de Campinas- Unicamp

Título da Tese: Avaliação da influência do selênio e zinco no metabolismo do girassol por meio de um estudo metalômico.

2006 - 2008     Mestrado em Química – Área de concentração: Química Analítica. Universidade Estadual de Campinas.

Título da Dissertação: Avaliação e Caracterização de Sistemas Baseados em Ponto Nuvem Visando à Remoção de Albumina do Plasma Sanguíneo.

2006 - 2008     Licenciatura em Química. Universidade Estadual de Campinas.

2002 - 2005     Bacharelado em Química. Universidade Estadual de Campinas.

1999 - 2000     Técnico em Química. Escola Técnica Estadual Trajano Camargo.

### **3. Produção Científica**

Artigos completos publicados em periódicos: 10

Trabalhos apresentados em eventos internacionais: 7

Trabalhos apresentados em eventos nacionais: 13

Participações em eventos científicos: 20

### **3.1. Artigos completos publicados**

da Silva, M.A.O.; Arruda, M.A.Z.; *Microchim. Acta*, **2012**, 176, 131-136.

da Silva, M.A.O.; Mataveli, L.R.V.; Arruda, M.A.Z.; *Br. J. Anal. Chem.*; **2011**, 5, 234-245.

da Silva, M.A.O.; de Andrade, S.A.L.; Mazzafera, P.; Arruda, M.A.Z.; *Int. J. Mass Spectrom.*, **2011**, 307, 55-60.

Lima, P.M.; Neves, R.D.C.F.; dos Santos, F.A; Perez, C.A.; da Silva, M.A.O.; Arruda, M.A.Z, Castro, G., Padilha, P.M.; *Microchim. Acta*, **2011**, 173, 43-49.

Lopes, A.S.; da Silva, M.A.O.; Gozzo, F.C.; Arruda, M.A.Z.; *J. Integr. Omics.*, **2011**, 1, 55-60.

da Silva, M.A.O.; Sussulini, A.; Arruda, M.A.Z.; *Expert Review of Proteomics*. *Expert Rev. Proteomics*, **2010**, 7, 387-400.

Lima, P.M.; Neves, R.D.C.F.; dos Santos, F.A; Perez, C.A.; da Silva, M.A.O; Arruda, M.A.Z; Castro, G.; Padilha, P.M.; *Talanta*, **2010**, 82, 1052-1056.

da Silva, M.A.O.; Garcia, J.S.; Souza, G.H.M.F.; Eberlin, M.N.; Gozzo, F.C.; Arruda, M.A.Z.; *Talanta*, **2010**, 80, 1545-1551.

da Silva, M.A.O.; Arruda, M.A.Z.; *Talanta*, **2009**, 77, 985-990.

da Silva, M.A.O.; Arruda, M.A.Z.; *Anal. Biochem.*, **2006**, 351, 155-157.

### **4. Experiência Profissional**

PerkinElmer do Brasil

Especialista em produto para a área de inorgânicos

Desde outubro de 2011.

## RESUMO

Inúmeros trabalhos envolvendo uma nova área de estudos denominada metalômica destacam a necessidade de melhor compreender a interação entre íons metálicos e proteínas. Esta Tese empregou o girassol (*Helianthus annuus* L.), uma planta da família das oleaginosas que apresenta uma relevante importância econômica na produção de óleo vegetal, bem como em processos de fitorremediação, em um estudo metalômico para avaliação de possíveis alterações na expressão de proteínas mediante o desenvolvimento das plantas irrigadas com íons selenito ou zinco. Inicialmente, o estudo avaliou quatro diferentes métodos para a adequada para extração e separação de proteínas das folhas de girassol empregando a técnica de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE), sendo que o melhor procedimento consistiu na extração empregando tampão na presença de fenol. A posterior caracterização das proteínas, nos *spots* proteicos, empregando espectrometria de massas também foi conduzida evidenciando, pela primeira vez para o organismo estudado, a expressão de 12 novas proteínas. Um estudo ionômico foi desenvolvido para avaliar a distribuição destes elementos nas diferentes estruturas das plantas, buscando correlação com os processos biológicos que estariam ocorrendo nos girassóis. O estudo revelou uma correlação entre o nível de selênio e enxofre nas plantas sugerindo a incorporação do selênio em aminoácidos utilizados para síntese de proteínas. O emprego da técnica de ablação a laser acoplada ao espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente (LA-ICP-MS) também apresenta destaque na pesquisa, complementando os dados obtidos no estudo ionômico, por meio da identificação de selênio nos *spots* proteicos extraídos das folhas dos girassóis e separadas por 2D-PAGE. Desenvolveu-se também desenvolver um método para análise quantitativa direta e simultânea de selênio e enxofre nas folhas das plantas empregando a hifenação LA-ICP-MS, buscando correlação entre os dois elementos.



## ABSTRACT

Several papers highlight a new research area called metallomic, and points out the necessity to better understand the relationship between metallic ions and proteins. This Thesis has employed the sunflower (*Helianthus annuus* L.), which is considered an oilseed plant with significant economical importance for the production of vegetal oil, and also used in fitoremediation processes, to carry out a metallomic study focused on the evaluation of possible changes in proteins expression due to the irrigation of the plants with selenite or zinc ions. Initially, the study evaluated four different methods for the adequate extraction and separation of sunflower leaf proteins using the two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE) technique and the best result was obtained using a phenol based extraction procedure. Further protein characterization in protein spots were carried out using mass spectrometry and revealed for the first time for the studied organism, the expression of 12 new proteins. An ionomic study was also developed to investigate the distribution of these elements in the different structures of the plants, looking for the correlation of obtained data with biological processes that could be occurring in the sunflowers. The study showed a correlation between selenium and sulfur levels, suggesting the incorporation of selenium into amino acids used for the synthesis of proteins. The application of laser ablation technique coupled to the inductively coupled plasma mass spectrometer (LA-ICP-MS) has also been highlighted in this research, complementing the results obtained in the ionomic study through the identification of selenium in sunflower leaves protein spots. In addition, it was evaluated an analytical procedure for the direct and simultaneous quantitative determination of selenium and sulfur in the leaves of the plants using LA-ICP-MS, searching for a correlation between both elements.



## Sumário

Lista de abreviaturas e acrônimos .....	xiii
Lista de Tabelas .....	xxix
Lista de Figuras .....	xxxiii
Introdução .....	01
Referências Bibliográficas .....	02
Capítulo 1 – Desenvolvimento da metodologia para extração e separação das proteínas de folhas de girassol via eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida .....	05
1. Objetivo .....	07
2. Revisão bibliográfica .....	07
2.1. Preparo de amostras focando separações eletroforéticas .....	07
2.2. Espectrometria de massas para caracterização de proteínas - ionização empregando MALDI .....	09
2.3. Quantificação de proteínas – Reação de Bradford .....	11
3. Procedimento experimental .....	12
3.1. Preparo de soluções e limpeza de materiais .....	12
3.2. Métodos avaliados para a extração de proteínas .....	13
3.3. Metodologia empregada para quantificação do teor de	

proteínas totais .....	15
3.4. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida .....	16
3.4.1. Separação eletroforética – primeira dimensão .....	16
3.4.2. Separação eletroforética – segunda dimensão .....	18
3.5. Preparo de amostras para análises por espectrometria de massas .....	20
3.5.1. Obtenção dos espectros .....	22
3.5.2. Tratamento dos dados .....	22
4. Resultados e discussão .....	24
4.1. Quantificação do teor de proteínas totais .....	24
4.2. Perfis obtidos para os géis de eletroforese .....	25
4.2.1. Metodologia A .....	25
4.2.2. Metodologia B .....	27
4.2.3. Metodologia C .....	28
4.2.4. Metodologia D .....	30
4.3. Identificação das proteínas por espectrometria de massas .....	31
4.3.1. Buscas em bancos de dados para determinação da identidade das proteínas .....	33
5. Conclusões parciais .....	40
6. Referências bibliográficas .....	43

Capítulo 2 – Plantio dos girassóis e estudo ionômico .....	47
1. Objetivo .....	49
1. Revisão bibliográfica .....	49
2.1. A importância do girassol para a economia brasileira .....	49
2.2. Características das sementes empregadas .....	51
2.3. Nutrição vegetal .....	52
2.4. O selênio no metabolismo vegetal .....	53
2.5. O metabolismo do zinco: captação e translocação .....	56
2.6. A importância dos estudos ionômicos aplicados às plantas, com foco na nutrição humana .....	57
3. Procedimentos experimentais .....	59
3.1. Preparo das soluções, padrões e limpeza dos materiais .....	59
3.2. Cultivo dos girassóis .....	59
3.3. Determinação das espécies químicas nas diferentes regiões das plantas .....	61
3.4. Determinação das espécies químicas presentes no solo utilizado para cultivo .....	66
4. Resultados e discussão .....	67
4.1. Plantio dos girassóis .....	67
4.2. Concentração dos elementos no solo .....	72

4.3. Avaliação do perfil ionômico nas diferentes regiões da planta .	74
4.4. Plantas irrigadas com soluções de selênio .....	75
4.4.1. A translocação e a distribuição do selênio nas plantas .....	75
4.4.2. O mecanismo de incorporação do selênio .....	79
4.4.3. Influência do selênio na absorção de nutrientes essenciais para a fotossíntese .....	80
4.4.4. A interferência do selênio no metabolismo das plantas .....	85
4.5. Plantas irrigadas com soluções de zinco .....	88
4.5.1. A translocação e a distribuição de zinco .....	88
4.5.2. Avaliação do estresse causado pela adição de zinco .....	90
4.6. Concentração dos elementos nas sementes .....	92
5. Conclusões parciais .....	93
6. Referências bibliográficas .....	94
Capítulo 3 – Extração e separação das proteínas das folhas de girassol empregando eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida e identificação de selênio nos <i>spots</i> proteicos empregando a hifenação LA-ICP-MS .....	99
1. Objetivo .....	101
2. Revisão bibliográfica .....	101

2.1. Abordagens analíticas empregadas em estudos metalômicos .	101
2.2. A estratégia analítica e instrumentação empregadas neste estudo metalômico e em outros trabalhos desta área .....	105
2.3. Limitações das estratégias analíticas empregadas .....	107
3. Procedimentos experimentais .....	108
3.1. Preparo de soluções e limpeza de materiais .....	108
3.2. Metodologia empregada para extração das proteínas de folhas de girassol .....	109
3.3. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida .....	110
3.4. Secagem dos géis de eletroforese .....	111
3.5. Otimização dos parâmetros instrumentais dos equipamentos de ablação a laser e ICP-MS .....	113
4. Resultados e discussão .....	115
3.1. Otimização das condições de operação do ICP-MS .....	115
3.1.1. Eliminação de interferentes .....	115
4.1.2. Avaliação das vazões dos gases auxiliar e transportador .	117
4.1.3. Avaliação da potência aplicada à bobina de radiofrequência .....	120
4.1.4. Avaliação da intensidade do laser .....	121
4.1.5. Avaliação do diâmetro do laser e frequência empregada ..	123

4.2. Avaliação de um sistema hipotético empregando selenometionina .....	126
4.3. Análise do perfil eletroforético obtido para o grupo de amostras controle e de plantas tratadas com selênio .....	128
4.4. Detecção de selênio nos <i>spots</i> proteicos .....	131
5. Conclusões parciais .....	135
6. Referências bibliográficas .....	137

Capítulo 4 – Emprego da hifenação LA-ICP-MS para realização de análises quantitativas de selênio e enxofre diretamente nas folhas de girassol e criação de imagens bidimensionais exibindo a distribuição destes elementos nas estruturas estudadas .....	141
1. Objetivo .....	143
2. Revisão bibliográfica .....	143
2.1. Potencialidades e limitações do sistema LA-ICP-MS com a construção de imagens de amostras biológicas .....	143
2.2. Tendências observadas na literatura para a área de proteômica empregando LA-ICP-MS .....	146
3. Procedimentos experimentais .....	147
3.1. Preparo das soluções, padrões e limpeza dos materiais .....	147
3.2. Plantio dos girassóis .....	148

3.3. Validação da metodologia empregada .....	149
3.3.1. Validação da metodologia para quantificação de enxofre .	149
3.3.2. Validação da metodologia para quantificação de selênio ..	153
3.4. Procedimento para preparo das folhas para análise direta empregando LA-ICP-MS .....	154
3.5. Condições experimentais utilizadas para análise das folhas via LA-ICP-MS .....	154
3.6. Obtenção das imagens bidimensionais a partir dos dados coletados .....	157
4. Resultados e discussão .....	158
4.1. Avaliação da estratégia experimental adotada para monitoramento de enxofre e selênio nas folhas de girassol .....	158
4.2. Validação da metodologia analítica empregada para realização das análises quantitativas de selênio e enxofre nas folhas de girassol .....	161
4.3. Análise quantitativa de selênio e enxofre nas folhas de girassol .....	166
5. Conclusões parciais .....	173
6. Referências bibliográficas .....	174
Conclusões finais e perspectivas .....	176



## Lista de abreviaturas e acrônimos

ALA	Ácido aminolevulínico.
ANOVA	Análise de variância simples, do inglês, <i>analysis of variance</i> .
APS	Adenosina Fosfosulfato, do inglês, <i>Adenosine phosphosulphate</i> .
ca.	Cerca de.
CBBG	Azul de Coomassie, do inglês, <i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i> .
CE	Eletroforese capilar, do inglês, <i>Capillary Electrophoresis</i> .
CHAPS	3-[(3-cloramidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato.
CID	Dissociação Induzida por Colisão, do inglês, <i>Collision-induced Dissociation</i> .
CoA	Coenzima A.
CSE	Eletroforese Capilar de Peneiramento, do inglês, <i>Capillary Sieving Electrophoresis</i> .
CRM	Material de Referência Certificado, do inglês, <i>Certified Reference Material</i> .
dpi	Pontos por polegada, do inglês, <i>dots per inch</i> .
DTT	Ditiotreitol.
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético.
eV	Elétron-Volt.

Da	Dalton. 1 Da equivale a $1,661 \times 10^{-24}$ g.
DIGE	Eletroforese em gel diferencial, do inglês, <i>Differential Gel Electrophoresis</i> .
EST	Marcador de sequência expressa, do inglês, <i>Expressed sequence tag</i> .
ET AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com fonte de atomização eletrotérmica, do inglês, <i>Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry</i> .
F AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com fonte de atomização por chama, do inglês, <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> .
FT-ICR	Espectrometria de Massas por Ressonância Ciclônica de Íons, do inglês, <i>Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry</i> .
GE	Eletroforese em gel, do inglês, <i>Gel Electrophoresis</i> .
GEPAM	Grupo de Espectrometria, Preparo de Amostras e Mecanização.
Hz	Hertz.
IAC	Instituto Agronômico de Campinas.
ICAT	<i>Isotope-Coded Affinity Tags</i> .
ICP-MS	Espectrômetro de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente, do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> .

ICP OES	Espectrômetro de Emissão Óptica com fonte de plasma acoplado indutivamente, do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> .
ITRAC	<i>Isobaric tag for relative and absolute quantitation</i> .
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> .
J	Joule. 1 J equivale a $1 \text{ kg m}^{-2} \text{ s}^{-2}$ ou $6,2415 \times 10^{18} \text{ eV}$ .
LA-ICP-MS	Sistema de ablação a laser acoplado ao espectrômetro de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente, do inglês, <i>Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> .
LDI+	Ionização e desorção por laser com geração de íons positivos, do inglês, <i>Laser Desorption Ionization</i> .
MALDI	Ionização / desorção de matriz auxiliada por laser <i>Matrix</i> , do inglês, <i>Assisted Laser Desorption/Ionization</i> .
MCP	Placa microcanal, do inglês, <i>Microchannel plate</i> .
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro, do inglês, <i>Messenger Ribonucleic Acid</i> .
MS	Espectrometria de massas.
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial.
<i>m/z</i>	Razão massa/carga.
Nd:YAG	Granada de ítrio e alumínio dopada com neodímio, do inglês,

*Neodymium-doped yttrium aluminium garnet.*

OAS	<i>Orto-acetilserina.</i>
OPHS	<i>o-fosfohomoserina, do inglês, o-phosphohomoserine.</i>
Q-TOF	Analisador de massas sequencial quadrupolar e por tempo de voo.
pI	Ponto isoelétrico.
pH	Potencial hidrogeniônico.
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila.
psi	Libra por polegada quadrada, do inglês, <i>pound force per square inch</i> . 1 psi equivale a $68,046 \times 10^{-3}$ atm.
PVP	Polivinilpirrolidona.
rpm	Rotação por minuto.
RuBisCO	Ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase.
SDS	Dodecilsulfato de sódio.
SILAC	<i>Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture.</i>
SF	Analisador de massas por setor magnético, do inglês, <i>Sector Field Mass Analyzer.</i>
TCA	Ácido tricloroacético.
TFA	Ácido trifluoroacético.
TOF	Analisador de massas por tempo de voo, do inglês, <i>Time of</i>

*Flight Mass Analyzer.*

Tris-HCl      Cloreto de 2-Amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol.

XAS      Espectroscopia de Absorção de Raios-X, do inglês, *X-ray Absorption Spectroscopy.*

W      Watt.



## Lista de Tabelas

Tabela 1.1	Condições empregadas durante as etapas de focalização isoeletrica das proteínas .....	14
Tabela 1.2	Composição da mistura utilizada para preparo dos géis de poli(acrilamida) com concentração de 12,5% (m/v) em acrilamida, utilizados nas separações proteicas .....	15
Tabela 1.3	Soluções/reagentes, volumes empregados e tempo de incubação utilizados na etapa de remoção do corante dos <i>spots</i> proteicos. Todas as etapas são realizadas à temperatura ambiente .....	17
Tabela 1.4	Soluções/reagentes, volumes e tempo de incubação empregados nas etapas realizadas após a digestão triptica das proteínas. A etapa de condicionamento da coluna é realizada a 37 °C e as demais à temperatura ambiente .....	18
Tabela 1.5	Massas de proteína extraída por grama de material vegetal, obtidas após aplicação dos protocolos de extração A, B e D. Número de réplicas (extrações): n = 3 .....	20
Tabela 1.6	Sequências de peptídeos identificados e suas respectivas massas molares experimentais, massas moleculares experimentais e teóricas e variação entre as massas moleculares experimentais e teóricas .....	30
Tabela 1.7	Sequência gênica obtida a partir dos dados experimentais para o <i>spot</i> número 6 .....	31

Tabela 1.8	<i>Spots</i> identificados e correlações com as proteínas que apresentaram relação de homologia. As definições das proteínas foram mantidas em língua inglesa. Resultados destacados em negrito indicam proteínas que não estão descritas no banco de dados utilizado para busca .....	35
Tabela 2.1	Características das sementes de girassol empregadas nesta Tese .....	45
Tabela 2.2	Condições empregadas para o cultivo das plantas controle e irrigadas com soluções de zinco e selênio ...	53
Tabela 2.3	Condições empregadas para realizar a decomposição das amostras de folhas, caules e raízes de girassol utilizando radiação micro-onda .....	54
Tabela 2.4	Condições de operação do equipamento de ICP-MS para determinação quantitativa de diferentes espécies químicas .....	55
Tabela 2.5	Limites de detecção para as curvas analíticas empregadas para determinação de $^{24}\text{Mg}^+$ , $^{47}\text{PO}^+$ , $^{48}\text{SO}^+$ , $^{56}\text{Fe}^+$ , $^{64}\text{Zn}^+$ , $^{80}\text{Se}^+$ empregando ICP-MS e fatores de diluição das amostras utilizadas nas determinações. Os limites de detecção foram definidos como o ponto de menor concentração das curvas analíticas .....	57
Tabela 2.6	Condições empregadas para realizar a decomposição do solo empregado no cultivo dos girassóis, utilizando radiação micro-onda .....	59

Tabela 2.7	Concentrações das espécies químicas (média $\pm$ desvio padrão, n = 3) determinadas no solo empregado para cultivo dos girassóis .....	64
Tabela 2.8	Valores de referência para os teores médios de enxofre e magnésio nas folhas de girassol no início do florescimento [1] e comparação com os valores obtidos neste trabalho. Maiores detalhes referentes às quantificações de enxofre e magnésio nas folhas serão fornecidas ao longo deste capítulo .....	65
Tabela 2.9	Determinação de zinco e selênio empregando o procedimento para decomposição proposto e a comparação com o valor descrito na carta de certificação do material de referência certificado CRM 281 – <i>Trace Elements in Rye Grass</i> .....	66
Tabela 2.10	Concentrações dos elementos (média $\pm$ desvio padrão, n = 3) determinadas nas sementes de girassol pertencentes ao lote empregado para cultivo .....	83
Tabela 3.1	Principais características apresentadas pelas técnicas de separação empregadas em estudos metalômicos ...	92
Tabela 3.2	Parâmetros empregados no método utilizado para otimização das condições instrumentais dos equipamentos de ICP-MS e ablação a laser .....	101
Tabela 3.3	Parâmetros instrumentais ótimos para detecção de selênio por meio da hifenação LA-ICP-MS .....	111
Tabela 4.1	Condições empregadas para realizar a decomposição pastilhas de folhas de girassol utilizando radiação	

	micro-onda .....	134
Tabela 4.2	Condições de operação do equipamento de ICP-MS para determinação quantitativa de enxofre e selênio no material utilizado para confecção das pastilhas analisadas por LA-ICP-MS e, posteriormente, submetidas à digestão ácida .....	135
Tabela 4.3	Parâmetros instrumentais ótimos para detecção de selênio e enxofre por meio da hifenação LA-ICP-MS ...	138
Tabela 4.4	Resultados obtidos na validação da metodologia para determinação quantitativa de selênio via LA-ICP-MS Neste caso, empregou-se o material certificado de referência 1575a <i>Tomato Leaves</i> para construção da curva analítica de calibração. Os valores apresentados nesta tabela representam a média e a estimativa do desvio padrão para as medidas obtidas (n = 3) .....	144
Tabela 4.5	Resultados obtidos na validação da metodologia para determinação quantitativa de enxofre via LA-ICP-MS. Neste caso, empregou-se o material certificado de referência CRM 100 – <i>Minor and trace elements in beech leaves</i> para construção da curva analítica de calibração. Os valores apresentados nesta tabela representam a média e a estimativa do desvio padrão para as medidas obtidas (n = 3) .....	146

## Lista de Figuras

Figura 1.1	Estrutura do corante Azul de Coomassie, composto que compõe o reagente de Bradford .....	09
Figura 1.2	Perfil do gel de eletroforese obtido após extração de proteínas empregando a metodologia A. A massa de proteína aplicada no gel foi de 485 µg .....	22
Figura 1.3	Perfil do gel de eletroforese obtido após extração de proteínas empregando a metodologia B .....	23
Figura 1.4	Perfil do gel de eletroforese obtido após extração de proteínas empregando a metodologia C .....	24
Figura 1.5	Perfil do gel de eletroforese obtido após extração de proteínas empregando a metodologia D .....	26
Figura 1.6	Imagem de um gel de eletroforese bidimensional de poliacrilamida, obtido por meio do protocolo de extração D indicando os 61 spots proteicos que foram submetidas ao procedimento de digestão triptica descrito no item 2.5 e posterior análise por espectrometria de massas. As 22 proteínas destacadas em azul tiveram suas identidades determinadas ao final do procedimento; as proteínas destacadas em vermelho não apresentaram sucesso nas identificações .....	27
Figura 1.7	Diagrama apresentando as sequências de busca para as duas rotas empregadas na identificação das proteínas separadas por eletroforese em gel de	

	poliacrilamida .....	29
Figura 1.8	Espectro de <i>fingerprinting</i> obtido a partir do material digerido com tripsina para a proteína indicada no <i>spot</i> 6. As setas mostram os peptídeos identificados que possibilitaram a caracterização da proteína .....	30
Figura 1.9	Comparativo entre a sequência de aminoácidos de girassol fornecida ( <i>Query</i> ) e a sequência de <i>Arabidopsis Thaliana</i> que apresenta homologia com a proteína alvo de estudo ( <i>sbjct</i> ). As linhas indicadas por setas vermelhas representam os aminoácidos coincidentes entre as duas sequências. Os sinais (+) (mostrado pela seta azul) indicam alterações/variações comuns que podem ocorrer nas sequências. As lacunas (indicadas pela seta verde) exibem as alterações / diferenças propriamente ditas entre as sequências .....	32
Figura 2.1	Estratégias adotadas pelas plantas para evitar os efeitos tóxicos causados pela contaminação por selênio .....	48
Figura 2.2	Plantas com 5 dias de desenvolvimento: (A) antes do desbaste, (B) após o desbaste e (C e D) 14 dias após o plantio .....	60
Figura 2.3	Imagem típica da base de uma planta cultivada com a dose superior de selênio: (A) após 27 dias de cultivo; (B) comparativo entre uma planta cultivada com dose superior de selênio, à esquerda, e uma planta controle, à direita .....	61

Figura 2.4	Detalhe do botão de uma planta do grupo controle no 44º dia de desenvolvimento .....	61
Figura 2.5	Desenvolvimento dos girassóis após 44 dias de cultivo. Número de réplicas: n = 8 .....	62
Figura 2.6	Imagens das plantas ao 44º dia, momentos antes da coleta .....	62
Figura 2.7	Imagens representativas para cada grupo de plantas submetidas aos tratamentos propostos, minutos após a retirada das mesmas dos vasos .....	63
Figura 2.8	Concentração de selênio, em miligramas do elemento por quilograma de material seco, determinada nas raízes dos girassóis para as diferentes condições de cultivo empregadas neste trabalho .....	67
Figura 2.9	Concentração de selênio, em miligramas do elemento por quilograma de material seco, determinada nas folhas e caules dos girassóis para as diferentes condições de cultivo empregadas neste trabalho .....	68
Figura 2.10	Concentração de fósforo, em miligramas do elemento por quilograma de material seco, determinada nas raízes dos girassóis para as diferentes condições de cultivo empregadas neste trabalho .....	70
Figura 2.11	Imagem típica de uma folha de girassol apresentando clorose e pertencente a uma planta do grupo cultivado com a adição da máxima concentração de selênio, após 27 dias de cultivo .....	72

Figura 2.12	Rota de síntese para o grupo heme nos animais. Observe que os íons $Fe^{2+}$ que participam da ativação do gene da enzima ALA sintetase são, ao final do processo, utilizados como substrato pela enzima ferroquelatase a qual promove a ligação metal-porfirina. Para as plantas, a síntese da porfirina segue rota semelhante. No entanto, ao final do processo íons magnésio ligam-se à molécula .....	73
Figura 2.13	Concentração de ferro, em miligramas do elemento por quilograma de material seco, determinada nos caules, raízes e folhas dos girassóis para as cinco diferentes condições de cultivo empregadas neste trabalho .....	74
Figura 2.14	Concentração de magnésio, em miligramas do elemento por grama de material seco, determinada nos caules, raízes e folhas dos girassóis para as duas condições de cultivo que empregaram irrigação com selênio e para a condição de irrigação controle .....	75
Figura 2.15	Concentração de enxofre, em miligramas do elemento por grama de material seco, determinada nos caules, raízes e folhas dos girassóis para as diferentes condições de cultivo empregadas neste trabalho .....	76
Figura 2.16	A rota para biossíntese da cisteína, metionina e glutathiona. Enzimas envolvidas: (1) Transportadores de íons sulfato; (2) ATP sulfurilase; (3) Adenosina fosfosulfato redutase; (4) Sulfito redutase; (5) O-acetilserina tiolase; (6) Serina acetil transferase; (7)	

Glutamilcisteína sintase; (8) Glutaciona sintetase; (9) Cistationa  $\gamma$ -sintetase; (10) Cistationa  $\beta$ -liase; (11) Metionina sintase; (12) Aspartato quinase, aspartato semialdeido desidrogenase, homoserina desidrogenase; homoserina quinase; (13) Treonina quinase. Abreviaturas: APS – adenosina fosfosulfato; OAS – *o*-acetilserina; OPHS – *o*-fosfohomoserina ..... 77

Figura 2.17 Concentração de zinco, em miligramas do elemento por quilograma de material seco, determinada nos caules, raízes e folhas dos girassóis para as diferentes condições de cultivo empregadas neste trabalho ..... 79

Figura 2.18 Concentração de magnésio, em miligramas do elemento por grama de material seco, determinada nos caules, raízes e folhas dos girassóis para as condições de cultivo que empregaram irrigação com solução de zinco e para o grupo de plantas controle .... 81

Figura 2.19 Comparação entre os teores de magnésio nas diferentes regiões das plantas submetidas aos diferentes tratamentos empregados neste trabalho ..... 82

Figura 3.1 Técnicas analíticas empregadas em estudos metalômicos. HPLC: *High-Performance Liquid Chromatography*; SEC: *Size exclusion Chromatography*, CZE: *Capillary Zone Electrophoresis*; CSE: *Capillary Sieving Electrophoresis*; MEKC: *Micellar Electrokinetic Chromatography*; CID: *Collision-Induced Dissociation*, FT ICR: *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*; ICP-MS: *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, LA-ICP-MS: *Laser*

	<i>Ablation Coupled to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, F AAS: Flame Atomic Absorption Spectrometry; ET AAS: Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry; ICP OES: Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy; TOF: Time-of-flight Analyzer; SF: Sector Field Analyzer .....</i>	91
Figura 3.2	Diagrama esquemático apresentando o procedimento experimental para a extração das proteínas de folhas de girassol com posterior separação empregando a técnica de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida .....	97
Figura 3.3	Diagrama apresentando a montagem otimizada para promover a secagem dos géis de poliacrilamida .....	99
Figura 3.4	Imagem da câmara de ablação contendo um gel de poliacrilamida seco fixado para posterior análise .....	100
Figura 3.5	Imagem do gel de poliacrilamida seco obtida com a câmara do sistema de ablação a laser. A cratera exibida no centro da imagem evidencia o local de incidência do laser que, neste caso, foi configurado para operar com velocidade de $100 \mu\text{m s}^{-1}$ e diâmetro do feixe de $100 \mu\text{m}$ . Na imagem, o laser incidiu sob a mesma região por duas vezes, sendo que na primeira teve como objetivo remover o filme plástico que recobre o gel e na segunda realizar a ablação da matriz seca de poliacrilamida .....	100
Figura 3.6	Otimização da vazão de oxigênio empregada para eliminação de interferentes na determinação de	

	selênio após injeção de solução contendo $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ deste elemento. Neste estudo, o parâmetros RPa e RPq do quadrupolo da cela de reação foram mantidos fixos em 0 e 0,4 V, respectivamente .....	103
Figura 3.7	Otimização do potencial RPq (parâmetro de rejeição $q$ da equação de Mathieu) empregado no quadrupolo da cela de reação para determinação de selênio após injeção de solução contendo $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ deste elemento. Neste estudo, a vazão de oxigênio foi mantida fixa em 0,7 e $1,2 \text{ L min}^{-1}$ para o monitoramento dos íons $\text{SeO}^+$ e $\text{Se}^+$ , respectivamente	104
Figura 3.8	Avaliação da vazão de gás auxiliar (argônio) no intervalo compreendido entre $1,2$ e $1,8 \text{ L min}^{-1}$ , obtida após avaliação de géis de poliacrilamida polimerizados a partir de soluções de acrilamida contendo $10 \text{ mg L}^{-1}$ de íons selenito. Neste caso, os demais parâmetros empregados no estudo consistiam na potência da bobina de radiofrequência igual a 1270 W, vazão do gás de transportador de $1,1 \text{ L min}^{-1}$ ; frequência do laser de 20 Hz; intensidade de 100% (ca. $28 \text{ J cm}^{-2}$ ) e diâmetro do feixe do laser de $100 \mu\text{m}$ .....	105
Figura 3.9	Avaliação da vazão de gás transportador (argônio) no intervalo compreendido entre $0,7$ e $1,5 \text{ L min}^{-1}$ , obtida após avaliação de géis de poliacrilamida polimerizados a partir de soluções de acrilamida contendo $10 \text{ mg L}^{-1}$ de íons selenito. Neste caso, os demais parâmetros empregados no estudo consistiam na potência da bobina de radiofrequência igual a 1270 W, vazão do	

	gás de auxiliar de 1,8 L min <sup>-1</sup> ; frequência do laser de 20 Hz; intensidade de 100% (ca. 28 J cm <sup>-2</sup> ) e diâmetro do feixe do laser de 100 µm .....	106
Figura 3.10	Sinal analítico obtido para ablação de um gel de poliacrilamida polimerizado a partir de uma solução de acrilamida contendo 10 mg L <sup>-1</sup> de selenito empregando as seguintes condições de operação: bobina de radiofrequência igual a 1000 W; vazão do gás auxiliar de 1,8 L min <sup>-1</sup> ; vazão de gás transportador de 1,1 L min <sup>-1</sup> ; frequência do laser de 20 Hz; intensidade de 100% (ca. 28 J cm <sup>-2</sup> ) e diâmetro do feixe do laser de 100 µm. O sinal foi obtido por meio do método apresentado na Tabela 3.2, com tempo de coleta de dados do ICP-MS de 141 s e tempo de operação do laser de 42 s .....	107
Figura 3.11	Áreas dos sinais analíticos obtidas para o estudo da otimização da potência aplicada durante o processo de ablação utilizando géis de poliacrilamida contendo íons selenito .....	106
Figura 3.12	Área do sinal analítico obtida em função da intensidade do laser para gel de poliacrilamida polimerizado a partir de uma solução de acrilamida contendo 10 mg L <sup>-1</sup> de selenito empregando as seguintes condições de operação: bobina de radiofrequência igual a 1000 W; vazão do gás de auxiliar de 1,8 L min <sup>-1</sup> ; vazão de gás transportador de 1,1 L min <sup>-1</sup> ; frequência do laser de 20 Hz; diâmetro do feixe do laser de 100 µm. A linha contínua descreve a	

	equação exponencial que se ajusta aos dados obtidos, cuja equação é apresentada junto ao gráfico .....	108
Figura 3.13	Área do sinal analítico obtida em função do diâmetro do feixe de laser para gel de poliacrilamida polimerizado a partir de uma solução de acrilamida contendo $10 \text{ mg L}^{-1}$ de selenito empregando as seguintes condições de operação: bobina de radiofrequência igual a 1000 W; vazão do gás de auxiliar de $1,8 \text{ L min}^{-1}$ ; vazão de gás transportador de $1,1 \text{ L min}^{-1}$ ; frequência do laser de 20 Hz; intensidade do laser de 80% .....	109
Figura 3.14	Área do sinal analítico obtida em função frequência do laser para gel de poliacrilamida polimerizado a partir de uma solução de acrilamida contendo $10 \text{ mg L}^{-1}$ de selenito empregando as seguintes condições de operação: bobina de radiofrequência igual a 1000 W; vazão do gás de auxiliar de $1,8 \text{ L min}^{-1}$ ; vazão de gás transportador de $1,1 \text{ L min}^{-1}$ ; intensidade do laser de 80%, diâmetro do feixe de $100 \mu\text{m}$ .....	110
Figura 3.15	Diagrama esquemático mostrando as dimensões consideradas para determinação do tamanho médio de uma banda proteica em uma separação eletroforética bidimensional .....	112
Figura 3.16	Sinal analítico obtido para o íon $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ após ablação de um gel de poliacrilamida polimerizado a partir de uma solução de acrilamida contendo $3,2 \text{ mg L}^{-1}$ de selenometionina. O resultado obtido representa uma proteína hipotética onde 100% de seus aminoácidos	

	contêm um átomo de selênio incorporado aos seus resíduos laterais. Suavização aplicada: média adjacente com janela de 2 pontos .....	112
Figura 3.17	Perfil eletroforético obtido após separação de proteínas de folhas de girassol ( <i>Helianthus annuus</i> L.) de plantas do grupo controle. A massa de proteína aplicada no gel foi de 485 µg .....	114
Figura 3.18	Perfil eletroforético obtido após separação de proteínas de folhas de girassol ( <i>Helianthus annuus</i> L.) de plantas do grupo irrigado com solução de selênio (352 mg de Se <sub>2</sub> O <sub>3</sub> adicionados ao longo de 44 dias) . A massa de proteína aplicada no gel consistia em 485 µg .....	114
Figura 3.19	Imagem de um gel de eletroforese obtido após separação de proteínas de folhas de girassol para uma planta irrigada com solução de selenito. Na figura são exibidos os <i>spots</i> identificados (circulados em vermelho) e os vetores (em azul) que correlacionam os <i>spots</i> desta réplica com aqueles encontrados nas demais réplicas do mesmo grupo de plantas. Os números indicados nas caixas representam referências que auxiliam o <i>software</i> na correlação dos <i>spots</i> .....	115
Figura 3.20	Imagem de um gel de eletroforese obtido a partir de extrato proteico de folhas de girassol tratados com selênio. As regiões demarcadas no gel indicam as áreas inseridas na câmara de ablação. Os círculos amarelos representam os <i>spots</i> onde se identificou a	

	presença de selênio, enquanto os círculos vermelhos representam <i>spots</i> analisados que não apresentaram sinais para este elemento .....	117
Figura 3.21	Sinal analítico obtido para o íon $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ , em contagens por segundo (cps), obtido após ablação do gel de poliacrilamida seco (região número 3, Figura 3.20). A linha tracejada indica a região do gel ablada, enquanto as setas exibem o momento em que o laser foi ligado e desligado, bem como auxiliam visualmente a correlação da imagem com o sinal analítico. Suavização aplicada: média adjacente com janela de 20 pontos .....	118
Figura 3.22	Sinal analítico obtido para o íon $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ , em contagens por segundo (cps), obtido após ablação do gel de poliacrilamida seco (região número 5, Figura 3.20). A linha tracejada indica a região do gel ablada, enquanto as setas exibem o momento em que o laser foi ligado e desligado, bem como auxiliam visualmente a correlação da imagem com o sinal analítico. Suavização aplicada: média adjacente com janela de 20 pontos .....	119
Figura 3.23	Sinal analítico obtido para a $m/z$ 96, em contagens por segundo (cps), obtido após ablação de uma região do gel de poliacrilamida seco sem nenhum <i>spot</i> proteico. Suavização aplicada: média adjacente com janela de 20 pontos .....	119
Figura 4.1	Pastilhas produzidas com o material CRM 100 – <i>Minor and trace elements</i> in beech leaves para determinação	

	de enxofre no referido material por meio da técnica de adição de padrão. O material também foi empregado para calibração do sistema de LA-ICP-MS e possibilitar a determinação da concentração de enxofre no material 1575a – Tomato Leaves e nas plantas do grupo controle e tratadas com selênio cultivadas neste trabalho .....	133
Figura 4.2	Diagrama esquemático exemplificando duas linhas consecutivas utilizadas para análise direta das folhas via LA-ICP-MS. No estudo proposto, a distância entre duas linhas consecutivas foi de 300 $\mu\text{m}$ .....	137
Figura 4.3	Diagrama esquemático exemplificando a rotina empregada para construção do plano (x,y) que serve para formação das imagens. Neste caso, o número de linhas é determinado de acordo com a resolução desejada, bem como em função do tamanho da folha, enquanto o número de pontos é dado em função da velocidade do laser e do método utilizado pelo ICP-MS, que é função do <i>dwell time</i> e número de <i>sweeps</i> ..	139
Figura 4.4	Imagens dos girassóis no sétimo dia de cultivo. Cada pote apresentava 3 plantas, sendo que apenas uma foi mantida após o procedimento de desbaste. Os cotilédones coletados das plantas removidas foram utilizados para avaliar a metodologia empregada para coleta e tratamento de dados por meio da realização de análises qualitativas .....	140
Figura 4.5	Imagem de um cotilédone de girassol exibindo,	

	qualitativamente, a distribuição de selênio no mesmo ..	141
Figura 4.6	Imagem de um cotilédone de girassol exibindo, qualitativamente, a distribuição de enxofre no mesmo .	142
Figura 4.7	Curva de calibração construída utilizando pastilhas produzidas com o material de referência certificado 1575a <i>Tomato Leaves</i> com a faixa de concentração compreendida entre 25 e 1200 mg kg <sup>-1</sup> . Neste caso, levou-se em consideração a concentração inicial de selênio no material, conforme indicado na carta de certificação do mesmo (0,054 ± 0,003 mg kg <sup>-1</sup> de selênio). O coeficiente de correlação linear (r) é igual a 0,9999 .....	143
Figura 4.8	Curva de calibração construída utilizando pastilhas produzidas com o material de referência certificado CRM 100 – <i>Minor and trace elements in beech leaves</i> com a faixa de concentração compreendida entre 5 e 20 mg g <sup>-1</sup> . Neste caso, levou-se em consideração a concentração inicial de enxofre no material, conforme indicado na carta de certificação do mesmo (2,69 ± 0,04 mg g <sup>-1</sup> de enxofre). O coeficiente de correlação linear (r) é igual a 0,9992 .....	145
Figura 4.9	Distribuição de selênio observada em uma folha de girassol coletada ao 29º dia de cultivo após a adição de 106 mg de selênio ao substrato. A curva de calibração foi construída no intervalo de concentração entre 25 e 800 mg kg <sup>-1</sup> . Na parte superior direita da figura pode-se observar uma imagem da folha	

	analisada .....	147
Figura 4.10	Distribuição de enxofre observada em uma folha de girassol coletada ao 29º dia de cultivo após a adição de 106 mg de selênio ao substrato. A curva de calibração foi construída no intervalo de concentração entre 2,7 e 20 mg g <sup>-1</sup> . Na parte superior direita da figura pode-se observar uma imagem da folha analisada .....	149
Figura 4.11	Distribuição de selênio observada em uma folha de girassol coletada ao 45º dia de cultivo após a adição de 174 mg de selênio ao substrato. A curva de calibração foi construída no intervalo de concentração entre 25 e 1200 mg kg <sup>-1</sup> . Na parte superior esquerda da figura pode-se observar uma imagem da folha analisada .....	150
Figura 4.12	Distribuição de enxofre observada em uma folha de girassol coletada ao 45º dia de cultivo após a adição de 174 mg de selênio ao substrato. A curva de calibração foi construída no intervalo de concentração entre 2,7 e 20 mg g <sup>-1</sup> . Na parte superior esquerda da figura pode-se observar uma imagem da folha analisada .....	151
Figura 4.13	Distribuição de selênio observada em uma folha de girassol do grupo controle coletada ao 50º dia de cultivo. A curva de calibração foi construída no intervalo de concentração entre 25 e 800 mg kg <sup>-1</sup> . Na parte superior esquerda da figura pode-se observar	

uma imagem da folha analisada ..... 152

Figura 4.14 Distribuição de enxofre observada em uma folha de girassol do grupo controle coletada ao 50º dia de cultivo. A curva de calibração foi construída no intervalo de concentração entre 2,7 e 20 mg g<sup>-1</sup>. Na parte superior esquerda da figura pode-se observar uma imagem da folha analisada ..... 153



## INTRODUÇÃO

Metais e semi-metais apresentam grande importância para a química que rege os processos biológicos em diferentes organismos, sendo que a compreensão das bases envolvidas nestes processos deve, inevitavelmente, buscar compreender os diferentes mecanismos de interação dos metais com diferentes classes de moléculas. A identificação de sítios ativos em proteínas, a regulação da expressão gênica mediada por íons cobre, ferro e zinco, a compreensão do comportamento de um organismo ou proteína específica submetidos à exposição por metais [1] bem como a identificação da existência de estresse em uma planta causada pela presença ou ausência de tais íons [2, 3] caracterizam exemplos de estudos ligados a esta área de estudo, denominada metalômica.

Como consequência à expansão da pesquisa nesta área, diferentes terminologias surgem no sentido de delinear os diferentes tipos de estudos propostos. Assim, os termos ionômica e metaloproteômica são englobados na definição proposta pela metalômica, a qual é compreendida como o estudo do metaloma, ou seja, das interações e conexões funcionais de íons metálicos e suas espécie com genes, proteínas, metabólitos e outras moléculas em um organismo ou ecossistema [4]. É importante salientar que a simples identificação e/ou quantificação das espécies, sem deixar claro qual a significância ou contribuição dos resultados obtidos para o sistema biológico em estudo, não pode ser considerada como estudo metalômico [4].

A aplicação de estudos ionômicos surge como uma alternativa interessante para elucidar diferentes questões relacionadas a esta área de pesquisa, como, por exemplo, para correlacionar a expressão de um gene em um organismo com sua composição elementar [5]. Por definição, um estudo ionômico visa à determinação das espécies metálicas e semi-metálicas livres em uma célula, tecido, organismo ou fluido com posterior correlação dos resultados com fenômenos ligados ao sistema em estudo [6].

Desta forma, o presente trabalho apresenta como principais objetivos realizar um estudo metalômico em girassóis. Para tanto, buscou-se avaliar plantas irrigadas com selênio ou zinco e a resposta observada para cada grupo de plantas quando comparado a um grupo controle.

Inicialmente, buscou-se otimizar uma metodologia para separação das proteínas das folhas de girassol empregando eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, buscando maximizar a extração das macromoléculas com redução compostos dos interferentes durante as etapas de separação.

O próximo passo no trabalho consistiu na avaliação da distribuição de vários elementos nas diferentes partes das plantas com o objetivo de melhor compreender os mecanismos adotados pelos girassóis para minimizar os problemas causados pela contaminação com selênio ou zinco (estudo ionômico). Vale ressaltar que, neste caso, as plantas utilizadas neste estudo não consistiam no mesmo grupo de plantas utilizado para otimização do procedimento de extração. No entanto, o mesmo se apresentou robusto e pôde ser aplicado sem problemas nesta situação.

Baseando-se nos resultados do estudo ionômico, partiu-se para a avaliação de selênio possivelmente incorporado na estrutura primária das proteínas de folhas de girassol. Neste caso, empregou-se o protocolo de separação por eletroforese em gel desenvolvido na primeira etapa do trabalho, bem como a hifenação LA-ICP-MS para detecção direta de selênio nos *spots* do gel.

Por fim, desenvolveu-se uma metodologia para realização de análises quantitativas diretas em folhas de girassol com o objetivo de avaliar a distribuição de selênio e enxofre nesta região das plantas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Esteban-Fernández, D.; Montes-Bayón, M.; González, E. B.; Gómez, M. M. G.; Palacios, M. A.; Sanz-Medel, A.; *Atomic (HPLC-ICP-MS) and molecular mass spectrometry (ESI-Q-TOF) to study cis-platin interactions with serum proteins*, J. Anal. At. Spectrom., **2008**, 23, 378-384.

- [2] Garcia, J. S.; Gratão, P. L.; Azevedo, R. A.; Arruda, M. A. Z.; *Metal contamination effects on sunflower (Helianthus annuus L.) growth and protein expression in leaves during development*. J. Agric. Food Chem., **2006**, 54, 8623-8630.
- [3] Ullah, R.; Bakht, J.; Shafi, M.; Iqbal, M.; Khan, A.; Saeed, M.; *Phyto-accumulation of heavy metals by sunflower (Helianthus annuus L.) grown on contaminated soil*, Afric. J. Biotechnol., **2011**, 10, 17192-17198.
- [4] Mounicou, S.; Szpunar, J.; Łobinski, R.; *Metallomics: the concept and methodology*, Chem. Soc. Rev., **2009**, 38, 1119-1138.
- [5] Eide, D. J.; Clark, S.; Nair, T. M.; Gehl, M.; Gribskov, M.; Guerinot, M. L.; Harper, J. F.; *Characterization of the yeast ionome: a genome-wide analysis of nutrient mineral and trace element homeostasis in Saccharomyces cerevisiae*, Genome Biol., **2005**, 6, R77-R77-13.
- [6] Szpunar, J.; *Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics*, Analyst, **2005**, 130, 442-465.



## **Capítulo 1**

---

**Desenvolvimento da metodologia para extração e separação das proteínas de folhas de girassol via eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida.**



## **1. OBJETIVO**

O objetivo deste primeiro Capítulo consistiu no desenvolvimento de uma metodologia adequada para separação de proteínas empregando a técnica de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, buscando sempre a eliminação de interferentes. Realizou-se, também, a identificação dos *spots* proteicos obtidos nos géis de eletroforese.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Preparo de amostras vegetais focando separações eletroforéticas**

Diversos trabalhos descrevem protocolos para extração de proteínas nos mais diferentes tipos de amostras vegetais, focando a posterior separação eletroforética em duas dimensões [1-3]. Mesmo assim, são encontradas muitas dificuldades quando se trabalha com tecidos vegetais que ainda não possuem metodologias de extração implementadas [4].

De maneira geral, os trabalhos mais recentes buscam adaptar metodologias de extração já existentes (denominadas de protocolos clássicos) aos problemas e necessidades peculiares de cada amostra, que incluem a idade do vegetal, características do tecido avaliado, bem como, a finalidade do estudo [5, 6].

Referente aos protocolos empregados para o preparo de amostras vegetais, os mesmos têm início com uma etapa de ruptura celular, que na grande maioria das vezes emprega métodos físicos, tais como, maceração [7], ou com o uso da sonicação [8], mas também podem incluir procedimentos alternativos, como a utilização de detergentes, tal como o Triton<sup>®</sup> X-114, facilitando, assim, a extração das proteínas devido ao aumento da solubilidade das mesmas [9].

Comumente, as proteínas de interesse estão presentes em baixas concentrações em uma determinada amostra. Logo, tratamentos posteriores visando à extração de proteínas em uma organela específica podem, por exemplo, ser empregados. Para amostras de folhas o grande problema consiste na proteína ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO) que se apresenta em elevada concentração e mascara as demais, presentes em menor proporção na amostra (esta proteína se apresenta como a análoga da albumina para amostras de origem animal [10]). Para vegetais, a aplicação de extrações sequenciais pode ser uma alternativa bastante interessante para eliminação do problema [11]. No entanto, não existem protocolos específicos para este fim. Assim, para cada amostra, deve-se avaliar as características físicas e químicas das proteínas em questão buscando a otimização.

Etapas de preservação e limpeza das amostras também são de fundamental importância para obtenção de bons resultados e podem incluir o uso de reagentes químicos ou colunas cromatográficas com especificidade [12]. A adição de inibidores de proteases, por exemplo, é interessante, pois minimiza a fragmentação das proteínas ao longo das várias etapas do preparo de amostras. Dentre os compostos mais comuns, empregados para este fim, pode-se citar o fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) ou o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) [5].

O controle da concentração salina na amostra também deve ser destacado. Altas concentrações (superiores a 40 – 50 mmol L<sup>-1</sup>) podem interferir nas separações. No entanto, quando este tipo de problema está presente, podem ser propostas alternativas para sua eliminação. Pode-se empregar, por exemplo, desde procedimento de diálise, que geralmente demandam tempo relativamente longo, até colunas de limpeza específicas para eliminação de interferentes ou etapas de precipitação de proteínas empregando ácido trifluoracético (TFA), por exemplo [13].

Um trabalho bastante interessante focando o preparo de amostras para tecidos vegetais recalcitrantes foi desenvolvido por Saravanan e Rose [14].

Diversas estratégias de extração e purificação de proteínas são discutidas para extração de proteínas de banana, abacate e laranja. Os autores empregam procedimentos de extração que utilizam ácido tricloroacético (TCA), acetona ou extração baseada em fenol para possibilitar a separação e purificação de proteínas com posterior possibilidade de caracterização das mesmas via espectrometria de massas.

Na revisão apresentada por Wang *et al.* [5] os autores enfatizam a aplicação das extrações baseadas na utilização de TCA, fenol ou numa combinação envolvendo as duas estratégias, visando, principalmente, à remoção de pigmentos para diferentes tecidos vegetais.

Em outro trabalho, desenvolvido por Sarma *et al.* [15], a extração baseada em fenol é focada. Como resultados, os autores obtiveram um único procedimento de extração otimizado que pode ser aplicado para separação, com boa resolução e, aparentemente, na ausência de interferentes majoritários, para diferentes tecidos de soja, incluindo folhas, raízes, caules e até sementes, onde a composição das mesmas apresenta-se totalmente distinta daquelas dos demais tecidos mencionados anteriormente.

Já no trabalho desenvolvido por Pirovani *et al.* [16], desenvolveu-se uma metodologia desnaturante para extração de proteínas em folhas de cacau, que combina a aplicação de ultrassom, lavagem do material bruto com TCA e, finalmente, extração das proteínas empregando fenol. Neste caso, a metodologia possibilitou a redução do teor de polissacarídeos na amostra, o que melhorou a resolução dos géis de eletroforese obtidos.

## **2.2. Espectrometria de massas para caracterização de proteínas – ionização empregando MALDI**

A técnica de ionização / desorção de matriz auxiliada por laser (MALDI<sup>1</sup>) foi desenvolvida de maneira paralela por dois grupos de pesquisa (Karas *et al.* [17] e

---

<sup>1</sup> Do inglês, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*.

Tanaka *et al.* [18]) no final da década de 80, revolucionando o estudo de biopolímeros e macromoléculas.

Na prática, a amostra é misturada com um excesso de matriz, que consiste de uma substância orgânica e ácida, que absorva a energia do laser incidente. Geralmente utiliza-se um feixe de N<sub>2</sub> altamente energético (10<sup>6</sup> W cm<sup>-2</sup> de potência) com o comprimento de onda de 337 nm. A mistura é, então, submetida ao laser, com pulsos de curta duração (10-20 ns), possibilitando que uma grande quantidade de energia seja absorvida de maneira eficiente pela matriz e, posteriormente, seja transferida para a amostra de forma controlada [19].

O preparo de amostras para a técnica de MALDI consiste em uma etapa crucial para obtenção de bons resultados. Deve-se ter uma mistura homogênea envolvendo matriz e analito, permitindo que ocorra um processo de ionização onde há a formação dos íons de interesse de maneira estável e reprodutível [20]. Atualmente, o método denominado *dried-droplet method* consiste no protocolo mais empregado para o preparo de amostras utilizando a técnica de MALDI. Neste método, uma solução da matriz é preparada e misturada com a solução do analito. Em seguida, uma gota desta mistura é aplicada na placa de MALDI, resultando em um depósito sólido [4]. Idealmente, este deve se apresentar uniforme e homogeneamente distribuído o que, muitas vezes, não é fácil obter [20].

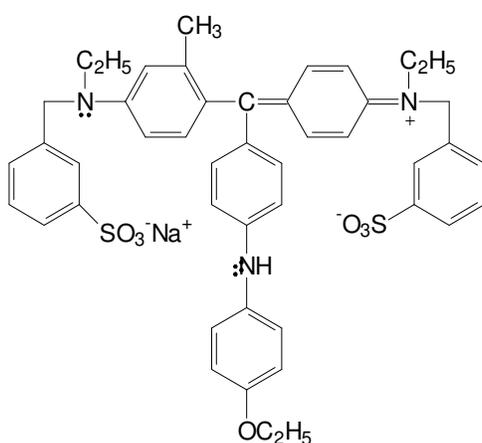
Embora os mecanismos de ionização ainda não se apresentem totalmente elucidados, a técnica possui grande aplicabilidade para a determinação da identidade de proteínas ou até mesmo para caracterização das mesmas, dependendo do analisador de *m/z* empregado.

A técnica é adequada para análise de proteínas previamente isoladas, sendo assim uma alternativa interessante para caracterização de proteínas após a realização de separação eletroforética, diferente da técnica de *electrospray*, onde uma mistura de peptídeos pode ser diretamente analisada utilizando um cromatógrafo a líquido acoplado *on-line* ao equipamento de massas [21].

## 2.3. Quantificação de proteínas – reação de Bradford

Optou-se por realizar a quantificação do teor de proteínas totais empregando o método de Bradford [22] devido às características apresentadas pelo mesmo, que serão descritas a seguir.

O reagente de Bradford é composto por uma mistura que apresenta como componente principal o reagente Azul de Coomassie (CBBG<sup>2</sup>), cuja estrutura é apresentada na Figura 1.1.



**Figura 1.1.** Estrutura do corante Azul de Coomassie, composto que compõe o reagente de Bradford [24].

A reação observada neste caso é baseada no equilíbrio envolvendo as formas catiônica, neutra e aniônica do corante. Como o reagente é preparado em meio ácido, na ausência de proteínas a molécula de Coomassie apresentará os nitrogênios terciários de sua estrutura protonados, sendo que o mesmo absorverá nos comprimentos de onda de 465 e 645 nm. Neste caso, a molécula de CBBG apresenta-se em sua forma catiônica [23].

No entanto, à medida que o reagente entra em contato com as proteínas, principalmente àquelas compostas por cadeias laterais contendo grupamentos básicos ou aromáticos, tem-se o deslocamento do equilíbrio químico mencionado

---

<sup>2</sup> Do inglês, *Coomassie Brilliant Blue G-250*.

anteriormente, conduzindo a molécula do corante, primeiramente para sua forma neutra e, posteriormente, para a forma aniônica. Como consequência, tem-se a redução da absorção nos comprimentos de onda de 465 e 645 nm e passa-se a absorver em 595 nm, comprimento de onda onde é realizada a leitura espectrofotométrica [24, 25].

As principais variáveis envolvidas no processo incluem a concentração de etanol que influi na solubilidade do corante, bem como a concentração de ácido fosfórico: neste caso, baixas concentrações resultam em redução da faixa linear devido ao menor número de moléculas na forma protonada, e elevadas concentrações acarretam na redução da solubilidade em função da dificuldade de conduzir as moléculas para sua forma desprotonada [25, 26].

Alguns cuidados devem ser tomados para proceder a uma análise. Dentre eles, pode-se citar a impossibilidade de determinação de peptídeos ou proteínas com menos de 5 kDa. Outro problema relaciona-se com a interferência gerada por surfactantes [22, 24, 27], que de maneira análoga às proteínas, podem causar a desprotonação das moléculas de CBBG, gerando falso positivo.

Mesmo com as limitações apresentadas, este método espectrofotométrico apresenta-se como um dos mais robustos para a determinação de proteínas totais [27].

### **3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

#### **3.1. Preparo de soluções e limpeza de materiais**

Todas as soluções foram preparadas utilizando reagentes de grau analítico, bem como água deionizada ( $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ), obtida a partir de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, USA).

Após o uso, todos os materiais eram lavados com água deionizada e detergente (Triton<sup>®</sup> X-100) e colocados em banho ácido (ácido nítrico 10% v/v), sendo mantidos nesta solução por, no mínimo, 8 horas. Posteriormente, eram

lavados utilizando água deionizada e secos em estufa, à exceção dos materiais volumétricos que eram secos à temperatura ambiente.

### 3.2. Métodos avaliados para a extração de proteínas

Quatro metodologias foram avaliadas buscando a extração de proteínas das folhas de girassol, a fim de se obter géis de eletroforese com qualidade em termos de resolução e eliminação de interferentes.

Para todas, partiu-se de 1,0 g de material vegetal, que foi submetido à maceração empregando nitrogênio líquido. O material macerado recebeu, então, a adição do tampão de extração de interesse.

As metodologias A e B basearam-se no trabalho de Garcia *et al.* [28] com modificações. Para extração, adicionou-se ao material vegetal 3,0 mL de uma solução extratora composta por cloreto de 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol (Tris-HCl) 125 mmol L<sup>-1</sup> (pH 6,8), dodecilsulfato de sódio (SDS) 1,0% (m/v), 1,0% (v/v) glicerol e 0,5% (v/v) β-mercaptoetanol. O material, na presença da solução extratora, foi misturado com auxílio de um pistilo por ca. 20 min, sendo, então, centrifugado a 8500 × g (4 °C) por 5 min com o emprego de uma ultracentrífuga (Bio-Spin-R, BioAgency, São Paulo, Brasil).

Para a limpeza e precipitação das proteínas, baseou-se no trabalho de Carpentier *et al.* [29]. Para a metodologia A uma solução gelada 100 mmol L<sup>-1</sup> de acetato de amônio em metanol foi empregada, enquanto para a metodologia B fez-se uso de uma solução composta por 20% (m/v) TCA e 0,2% (m/v) de ditioneitol (DTT) em acetona, também gelada.

Nas duas metodologias avaliadas, os precipitados formados mantidos incubados a -20 °C durante 12 h e, posteriormente, centrifugados a 1800 × g (4 °C) por 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o sólido lavado três vezes com solução gelada de acetona contendo 0,2% (m/v) DTT. Após cada lavagem, a mistura era mantida incubada a -20 °C durante uma hora antes de ser centrifugada novamente a 1800 × g por 5 min (4 °C).

Ao final, o precipitado obtido foi dissolvido em tampão apropriado para eletroforese bidimensional em gel de poli(acrilamida), cuja composição é descrita nesta Tese no item 2.4.1, ou então, ressolubilizado em tampão fosfato 100 mmol L<sup>-1</sup> pH 7.2 para quantificação do teor proteico total.

A metodologia C baseou-se em um procedimento clássico de extração de proteínas empregando TCA/acetona, amplamente utilizado até os dias atuais para extração de proteínas em amostras vegetais [30]. Para este protocolo 4,0 mL de um tampão de extração contendo 10% (m/v) TCA e 0,07% (v/v) β-mercaptoetanol em acetona gelada foi adicionado ao material vegetal. Esta mistura foi mantida a -20 °C por 12 h sendo, posteriormente, centrifugada por 5 min a 8700 × g (4 °C). O material sólido obtido após a centrifugação foi lavado 8 vezes com acetona gelada e seco com o emprego de N<sub>2(g)</sub>. Ao material seco, adicionou-se 250 µL de tampão para eletroforese. A mistura foi agitada por 5 min empregando um misturador do tipo vórtex (Thermolyne, 37600 Mixer, Dubuque, Iowa, EUA), sendo, então, centrifugada a 8500 × g por 5 min. Ao final da centrifugação o sobrenadante foi coletado e utilizado para realização do procedimento de quantificação e eletroforese em gel.

Por fim, a metodologia D também consiste em outro procedimento clássico empregado com muito sucesso até os dias atuais para extração de proteínas em tecidos vegetais. O protocolo utilizado baseou-se no trabalho desenvolvido por Delaplace *et al.* [31] com modificações. Experimentalmente, 4,0 mL do tampão extrator composto por 700 mmol L<sup>-1</sup> de sacarose, 50 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA, 100 mmol L<sup>-1</sup> de KCl, 10 mmol L<sup>-1</sup> de tioureia, 50 mmol L<sup>-1</sup> de DTT, 2 mmol L<sup>-1</sup> PMSF dissolvidos em tampão Tris-HCl 500 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,5 foram adicionados ao material vegetal. As folhas moídas na presença do tampão foram misturadas por 10 min e centrifugadas a 6000 × g (4 °C) por 10 min.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e recebeu a adição de 5,0 mL do tampão extrator descrito anteriormente, no entanto, o mesmo foi saturado com fenol. A mistura foi homogeneizada e centrifugada a 6000 × g (4 °C) por 10 min. A fase fenólica (fase superior) foi, então, coletada e extraída duas

vezes com a adição de 5,0 mL de tampão de extração. A mistura foi centrifugada a  $6000 \times g$  (4 °C) por 10 min. Ao final, a fase fenólica foi precipitada com solução gelada  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  de acetato de amônio em metanol e mantida incubada por 12 horas a -20 °C. Vale ressaltar que nesse procedimento a etapa de precipitação é bastante lenta e não ocorre de imediato.

A mistura foi centrifugada a  $8700 \times g$  (4 °C) por 5 min e o precipitado lavado com 4,0 mL de acetato de amônio  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  em metanol, sendo, então, ressolubilizado em tampão próprio para quantificação de proteínas totais ou eletroforese bidimensional em gel.

### **3.3. Metodologia empregada para quantificação do teor de proteínas totais**

Para quantificação do teor proteico nos extratos obtidos, realizou-se, primeiramente, a solubilização dos precipitados proteicos com tampão fosfato  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 7,2.

Para determinação do teor proteico empregou-se o método de Bradford [22]. O reagente foi preparado em laboratório momentos antes de se realizar a quantificação, evitando, desta forma, a degradação do mesmo. O seu preparo consistiu em uma solução contendo 0,01% (m/v) do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 – CBBG (J. T. Baker, Phillipsburg, EUA), 5,0% (v/v) de etanol anidro (J. T. Baker, México) e 10,0% (v/v) de ácido fosfórico 85% (v/v) (Merck, Darmstadt, Alemanha), adicionados, nesta sequência a um balão volumétrico, que tinha seu volume aferido utilizando-se água deionizada. Posteriormente, esta solução foi mantida sob agitação durante 15 min para garantir a solubilização adequada do corante CBBG, sendo, então, filtrada uma vez e estocada ao abrigo da luz.

Curvas analíticas de calibração foram construídas utilizando padrão de albumina bovina fração V (Merck, Darmstadt, Alemanha) em tampão fosfato  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 7,2.

As determinações espectrofotométricas foram realizadas em batelada, em

um espectrofotômetro Micronal modelo B 582 (São Paulo, Brasil), no comprimento de onda de 595 nm, utilizando cubetas de plástico, uma vez que cubetas de vidro ou quartzo causam a adsorção do reagente em suas paredes [32].

### **3.4. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida**

Os reagentes utilizados para a realização dos procedimentos de eletroforese em gel apresentavam grau de pureza adequado para uso com a técnica sendo todos eles obtidos da Amersham Biosciences (Uppsala, Suíça).

Para realização dos procedimentos experimentais, os precipitados obtidos foram, inicialmente, dissolvidos em 250  $\mu\text{L}$  de tampão, adequado para a separação das proteínas pela técnica de eletroforese em gel (denominado nesta tese de tampão para eletroforese). Este tampão era composto por uma mistura contendo 7,0 mol  $\text{L}^{-1}$  de ureia; 2,0 mol  $\text{L}^{-1}$  de tiourea; 2,0% (m/v) de 3-[(3-cloramidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato (CHAPS); 0,5% (v/v) de anfólitos com pH variando na faixa entre 3 e 10; 1,0% (m/v) de DTT e 0,002% (m/v) de azul de bromofenol. Para auxiliar na solubilização das mesmas, empregou-se um misturador do tipo vórtex. Vale ressaltar que alterações na composição deste tampão podem ser consideradas, principalmente no que se refere à concentração de tiourea (máximo de 2,0 mol  $\text{L}^{-1}$ ) e ureia (máximo de 9,0 mol  $\text{L}^{-1}$ , desde que na ausência de tiourea). O objetivo neste caso é obter um tampão que permita solubilizar totalmente as proteínas que se deseja separar.

#### **3.4.1. Separação eletroforética – primeira dimensão**

A primeira dimensão da separação eletroforética de proteínas, baseada no ponto isoelétrico das macromoléculas empregou fitas com gel imobilizado sobre uma superfície plástica (Immobiline™ DryStrip Amersham Biosciences, Uppsala, Suíça) com 13 cm de comprimento e faixa de pH compreendida entre 3 e 10.

As fitas foram mantidas sob hidratação durante 12 h em óleo mineral na

presença de 250 µL de amostra previamente solubilizada em tampão para eletroforese. Após o período de hidratação, conduzia-se a focalização isoelétrica, empregando, para tanto, um focalizador isoelétrico (Multiphore II system, Amersham Biosciences, Uppsala, Suíça). As condições de corrida empregadas consistiam em quatro etapas básicas, de acordo com a Tabela 1.1.

**Tabela 1.1.** Condições empregadas durante as etapas de focalização isoelétrica das proteínas.

<b>Etapa</b>	<b>Condição</b>	<b>Voltagem acumulada</b>
1	0 – 500 V	0,5 kWh
2	500 – 1000 V	0,8 kWh
3	1000 – 10000 V	11,3 kWh
4	10000 V	7,0 kWh

De acordo com as características da amostra, as condições apresentadas na Tabela 1.1 podem apresentar pequenas alterações frente aos valores descritos, principalmente para as etapas 1 e 4. Para a etapa 1, não se deve ultrapassar 500 V para que seja possível haver a desagregação das proteínas. Pode-se propor a aplicação desta etapa por um maior período de tempo minimizando, então, os efeitos adversos causados por amostras contendo altas concentrações salinas. Especificamente, neste caso, não se observou qualquer problema relacionado com altas concentrações de íons, até mesmo porque as amostras foram solubilizadas em tampão adequado para eletroforese. Com relação à etapa 4, a voltagem acumulada para a mesma, de modo geral, não precisa superar 3,0 kWh. No entanto, neste caso, observou-se que a focalização não se dava por completo. Assim, elevou-se esta etapa para 7,0 kWh para garantir a focalização adequada das proteínas.

### 3.4.2. Separação eletroforética – segunda dimensão

Para realizar a separação das proteínas na segunda dimensão, primeiramente, faz-se necessário desnaturar as mesmas para que a separação ocorra em função de suas massas molares. Assim, realiza-se a redução das ligações dissulfeto formadas entre grupamentos sulfidríla de resíduos de cisteína. Experimentalmente, removeu-se as fitas contendo o gel imobilizado do equipamento de focalização isoeletrica, sendo que as mesmas foram, numa primeira etapa, mergulhadas em uma solução de equilíbrio contendo a seguinte composição: 50 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8,8; 6,0 mol L<sup>-1</sup> de ureia; 30% (v/v) glicerol; 2,0% (m/v) SDS na presença de 1,0% (m/v) DTT. As fitas permaneceram em contato com esta solução por 15 min sob agitação constante a 120 rpm.

A segunda etapa do tratamento das fitas consistiu na alquilação das cadeias proteicas, após a etapa de redução, empregando iodoacetamida. A alquilação das cadeias impede que grupamentos sulfidríla de cisteínas vizinhas sejam reoxidados, ocorrendo novamente o enovelamento das proteínas. Neste caso, a solução de alquilação empregada era composta pela mesma solução de equilíbrio utilizada na etapa de redução, exceto pela presença de DTT, substituído por 2,5% (m/v) iodoacetamida.

Géis de poliacrilamida com concentração de 12,5% (m/v) em acrilamida foram preparados de acordo com os volumes das misturas apresentadas na Tabela 1.2.

A mistura contendo acrilamida foi adicionada em um sistema de placas de vidro – Ettan™ Rubby (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) – com 1,0 mm de espessura entre as mesmas. Após a polimerização completa dos géis, realizou-se a inserção das fitas utilizadas para focalização isoeletrica das proteínas na parte superior das placas seguido da vedação do sistema gel/fita com solução contendo 0,5% (m/v) de agarose e 0,002% (m/v) de azul de bromofenol.

**Tabela 1.2.** Composição da mistura utilizada para preparo dos géis de poli-acrilamida com concentração de 12,5% (m/v) em acrilamida, utilizados nas separações proteicas.

Solução	%	Composição
Monômero	41,7	30% (m/v) acrilamida; 0,8% bisacrilamida
Tampão Tris-HCl	25,0	1,5 mol L <sup>-1</sup> Tris base com pH ajustado em 8,8 empregando HCl concentrado
SDS	1,0	Solução 10% (m/v)
Persulfato de amônio	0,5	Solução 10% (m/v)
TEMED	0,033	A partir do reagente concentrado

Empregou-se como padrões proteicos para a segunda dimensão de separação, as seguintes proteínas: fosforilase b (97,0 kDa); albumina (66,0 kDa); ovalbumina (45,0 kDa); anidrase carbônica (30,0 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4 kDa). As condições de corrida empregadas para separação na segunda dimensão consistiram na aplicação de uma voltagem constante de 90 V e corrente de 25 mA por gel.

Para revelação dos *spots* proteicos utilizou-se, primeiramente, uma mistura composta por 40% (v/v) etanol, 10% (v/v) ácido acético, 50% água deionizada. Os géis foram mantidos nesta mistura por 1 h sob agitação constante (120 rpm). Em seguida, foram imersos em água deionizada por 30 min sob agitação (120 rpm). Nesta etapa, a água deionizada foi substituída a cada 10 min. Por fim, adicionou-se uma mistura reveladora composta por: 8,0% (m/v) sulfato de amônio; 1,6% (v/v) ácido fosfórico; 0,08% (m/v) do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 e 25% (v/v) metanol. Os géis foram, então, mantidos nesta mistura por 48 h.

Para digitalização dos géis, empregou-se um digitalizador de imagens – ImageScanner II (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) – operando com resolução de 300 dpi. Para tratamento das imagens obtidas, empregou-se o software ImageMaster 2D Platinum 6.0 software (GeneBio, Geneva, Suíça).

### 3.5. Preparo de amostras para análises por espectrometria de massas

Para proceder com as análises por espectrometria de massas com intuito de identificar as proteínas presentes nos *spots* proteicos, faz-se necessário realizar a digestão enzimática das mesmas. Para tanto, empregou-se uma resina com afinidade por peptídeos – Montage<sup>®</sup> In-Gel digest<sub>ZP</sub> kit (Millipore, MA, EUA). Tal resina apresentava-se inserida em uma placa de plástico própria para digestão de proteínas presentes em géis de eletroforese.

Para iniciar o procedimento de digestão enzimática, os *spots* foram recortados dos géis (*spots* com diâmetros  $\leq 2$  mm) e inseridos na placa contendo as colunas para digestão enzimática. A primeira etapa do procedimento consistiu na remoção do excesso de água da matriz de poliacrilamida por meio da aplicação de vácuo. Em seguida, realizou-se à remoção do corante utilizado para revelar os *spots* proteicos. A Tabela 1.3 apresenta as soluções e reagentes utilizados nesta etapa, bem como o tempo de incubação empregado. Vale ressaltar que após o término do tempo de incubação as soluções são removidas empregando-se vácuo.

**Tabela 1.3.** Soluções/reagentes, volumes empregados e tempo de incubação utilizados na etapa de remoção do corante dos *spots* proteicos. Todas as etapas são realizadas à temperatura ambiente.

Solução	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Tempo de incubação (min)
25 mmol L <sup>-1</sup> bicarbonato de amônio / 5% acetoneitrila	100	30
25 mmol L <sup>-1</sup> bicarbonato de amônio / 50% acetoneitrila. Procedimento realizado 2 vezes	100	30
Acetoneitrila	200	10

A etapa seguinte do procedimento consistiu na adição da enzima para realizar o procedimento de digestão enzimática propriamente dito. Neste caso, empregou-se a tripsina (Promega Madison, EUA) como enzima para clivagem das proteínas em peptídeos. Neste caso, resuspendeu-se 20 µg de tripsina com 200 µL de ácido clorídrico 1,0 mmol L<sup>-1</sup>, seguido da adição de uma solução 25 mmol L<sup>-1</sup> de bicarbonato de amônio para tamponamento do meio. Realizou-se, então, a adição de 15 µL desta solução a cada *spot*, totalizando *ca.* 166 ng de enzima para cada amostra a ser digerida. Esta solução permaneceu em contato com as amostras por 3 h, incubadas a 37 °C.

Por fim, realizou-se as etapas de condicionamento das colunas, extração dos peptídeos do interior da matriz de poliacrilamida e eluição dos mesmos após interação com a resina. A Tabela 1.4 apresenta as soluções utilizadas para cada uma destas etapas, bem como as condições experimentais empregadas.

**Tabela 1.4.** Soluções/reagentes, volumes e tempo de incubação empregados nas etapas realizadas após a digestão triptica das proteínas. A etapa de condicionamento da coluna é realizada a 37 °C e as demais à temperatura ambiente.

<b>Etapa</b>	<b>Solução</b>	<b>Volume (µL)</b>	<b>Tempo de incubação (min)</b>
Condicionamento da coluna	Acetonitrila adicionada diretamente na resina	8	15
Extração dos peptídeos	0,2% (v/v) TFA	130	30
	0,2% (v/v) TFA. Realizado 2 vezes	100	0
Eluição dos peptídeos	Acetonitrila	20	0

### 3.5.1. Obtenção dos espectros

Para as análises das proteínas por espectrometria de massas, utilizou-se 1,0 µL do digerido obtido ao final do procedimento de digestão triptica. As amostras foram, então, misturadas na proporção de 1:1 (v/v) com a matriz da técnica de MALDI (uma mistura contendo 1,0% (v/v) do ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, 0,1% de TFA dissolvidos na mistura acetonitrila:água na proporção de 1:1).

Os espectros de massa foram adquiridos em um equipamento MALDI-Q-TOF (Waters – Micromass, Manchester, Reino Unido). Todos foram obtidos no modo positivo (LDI+) e correção de *LockMass* realizada com ácido fosfórico 0,1% (v/v) empregando os seguintes parâmetros: frequência do laser de 20 Hz, faixa de massa entre 880,0 e 3000,0 Da, discriminação de massas de 200 Da, tempo de varredura de 2 s., 10000 de resolução no modo “V” e voltagem de placa microcanal (MCP) ajustada em 2100 V. Cada espectro foi coletado por dois segundos e acumulados durante ca. 2 min. Argônio foi empregado como gás colisional e a faixa típica de energia de colisão entre 34 – 161 eV foi utilizada. O instrumento foi controlado por meio do software MassLynx 4.1.

### 3.5.2. Tratamento dos dados

Para tratamento dos dados obtidos via espectrometria de massas e correlação dos mesmos por homologia empregou-se primeiramente o programa MASCOT Distiller (Matrix Science, Londres, Reino Unido), seguido do programa MASCOT (Matrix Science, Londres, Reino Unido) [33]. Maiores detalhes relacionados com a finalidade de cada programa, bem como estratégias e sequências de buscas empregadas para identificação das proteínas serão discutidas em detalhe na seção de resultados e discussão.

O banco de dados de gene (sequências de mRNA) de girassol utilizado

pelo software MASCOT para as buscas das proteínas por homologia foi obtido a partir de um servidor público de ftp - Plant Genome DataBase [34]. O banco de dados compilado apresentava 151425 sequências EST para o gênero *Helianthus*, sendo 94115 para a espécie *annuus*, 35720 para a espécie *argophyllus* e 21590 para a espécie *ciliaris*, possibilitando ampliar, desta forma, a extensão de busca para proteínas.

Devido às estratégias empregadas para busca, bem como pequena quantidade de informação presente em banco de dados para o gênero *Helianthus*, não foram empregados espectros de *fingerprinting* no tratamento de dados e nas buscas realizadas, pois os mesmos não apresentam informações suficientes para gerar uma resposta conclusiva sob a identidade da proteína a ser avaliada. Desta forma, somente os espectros de MS/MS foram utilizados para este fim. Os parâmetros de busca empregados neste caso incluíram a oxidação das metioninas como modificação variável e a carbamidometilação das cisteínas como modificação fixa. Este último parâmetro deve ser assim definido como consequência do procedimento de alquilação das cisteínas empregando iodoacetamida (item 2.4.2). Tolerâncias máximas de  $\pm 0,1$  Da foram aceitas para correlação entre as massas teórica e experimental dos peptídeos identificados.

Por fim, a ausência de uma clivagem durante a etapa de digestão enzimática também foi considerada pelo programa. Sabe-se que a tripsina apresenta como sítios de clivagem lisinas e argininas (desde que não sejam precedidos de prolina). No entanto, durante a etapa de digestão enzimática podem ocorrer falhas e alguns sítios de clivagem podem não ser “atacados” pela enzima. Desta forma, deve-se informar ao programa um valor de tolerância onde se pode encontrar lisinas e argininas inseridas no interior da sequência de um peptídeo.

Para conclusão das buscas de correlação por homologia empregou-se o banco de dados Blastp [35].

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Quantificação do teor de proteínas totais

A técnica de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida exige a aplicação de uma massa de proteína que, geralmente, se situa no intervalo compreendido entre 300 e 500  $\mu\text{g}$ , dependendo da amostra em questão. Sendo assim, as massas de proteína obtidas ao final dos procedimentos de extração e purificação foram determinadas, exceto para a metodologia C. Neste caso, obteve-se ao final do processo de extração grande quantidade de material insolúvel que, certamente, não era composto apenas por proteínas. Os resultados obtidos para as demais metodologias são apresentados na Tabela 1.5.

**Tabela 1.5.** Massas de proteína extraída por grama de material vegetal, obtidas após aplicação dos protocolos de extração A, B e D. Número de réplicas (extrações):  $n = 3$ .

Protocolo	Massa proteica obtida por grama de material vegetal ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
A	$525 \pm 33$
B	$448 \pm 31$
D	$484 \pm 30$

Pode-se observar que a massa de proteína obtida ao final dos protocolos empregados é relativamente baixa, frente a outros protocolos empregados para extração de proteínas em outras matrizes. É interessante mencionar que as

perdas ao longo do preparo de amostras para materiais vegetais é sempre elevada, uma vez que os protocolos de extração são relativamente extensos e empregam diversas etapas analíticas, tais como precipitações e lavagens visando à eliminação de interferentes e que acarretam em perdas de analito. Apenas para ilustrar, a metodologia C, que consistiu na metodologia mais simples empregada (quando se avalia os reagentes utilizados e as etapas analíticas envolvidas) não foi suficiente para eliminação de grande parte dos interferentes da amostra.

## **4.2. Perfis obtidos para os géis de eletroforese**

O perfil eletroforético para cada uma das quatro metodologias avaliadas é apresentado a seguir, sendo também discutidas algumas particularidades relativas a cada um.

### **4.2.1. Metodologia A**

Neste caso, optou-se por empregar um tampão com concentração de SDS de 1,0% (m/v), o que pode ser considerado como uma concentração relativamente elevada deste surfactante quando comparado com os tampões geralmente empregados para extração de proteínas previamente às separações eletroforéticas. Neste caso, dois fatores devem ser ponderados: elevando a concentração do tensoativo no meio eleva-se a concentração de proteínas solubilizadas, principalmente àquelas com maior caráter hidrofóbico, tais como as proteínas de membrana. Em contrapartida, pode existir limitação no que se refere à etapa de focalização isoeétrica, uma vez que o SDS é um surfactante aniônico. Esta limitação existe pois o excesso de cargas no meio conduz ao aquecimento das fitas devido ao efeito Joule (como a focalização ocorre com as fitas imersas

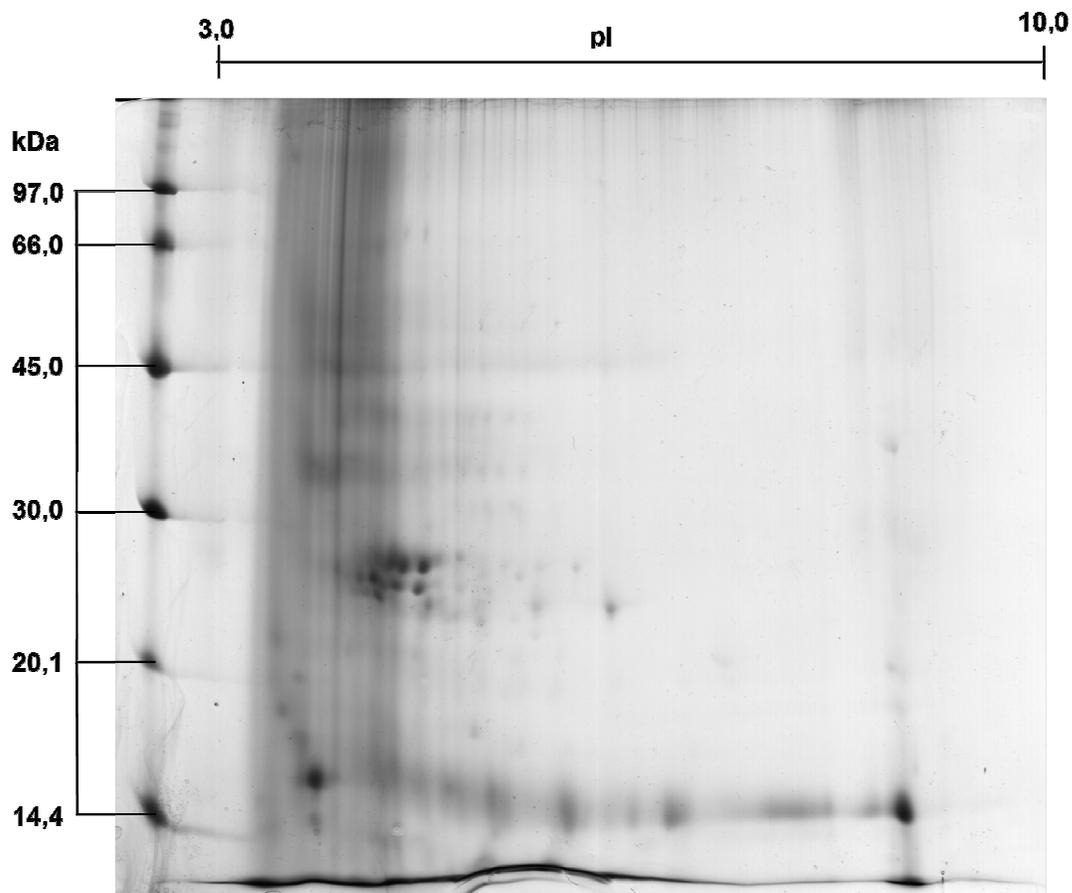
em óleo mineral, as mesmas podem sofrer degradação do gel imobilizado em função do aumento da temperatura do óleo). Mesmo considerando etapas prévias de precipitação, os resíduos do surfactante podem inviabilizar a separação em função do ponto isoelétrico das proteínas.

Felizmente, não se observou nenhum problema relacionado com o aquecimento das fitas durante a separação em função do ponto isoelétrico das proteínas.

Outro aspecto que deve ser mencionado é o emprego de  $\beta$ -mercaptoetanol. Embora este composto apresente menor eficiência como agente desnaturante, quando comparado ao DTT, o mesmo foi utilizado pois sua ação é potencializada na presença de SDS.

A Figura 1.2 apresenta um gel obtido após aplicação desta metodologia. Nela pôde-se detectar a presença de apenas 41 *spots*, bem como de uma faixa escura em torno do ponto isoelétrico 4 que pode ser atribuída a presença de interferentes, muito provavelmente compostos fenólicos.

O pequeno número de *spots* obtido segue em desconformidade às expectativas, uma vez que a Tabela 1.5 revela que este protocolo apresentou a maior quantidade de proteínas extraídas. No entanto, algumas considerações podem justificar esta questão. Primeiramente, pode-se mencionar a possibilidade de existir uma elevada concentração de proteínas de baixa massa molecular e que não estão na faixa de massa molecular para os géis preparados (entre 96,0 e 14,4 kDa). Outra questão consiste no fato de que a presença de interferentes pode ter causado limitações para a separação das proteínas, principalmente na etapa de focalização isoelétrica, impedindo, por exemplo, a desagregação das mesmas no início do procedimento.



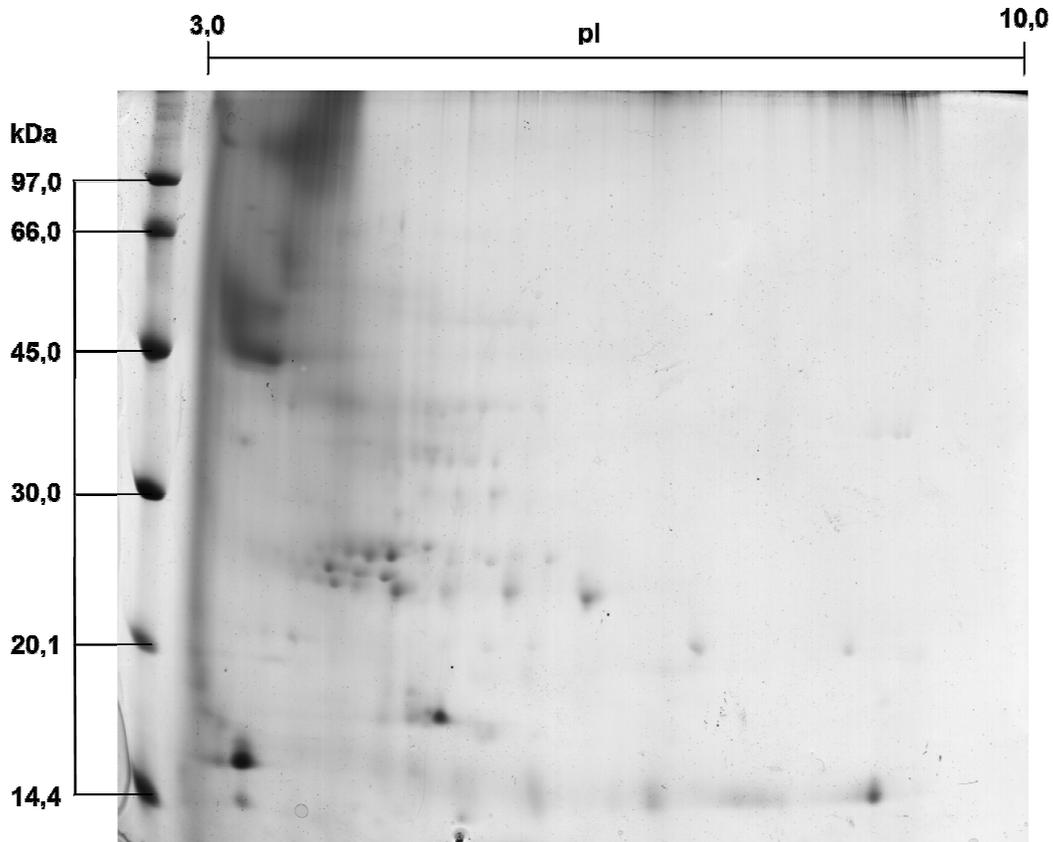
**Figura 1.2.** Perfil do gel de eletroforese obtido após extração de proteínas empregando a metodologia A. A massa de proteína aplicada no gel foi de 485 µg.

#### 4.2.2. Metodologia B

A metodologia B difere daquela apresentada anteriormente, apenas no agente precipitante empregado. O gel apresentado na Figura 1.3 representa o perfil eletroforético obtido para esta metodologia.

Com a utilização desta metodologia pôde-se identificar 50 *spots* proteicos, ou seja, o número de proteínas extraídas foi praticamente igual àquele observado com a metodologia A. Observa-se que o emprego da mistura 20,0% (m/v) TCA, 0,2% (m/v) DTT em acetona bem como a posterior lavagem do precipitado obtido

utilizando 0,2% (m/v) DTT em acetona foi mais efetiva para remoção de interferentes (a faixa escura ao longo do ponto isoelétrico 4 foi reduzida).



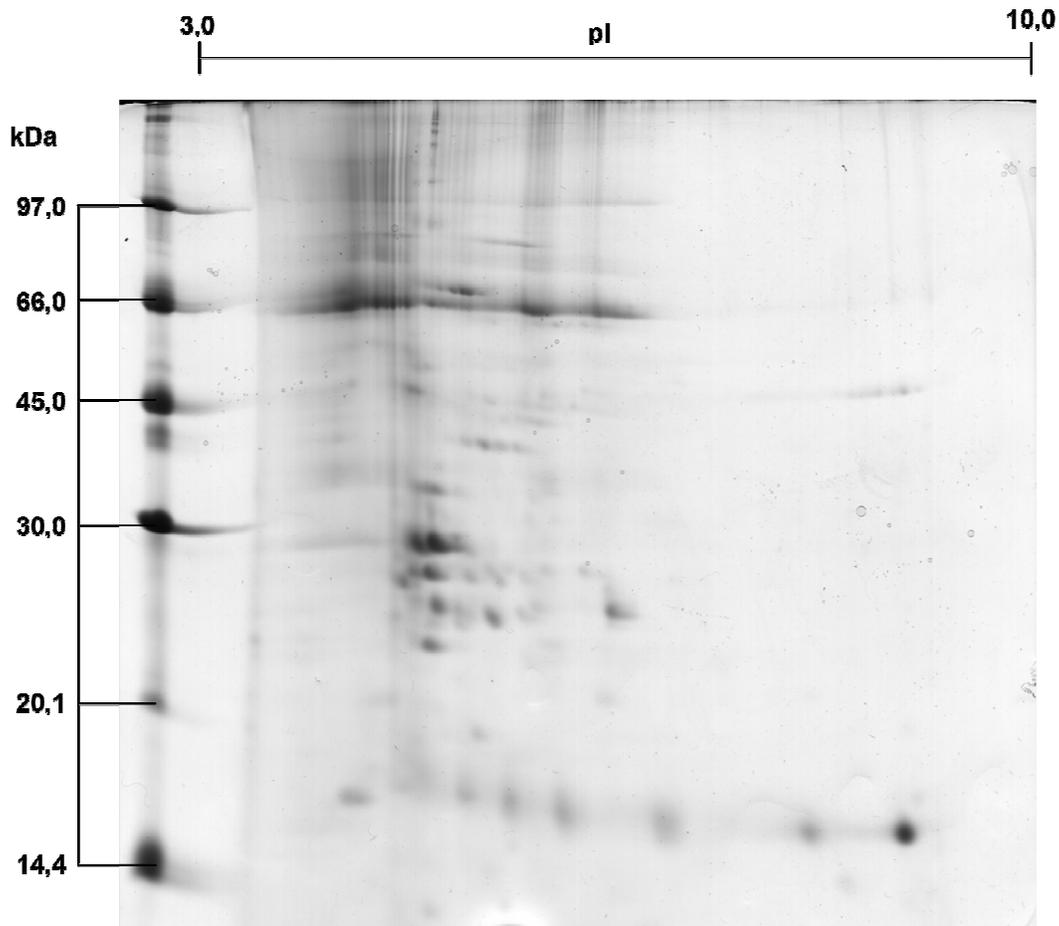
**Figura 1.3.** Perfil do gel de eletroforese obtido após extração de proteínas empregando a metodologia B.

### 4.2.3. Metodologia C

Embora a metodologia empregando TCA/acetona seja considerada clássica para purificação de proteínas e remoção de interferentes em matrizes vegetais complexas, a mesma não apresentou resultados satisfatórios. A Figura 1.4 apresenta o perfil eletroforético para a amostra preparada utilizando este protocolo.

Pode-se observar que, embora a qualidade do gel tenha melhorado sob o

ponto de vista da eliminação de interferentes, ainda existem problemas relacionados com o arraste de proteínas, que podem ser causados pela presença de compostos fenólicos, ligninas, pigmentos em geral, dentre outros, que causam problemas na separação. Isto pode ser observado principalmente na região com massa molar superior a 66 kDa.

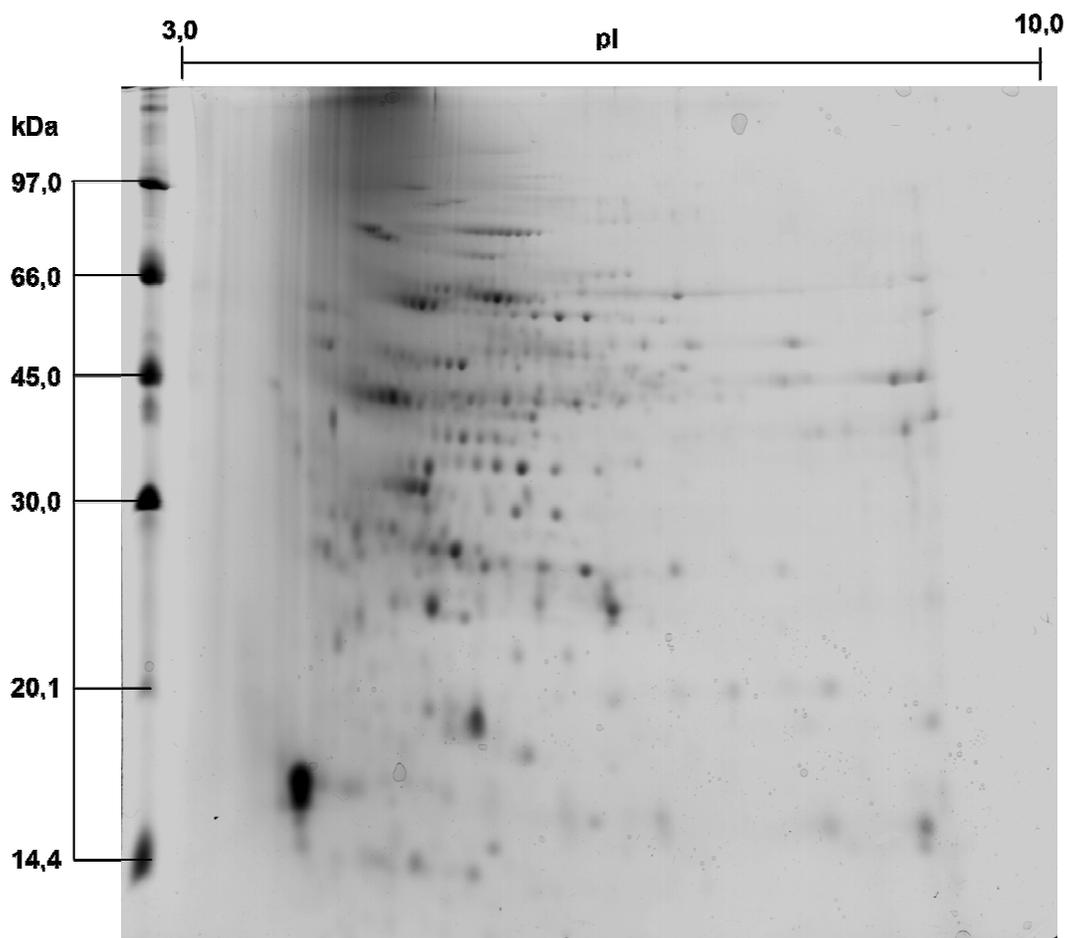


**Figura 1.4.** Perfil do gel de eletroforese obtido após extração de proteínas empregando a metodologia C.

Para esta metodologia, pode-se identificar a presença de 76 *spots* proteicos, bem como outras regiões que apresentaram a presença de proteínas, mas não puderam ter os *spots* definidos devido ao arraste observado.

#### 4.2.4. Metodologia D

O preparo de amostras empregando extração com fenol apresentou o resultado mostrado na Figura 1.5. Como pode ser observado, com o emprego desta metodologia aumentou-se a resolução, quando comparado aos demais protocolos avaliados. Ao final, pôde-se identificar a presença de 244 *spots* proteicos.



**Figura 1.5.** Perfil do gel de eletroforese obtido após extração de proteínas empregando a metodologia D.

Algumas considerações com relação a esta metodologia de extração de proteínas devem ser mencionadas. Inicialmente, no que tange a ausência de SDS no tampão extrator para facilitar a solubilização das proteínas. A eliminação do

surfactante neste caso foi possível devido ao fato da solução extratora apresentar em sua composição tiourea bem como compostos iônicos, tal como KCl [36]. Diferente das proteínas de soja ou amendoim, as proteínas de girassol são altamente solúveis em soluções com altas concentrações salinas, como consequência do efeito *salting-in* [29, 36]. Vale ressaltar que a presença de compostos iônicos não causou problemas com relação à focalização isoelétrica das proteínas.

Com relação ao fenol, o mesmo contribui de maneira bastante significativa na solvatação das proteínas e remoção de compostos interferentes, tal como os ácidos nucleicos presentes nas células do material vegetal. Este efeito é observado uma vez que o fenol atua como agente dissociante, reduzindo a agregação entre proteínas e moléculas interferentes [29, 37]. Além disso, a adição de sacarose se faz necessária para possibilitar a completa formação da fase rica em fenol (fase superior) por meio do controle de densidade das fases.

Uma vez que o pH do meio se apresentava próximo de 7,0, um inibidor de protease foi utilizado (PMSF) para evitar, ou pelo menos minimizar, a formação de produtos de degradação. Esta questão será abordada novamente durante a avaliação dos dados obtidos por espectrometria de massas.

Por fim, deve-se mencionar que não foi empregado um reagente adsorvente de fenóis e polifenóis tal como a polivinilpirrolidona (PVP). Geralmente, em amostras vegetais, a presença destes interferentes se dá em grande quantidade. No entanto, a ação de reagentes adsorventes é mais efetiva quando se trabalha em baixos valores de pH. Como neste caso empregou-se tampão com pH próximo a 7,0, sua presença não contribui de maneira significativa para limpeza da amostra.

### **4.3. Identificação das proteínas por espectrometria de massas**

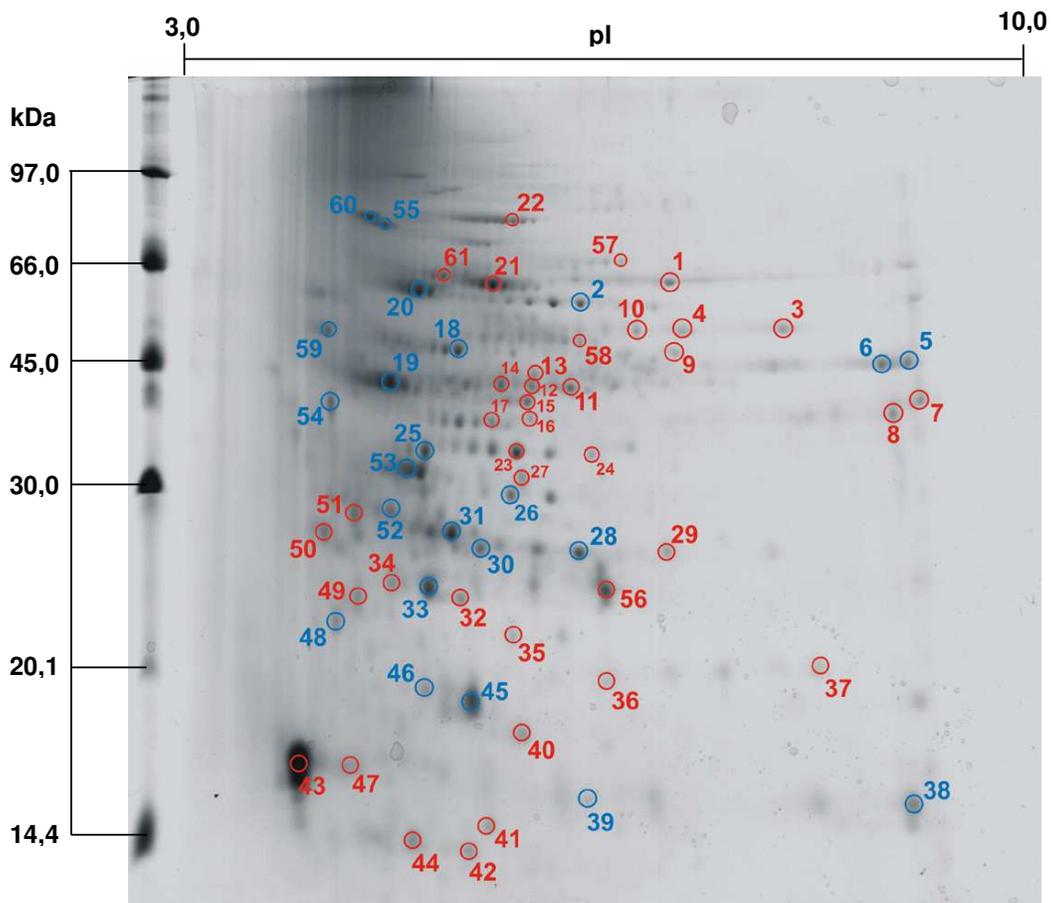
Considerando que o melhor perfil eletroforético foi obtido para a metodologia D, partiu-se para a identificação de alguns dos *spots* proteicos. As

proteínas avaliadas por espectrometria de massas são indicadas no gel de eletroforese apresentado na Figura 1.6.

A questão da identificação de proteínas de girassol não se apresenta como uma tarefa simples quando comparada, por exemplo, à caracterização de proteínas de soro humano ou soja, uma vez que o gênero *Helianthus* não apresenta um banco de dados extenso com proteínas caracterizadas. Dados obtidos a partir do ExPASy Proteomic Databank [38] fornecem uma lista contendo apenas 235 entradas já revisadas para proteínas ou fragmentos de proteínas do gênero *Helianthus*. Assim, a identificação, a partir de um gel de eletroforese, empregando um banco de dados tão restrito, não ocorreria de maneira efetiva e, portanto, não justifica o emprego de tempo e recursos financeiros para sua realização.

Assim, optou-se por realizar a identificação das proteínas empregando correlações por homologia, ou seja, determinou-se a identidade da proteína em questão baseando-se em uma proteína com a mesma identidade, mas pertencente a outro organismo.

Para realizar este tipo de identificação foi necessária a obtenção de um banco de dados de genoma para o gênero *Helianthus*. Como foi discutido na seção experimental, três espécies foram utilizadas (*annuus*, *argophyllus* e *ciliaris*), ampliando, assim, a possibilidade de correlação com os dados experimentais. Esta compilação foi adotada uma vez que bancos de dados de genoma apresentam, como limitação, o fato de serem incompletos. Dependendo das condições de cultivo dos girassóis utilizados (temperatura, características do solo, iluminação, umidade), bem como idade da planta, muitos genes apresentam-se inativos. Assim, quando se realiza a determinação das sequências de mRNA da planta, não se identificam sequências referentes às proteínas que não estão sendo expressas pelo organismo, o que acaba restringindo as informações.



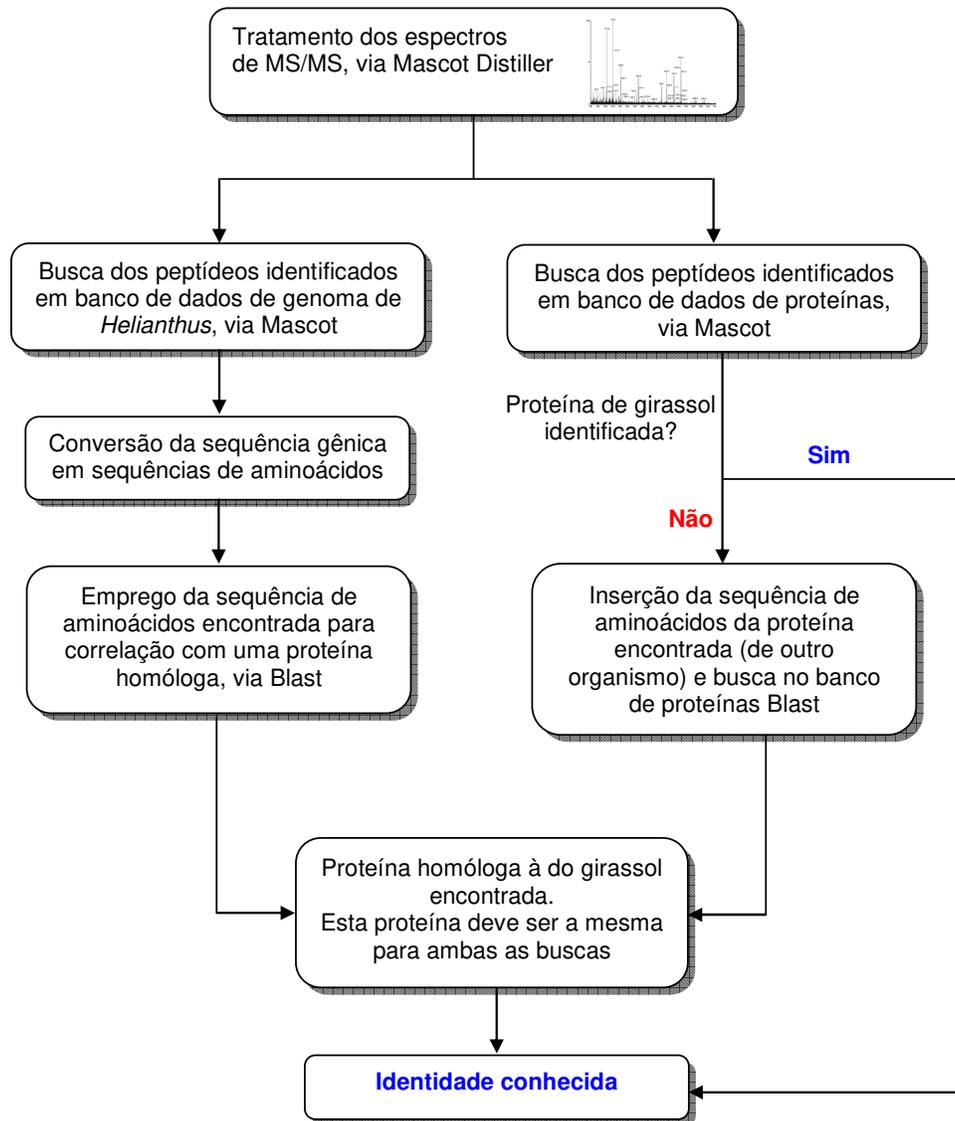
**Figura 1.6.** Imagem de um gel de eletroforese bidimensional de poliacrilamida, obtido por meio do protocolo de extração D indicando os 61 spots proteicos que foram submetidas ao procedimento de digestão triptica descrito no item 2.5 e posterior análise por espectrometria de massas. As 22 proteínas destacadas em azul tiveram suas identidades determinadas ao final do procedimento; as proteínas destacadas em vermelho não apresentaram sucesso nas identificações.

#### 4.3.1. Buscas em bancos de dados para determinação da identidade das proteínas

Após a realização dos experimentos de espectrometria de massas sequencial e obtenção dos espectros, os dados foram submetidos ao tratamento empregando o programa Mascot Distiller. Este programa possibilita facilitar a detecção dos picos correspondentes aos peptídeos por meio da correlação de uma distribuição isotópica ideal que seja coerente com os dados experimentais.

Um exemplo consiste na possibilidade de diferenciar com, mais clareza, um sinal do ruído do equipamento, quando se tem picos com baixas intensidades. Assim, com a utilização do programa, tem-se facilitado o posterior tratamento dos dados.

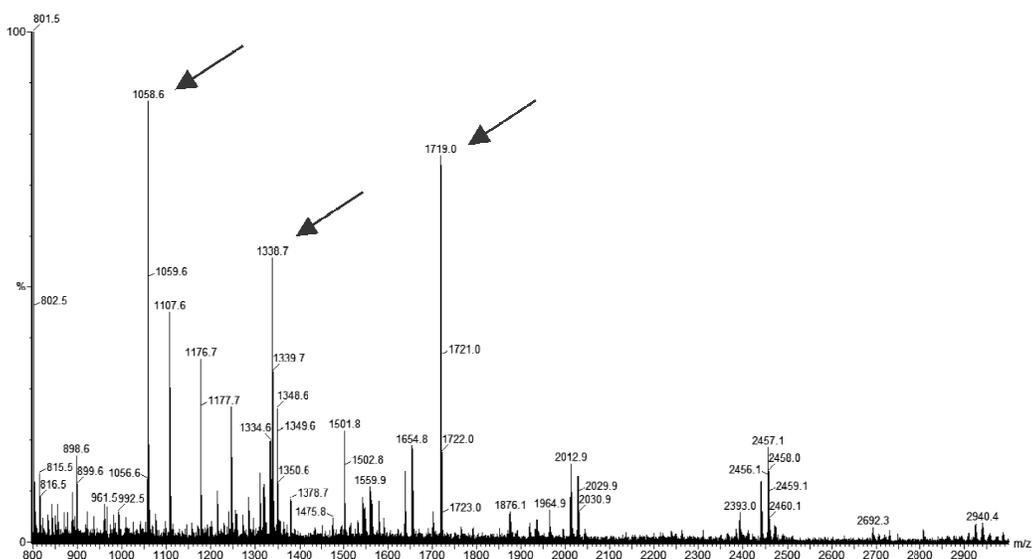
Para realizar a busca por homologia, duas rotas distintas foram empregadas, como pode ser observado no diagrama apresentado na Figura 1.7, sendo que ambas as rotas deveriam convergir para um resultado em comum.



**Figura 1.7.** Diagrama apresentando as sequências de busca para as duas rotas empregadas na identificação das proteínas separadas por eletroforese em gel de poliácridamida.

Na primeira delas realizava-se uma busca utilizando o banco de dados do genoma, que foi compilado para girassol. Como exemplo, a sequência para tratamento de dados da proteína identificada no *spot 6* será apresentada.

Primeiramente, realizou-se a obtenção dos espectros de *fingerprinting*, ou seja, caracterizaram-se os peptídeos obtidos após a digestão triptica das proteínas. A Figura 1.8 apresenta o referido espectro para o *spot 6*.



**Figura 1.8.** Espectro de *fingerprinting* obtido a partir do material digerido com tripsina para a proteína indicada no *spot 6*. As setas mostram os peptídeos identificados que possibilitaram a caracterização da proteína.

Experimentalmente, o equipamento de MALDI-Q-TOF coleta os dados para gerar o espectro de *fingerprinting* e, logo em seguida, o próprio equipamento define quais sinais apresentam a maior intensidade (geralmente seleciona-se de 7 a 10 sinais). Para as razões  $m/z$  selecionadas, realiza-se a fragmentação dos peptídeos utilizando argônio, e determinam-se os aminoácidos que os compõem. Neste caso, a caracterização de apenas 3 peptídeos ( $m/z$  1058,6; 1338,7; 1719,0) foi suficiente para determinação da identidade da proteína. A Tabela 1.6 apresenta as sequências identificadas.

A partir dos peptídeos obtidos, pode-se determinar as sequências gênicas

correspondentes. Mesmo considerando o fato de que o código genético é degenerado, existe uma maior probabilidade de que as sequências apresentadas tenham sido originadas a partir de códons específicos. Assim, as três sequências apresentadas na Tabela 1.6 relacionam-se com a sequência gênica apresentada na Tabela 1.7.

**Tabela 1.6.** Sequências de peptídeos identificados e suas respectivas massas molares experimentais, massas moleculares experimentais e teóricas e variação entre as massas moleculares experimentais e teóricas.

<b>Massa molar experimental (Da)</b>	<b>Massa molecular experimental</b>	<b>Massa molecular teórica</b>	<b>Variação</b>	<b>Sequência do peptídeo</b>
1058,6169	1057,6096	1057,5921	0,0176	R.VPVFLDGGVR.R
1338,6636	1337,6563	1337,6364	0,0199	R.DHIVTEWDAPR.A
1718,9855	1717,9782	1717,9587	0,0195	R.LAIQAGAAGIIVSNHGAR.Q

**Tabela 1.7.** Sequência gênica obtida a partir dos dados experimentais para o *spot* número 6.

<b>Código da sequência</b>	<b>Descrição</b>	<b>Sequência gênica</b>
gi 32530022	EST DH0AB43ZC11 RM1 HaDevR1 Helianthus annuus cDNA clone HaDevR143C11 , mRNA sequence	GAAGAACTTTGAGGGCTTGGACCTTGGCAAGATGGATGAAGCTAATGA TTCTGGTTTAGCTTCTTATGTTGCTGGTCAGATCGACCGCACTTTGAGC TGGAAGGACGTGAAGTGGCTGCAAACAATCACCACGATGCCAATCCTC GTGAAGGGTGTGATCACTGCTGAGGACACAAGGTTAGCTATTCAAGCT GGAGCAGCAGGTATTATTGTTTCCAACCACGGAGCCCGCCAGCTGGAT TATGTTCCCTGCCACCATCATGGCATTGGAAGAGGTTGTGAAAGCGGCA CAAGGCCGTGTTCCCGTGTTCCTTAGATGGTGGTGTTCGCCGTGGAAC GATGTGTTCAAGGCGCTGGCTCTTGGAGCTTCTGGCATATTTATTGGGC GACCCGTAGTGTTCCTTATTGGCTGCTGAAGGAGAAGCCGGAGTGAGAA AAGTACTCCAGATGTTACGCGATGAATTCGAGCTAACCATGGCACTAAG TGGCTGTACCTCGCTCAGTGAGATTACTCGCGACCATATTGTGACTGAG TGGGATGCACCCCGGGCTCGTCTCGGACCAAGGTTATAAACCAAAACA TGATATCGTTGCGACCAACTCGACTTTTAAATCGCAAAATATAACATGTAC CTTGTGTTATGGNTGCCAACTTGATTGGTTCCTTGGATAATGTTTCGTT TCTGAATGATAAGCTGCCTGAATGTATAATTTTAAATGTCCATTGCCTT GCATATAAAAAAAAAANATAAAAAATC



posições distintas na fita de DNA. Neste caso, o banco de dados Blast forneceu uma sequência que parte do aminoácido de número 2 para dar início à síntese da proteína (*frame* +2). Por isso, faz-se necessário confirmar se realmente este dado obtido tem consistência. Assim, parte-se para a segunda etapa do tratamento de dados.

Na segunda etapa, utiliza-se novamente o programa Mascot para realizar uma nova busca, mas agora empregando o banco de dados de proteínas NCBI. Este modelo de busca é empregado para organismos que apresentam um grande número de entradas de proteínas em banco de dados. Caso o girassol apresente alguma proteína catalogada em bancos de dados ela irá retornar uma resposta positiva nesta etapa da busca. Caso contrário, o programa irá correlacionar os dados obtidos com uma proteína de outro organismo, desde que os mesmos apresentem qualidade ou número de peptídeos suficientes para tal.

No caso da proteína do *spot* 6, para a segunda etapa da busca, o tratamento de dados aponta que ela consiste em uma glicolato oxidase de *Arabidopsis Thaliana* com número de entrada ref|NP\_188059.1|, a mesma proteína obtida na primeira etapa. Logicamente, no gel de eletroforese não havia proteínas de *Arabidopsis Thaliana*, muito menos uma contaminação com proteínas desta espécie. O que ocorre é o fato desta proteína apresentar elevada homologia com a proteína de girassol, o que foi confirmado na primeira etapa da busca.

Por fim, compara-se no gel de eletroforese a massa experimental do *spot* com a massa teórica da proteína de *Arabidopsis Thaliana*. Neste caso, o tratamento de imagens do gel de eletroforese estima que a proteína apresenta massa de 45 kDa, enquanto a proteína de *Arabidopsis Thaliana*, obtida após o tratamento dos dados tem massa de 41,3 kDa, o que indica uma variação de *ca.* 8% entre as massas teórica e experimental. Este valor é aceitável considerando a precisão da técnica de eletroforese em gel.

Vale ressaltar que a sequência completa da proteína não é determinada, mas pode-se conhecer a identidade da mesma, bem como, ter uma comprovação experimental de que esta proteína é, realmente, expressa em girassol.

Para os demais *spots* o tratamento realizado seguiu a mesma sequência apresentada. As proteínas identificadas são apresentadas na Tabela 1.8. Observa-se que as entradas destacadas em negrito não constam no banco de dados ExPASy (nem mesmo como uma proteína não revisada ou como fragmento). As entradas que apresentam indicado *Helianthus annuus* como gênero e espécie de homologia indicam que a proteína foi diretamente localizada em bancos de dados, utilizando a busca via NCBI. Além disso, são fornecidos os códigos de acesso para a proteína homóloga, que pode ser acessado via ExPASy [39], as massas molares experimentais e estimadas (baseando-se na proteína homóloga), além da porcentagem de cobertura dos peptídeos.

Com relação ao parâmetro porcentagem de cobertura, pode-se observar que ele variou de 7 a 29%. Cabe ressaltar que altos valores de cobertura não resultam, necessariamente, em sucesso para caracterização. Para uma proteína de baixa massa molar, por exemplo, a porcentagem de cobertura tende a ser maior. Além disso, pode-se obter um alto valor de cobertura, mas que engloba peptídeos comuns a diversas classes de proteínas, o que torna difícil a análise por parte dos algoritmos computacionais.

Os *spots* não listados na Tabela 1.8 resultaram em resultados inconclusivos, seja por limitações durante os procedimentos experimentais (que envolvem possíveis contaminações ao longo das etapas analíticas envolvidas, digestão enzimática ineficiente devido à composição dos aminoácidos, gerando peptídeos com razões  $m/z$  acima de 3000 Da) ou durante o tratamento de dados (ausência de um banco de dados de proteínas / sequências gênicas). Vale ressaltar que se pôde identificar 36% de todas as proteínas avaliadas o que é um número expressivo para técnica de MALDI, ainda mais considerando a ausência de um banco de dados.

Algumas considerações serão feitas para alguns *spots* em particular. Pode-se observar que alguns representam produtos de degradação que foram formados durante os procedimentos de preparo das amostras, que incluem os *spots* 48, 52 e 59 (Figura 1.6). Tais proteínas apresentaram massas molares experimentais

inferiores àquelas fornecidas pelas proteínas presentes em bancos de dados. Particularizando o *spot* 59, este pode representar um produto de degradação da proteína presente no *spot* 55.

Por fim, a proteína identificada com o número 60 (indicada em azul na Figura 1.6) foi caracterizada como uma subunidade  $\alpha$  de ATP sintase de *Helianthus annuus* (número de acesso ABD47140), ou seja, uma proteína de girassol que já consta em banco de dados. Mesmo assim, ela foi considerada não identificada, pois sua massa molar experimental era 31% superior à massa teórica obtida, o que não é coerente. Nesta Tese consideraram-se aceitáveis variações de massa molar experimentais até 10% superiores aos valores teóricos obtidos.

## 5. CONCLUSÕES PARCIAIS

Pôde-se observar que alterações nos protocolos de extração influenciam de maneira significativa os resultados obtidos ao final da separação de proteínas empregando a técnica de eletroforese em gel. Os principais problemas enfrentados para a amostra em questão relacionam-se com a solubilização das proteínas nos tampões de extração empregados, as perdas ao longo das diversas etapas analíticas, principalmente nas etapas de precipitação e a questão da eliminação de interferentes que impedem a separação adequada das proteínas na matriz de poliacrilamida.

Mais especificamente sobre a presença de interferentes, pôde-se observar que aplicação da extração utilizando fenol foi àquela que apresentou melhores resultados. Este fato apresenta-se em concordância com diversos trabalhos [31], onde a aplicação de protocolos semelhantes para folhas de outras plantas resulta em géis de eletroforese de alta qualidade. Isto vem comprovar a eficiência da aplicação do fenol para remoção de interferentes, principalmente no sentido de eliminar problemas de agregação entre proteínas e interferentes, que podem incluir pigmentos, lignina, ácidos nucleicos, dentre outros.

**Tabela 1.8.** Spots identificados e correlações com as proteínas que apresentaram relação de homologia. As definições das proteínas foram mantidas em língua inglesa. Resultados destacados em negrito indicam proteínas que não estão descritas no banco de dados utilizado para busca.

Nº spot	Definição	Proteína homóloga			Massa molar experimental estimada (kDa)	Cobertura de peptídeos (%)
		Gênero e espécie	Código de acesso	Massa molar prevista (kDa)		
2	<b>Putative alanine aminotransferase</b>	<i>Vitis labrusca</i>	CAO16115	53	56	10
5	<b>Glicolato oxidase</b>	<i>Glycine max</i>	CAO63570	41	45	13
6	<b>Glycolate oxidase</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_188059	42	44	18
18	<i>Phosphoglycerate kinase</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Q42961	50	47	20
19	<i>Unnamed protein product</i>	<i>Vitis vinifera</i>	CAO17011	42	42	24
20	<i>ATP synthase beta subunit</i>	<i>Protea cynaroides</i>	ABO43930	53	59	14
25	<b>N-glyceraldehyde-2-phosphotransferase-like</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BAA97552	39	33	15
26	<i>Unnamed protein product</i>	<i>Vitis vinifera</i>	CAO15661	28	26	13
28	<b>Ribulose-phosphate-epimerase</b>	<i>Solanum tuberosum</i>	CAA90426	31	26	7

**Tabela 1.8.** *Continuação.*

30	<b>Triose phosphate isomerase cytosolic isoform-like</b>	<i>Solanum tuberosum</i>	ABB02628	27	27	8
31	<b>Triose-phosphate isomerase</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_179713	33	24	13
33	<b>Triose-phosphate isomerase</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAF70259	32	34	13
38	<i>Ribulose biphosphate carboxylase / RuBisCo</i>	<i>Helianthus annuus</i>	P08705	20	15	6
39	<i>Nucleoside diphosphate kinase</i>	<i>Helianthus annuus</i>	Q96559	16	15	10
45	<i>Cu/Zn superoxide dismutase precursor</i>	<i>Helianthus annuus</i>	CAH06449	20	18	9
46	<i>Cu/Zn superoxide dismutase precursor</i>	<i>Helianthus annuus</i>	CAH06449	20	19	11
48	<b>Thioredoxin peroxidase</b>	<i>Nicotiana tabacum</i>	CAC84143	29	22	29
52	<b>Oxygen evolving complex 33 kDa photosystem II protein</b>	<i>Nicotiana tabacum</i>	AAP03871	35	28	18
53	<b>Putative peroxidase</b>	<i>Zinnia elegans</i>	CAI54299	34	31	20
54	<b>Putative peroxidase</b>	<i>Zinnia elegans</i>	CAI54300	34	37	26
55	<i>Chloroplast heat shock protein</i>	<i>Ipomoea nil</i>	ABZ04080	74	77	18
59	<i>Chloroplast heat shock protein</i>	<i>Ipomoea nil</i>	ABZ04080	74	50	18

Vale ressaltar que alterações gerais no perfil eletroforético são esperadas quando da substituição das amostras utilizadas neste capítulo, apenas para otimização da metodologia de extração, pelas amostras obtidas a partir das plantas cultivadas e que serão discutidas no segundo capítulo desta Tese. Neste sentido, o fato que deve ser ressaltado consiste na obtenção de uma metodologia adequada para a separação das proteínas, deixando-as livres de interferentes.

Por fim, foi possível a caracterização de 22 proteínas (totalizando 36% do total de *spots* avaliados), o que pode ser considerado um número bastante interessante, principalmente levando em consideração o fato de não existir um banco de dados de proteínas para girassol. Além disso, dentre as proteínas identificadas, 12 entradas foram reportadas pela primeira vez ao nível proteico para o gênero *Helianthus* [40], tendo como base o banco de dados ExPASy [38].

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Espagne, C.; Martinez, A.; Valot, B.; Meinel, T.; Giglione, C.; *Alternative and effective proteomic analysis in Arabidopsis*, Proteomics, **2007**, 7, 3788-3799.
- [2] Giavalisco, P.; Nordhoff, E.; Lehrach, H.; Gobom, J.; Klose, J.; *Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis*, Electrophoresis, **2003**, 24, 207-216.
- [3] Fulda, S.; Mikkat, S.; Stegmann, H.; Horn, R.; *Physiology and proteomics of drought stress acclimation in sunflower (*Helianthus annuus* L.)*, Plant Biol., **2011**, 13, 632-642.
- [4] Garcia, J. S.; Souza, G. M. F.; Eberlin, M. N. Arruda, M. A. Z.; *Evaluation of metal-ion stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves through proteomic changes*, Metallomics, **2009**, 1, 107-113.
- [5] Wang, W.; Tai, F.; Chen, S.; *Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis*, J. Sep. Sci., **2008**, 31, 2032-2039.
- [6] Ashoub, A.; Berberich, T.; Beckhaus, T.; Brüggemann, W.; *A competent extraction method of plant proteins for 2-D gel electrophoresis*, Electrophoresis, **2011**, 32, 2975-2978.
- [7] Buyel, J.F.; Bautista, J.A.; Fischer, R.; Yusibov, V.M.; *Extraction, purification and characterization of the plant-produced HPV16 subunit vaccine candidate E7 GGG*, J. Chromatogr. B, **2012**, 880, 19-26.
- [8] Magalhães, C. S.; Arruda, M. A. Z.; *Sample preparation for metalloprotein analysis: a case study using horse chestnuts*, Talanta, **2007**, 71, 1958-1963.

- [9] Wang, H.; Qian, W. J.; Mottaz, H. M.; Clauss, T. R.; Anderson, D. J.; Moore, R. J.; Camp 2nd, D. G.; Khan, A.H.; Sforza, D. M.; Pallavicini, M.; Smith, D. J.; Smith, R. D.; *Development and evaluation of a micro- and nanoscale proteomic sample preparation method*, J. Proteome Res., **2005**, 2397-2403.
- [10] da Silva, M. A. O.; Arruda, M. A. Z.; *An aqueous two-phase system as a strategy for serum albumin depletion*, Talanta, **2009**, 77, 985-990.
- [11] Righetti, P. G.; Castagna, A.; Antonioli, P.; Boschetti, E.; *Prefractionation techniques in proteome analysis: the mining tools of the third millennium*, Electrophoresis, **2005**, 26, 297-319.
- [12] Aryal, U.M.; Krochko, J.E.; Ross, A.R.S.; *Identification of Phosphoproteins in Arabidopsis thaliana Leaves Using Polyethylene Glycol Fractionation, Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography, Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry*, J. Proteom. Res., **2012**, 11, 425-437.
- [13] Görg, A.; Weiss, W.; Dunn, M. J.; *Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics*, Proteomics, **2004**, 4, 3665-3685.
- [14] Saranavan, R. S.; Rose, J. K. C.; *A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues*, Proteomics, **2004**, 4, 2522-2532.
- [15] Sarma, A. D.; Oehrle, N. W.; Emerich, D. W.; *Plant protein isolation and stabilization for enhanced resolution of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*, Anal. Biochem., **2008**, 379, 192-195.
- [16] Pirovani, C. P.; Carvalho, H. A. S.; Machado, R. C. R.; Gomes, D. S.; Alvim, F. C.; Pomella, A. W. V.; Gramacho, K. P.; Cascardo, J. C. M.; Pereira, G. A. G.; Micheli, F.; *Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by Moniliophthora perniciosa, the causal agent of the witches' broom disease*, Electrophoresis, **2008**, 29, 2391-2401.
- [17] Karas, M.; Hillenkamp, F.; *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons*, Anal. Chem., **1988**, 60, 2299-2301.
- [18] Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, Y.; Matsuo, T.; *Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry*, Rapid Comm. Mass Spectrom., **1988**, 8, 151-153.
- [19] Dass, C.; *Principles and practice of biological mass spectrometry*, 1<sup>a</sup> edição, **2001**, Wiley Interscience, Nova York, EUA.
- [20] Cañas, B.; Piñeiro, C.; Calvo, E.; López-Ferrer, D.; Gallardo, J. M.; *Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics*, J. Chromatogr. A, **2007**, 1153, 235-258.
- [21] Granvogl, B.; Plösch, M.; Eichacker, L. A.; *Sample preparation by in-gel digestion for mass spectrometry-based proteomics*, Anal. Bioanal. Chem., **2007**, 389, 991-1002.
- [22] Bradford, M. M.; *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*, Anal. Biochem., **1975**, 72, 248-254.
- [23] Splittgerber, A. G.; Sohl, J.; *Non linearity in Protein Assays by the Coomassie Blue Dye-Binding Method*; Anal. Biochem., **1989**, 179, 198-201.

- [24] Compton, S. J.; Jones, C. G.; *Mechanism of Dye Response and Interference in the Bradford Protein Assay*, Anal. Biochem., **1985**, 151, 369-374.
- [25] Read, S. M.; Northcote, D. H.; *Minimization of variation in the Response to Different Proteins of the Coomassie Blue G Dye-Binding Assay for Protein*, Anal. Biochem., **1981**, 116, 53-64.
- [26] da Silva, M. A. O.; Arruda, M. A. Z.; *Bradford Reaction Mechanization for the Spectrophotometry Determination of Total Proteins*, Anal. Biochem., **2006**, 351, 155-157.
- [27] Zaia, D. A. M.; Zaia, C. T. B. V.; Lichtig, J.; *Determinação de Proteínas Totais Via Espectrofotometria: Vantagens e Desvantagens dos Métodos Existentes*, Quim. Nova, **1998**, 21, 787-793.
- [28] Garcia, J. S.; Gratão, P. L.; Azevedo, R. A.; Arruda, M. A. Z.; *Metal contamination effects on sunflower (*Helianthus annuus* L.) growth and protein expression in leaves during development*, J. Agric. Food Chem., **2006**, 54, 8623-8630.
- [29] Carpentier, S. C.; Witters, E.; Laukens, K.; Deckers, P.; Swennen, R.; Panis, B.; *Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis*, Proteomics, **2005**, 5, 2497-2507.
- [30] Xie, H.; Pan, S.; Liu, S.; Ye, K.; Huo, K.; *A novel method of protein extraction from perennial Bupleurum root for 2-DE*, Electrophoresis, **2007**, 28, 871-875.
- [31] Delaplace, P.; van der Wal, F.; Dierick, J. F.; Cordewener, J. H. G.; Fauconnier, M.; du Jardin, P.; America, A. H. P.; *Potato tuber proteomics: Comparison of two complementary extraction methods designed for 2-DE of acidic proteins*, Proteomics, **2006**, 6, 6494-6497.
- [32] Copeland, R. A.; *Methods for Protein Analysis: A Practical Guide to Laboratory protocols*, 1ª edição, **1994**, Chapman & Hall, Nova Iorque.
- [33] Perkins, D. N.; Pappin, D. J. C.; Creasy, D. M.; Cottrell, J. S.; *Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data*, Electrophoresis, **1999**, 20, 3551-3567.
- [34] Web site <http://www.plantgdb.org/>, banco de dados compilado com as informações disponíveis em agosto de 2008.
- [35] Web site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, acessado em setembro de 2008.
- [36] Carrão-Panizzi, M. C.; Mandarino, J. M. G.; in: Leite, R. M. V. B. C.; Brighenti, A. M.; de Castro, C. (Eds), *Girassol no Brasil*, 1ª edição, **2005**, Embrapa Soja, Londrina, Brasil.
- [37] Pusztai A.; *Interactions of proteins with other polyelectrolytes in a 2-phase system containing phenol and aqueous buffers at various ph values*, Biochem. J., **1966**, 99, 93-101.
- [38] Web site: <http://br.expasy.org>, a partir das informações disponíveis em fevereiro de 2012.
- [39] Web site: <http://br.expasy.org>, acessado em setembro de 2008.

[40] da Silva, M.A.O.; Garcia, J.S.; Souza, G.H.M.F.; Eberlin, M.N.; Gozzo, F.C.; Arruda, M.A.Z.; *Evaluation of sample preparation protocols for proteomic analysis of sunflower leaves*, *Talanta*, **2010**, 80, 1545-1551.

## **Capítulo 2**

---

**Plantio dos girassóis e estudo ionômico.**



## **1. OBJETIVO**

O objetivo deste segundo capítulo consistiu no desenvolvimento de um estudo para avaliar a composição e concentração de diversos íons com importância na nutrição do vegetal (estudo ionômico) em girassóis irrigados com zinco ou selênio, além de correlacionar os resultados obtidos com possíveis alterações no metabolismo das plantas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. A importância do girassol para a economia brasileira**

O agronegócio possui papel fundamental para o desenvolvimento da economia brasileira influenciando direta ou indiretamente em diferentes atividades e segmentos. Observa-se que vários complexos agroindustriais destacam-se no país, tal como o da soja e o de carnes e são tratados pelo governo como peças chave para o bom desempenho da economia nacional. No entanto, outras culturas apresentam-se pouco exploradas, mesmo exibindo um grande potencial para geração de riqueza, devido, principalmente, a limitações econômicas, sociais e tecnológicas apresentadas pelo Brasil. Dentre estas culturas, pode-se citar o girassol, uma oleaginosa que no ano de 2004 teve uma área de 94000 hectares plantados no país e que representou 0,4% do valor relativo à área cultivada de soja [1].

Assim, devido à política energética nacional adotada pelo governo brasileiro, o girassol apresenta-se englobado como uma das culturas estratégicas para alavancar a produção de biocombustíveis, juntamente com outras oleaginosas, tais como soja, milho, amendoim, algodão, canola, mamona, palma, dentre outras, sendo que o investimento previsto para produção destes cultivares no ano de 2013 pode chegar a 1,5 bilhão de dólares [1]. O governo brasileiro estuda desenvolver cadeias produtivas desta cultura nos estados das regiões sul e

sudeste devido ao clima mais adequado para o bom desenvolvimento da planta [2], incentivando intensificar sua produção, processamento e consumo dos principais derivados.

No estado de São Paulo, a cultura pode se apresentar como uma alternativa interessante, sob o ponto de vista financeiro, para plantio em áreas de reforma de canaviais, desde que realizada a semeadura dos girassóis entre os meses de outubro e novembro para possibilitar a colheita até a segunda quinzena de fevereiro, seguido do plantio da cana-de-açúcar [3]. Vale ressaltar que a rotação de culturas utilizando girassol apresentou-se como um procedimento interessante para reduzir a incidência de pragas e ervas daninha nas culturas [4].

A planta apresenta diferentes finalidades além da aplicação como matéria-prima para produção de combustíveis alternativos àqueles de origem fóssil. Pode-se citar o emprego na culinária (produção de óleo de cozinha, margarina, base para temperos), para lubrificação de motores e também para geração de energia [2].

O óleo de girassol, produzido a partir da prensagem das sementes, é denominado óleo virgem e proporciona um rendimento que varia entre 0,5 a 1,9 tonelada de óleo por hectare plantado [2], valor superior àquele obtido para a soja, por exemplo, situado entre 0,2 e 0,4 tonelada por hectare plantado. No início de 2000 a cultura apresentou-se como a quinta maior fonte de óleo vegetal no mundo [3]. Dentre as características apresentadas pelo óleo utilizado para fins de alimentação humana, destaca-se o alto teor do ácido linoleico, um ácido graxo considerado essencial, ou seja, que não pode ser sintetizado pelo organismo humano, e que corresponde a 60% de todos os ácidos graxos que compõem a mistura [1]. O óleo de girassol também pode ser extraído a partir da torta resultante da prensagem das sementes. Neste caso, estima-se que o desenvolvimento de pesquisa no Brasil para extração deste produto poderá resultar em redução de 20% no custo da produção de biodiesel [4].

A semente da planta também apresenta importância na nutrição animal sendo utilizada como suplemento proteico na forma de farelo. Embora a cultura

mais empregada para este fim no Brasil seja a soja, devido à maior disponibilidade, o girassol fornece material considerado de boa qualidade, desde que excluída a casca das sementes, com a vantagem de não apresentar nenhum tipo de toxina, tal como a aflatoxina encontrada nas sementes de amendoim ou a ricina observada na mamona [3].

Outros tipos de aplicação também podem ser mencionados, tal como o consumo dos seus frutos aquênios *in natura* ou na alimentação de aves, a aplicação das flores para ornamentação [3] e a utilização das plantas em processos de fitorremediação devido à resistência frente à contaminação com íons metálicos [5, 6].

## 2.2. Características das sementes empregadas

As sementes empregadas nesta Tese consistiam em uma variedade melhorada geneticamente produzida pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC) denominada IAC Iarama. Dentre as características da variedade pode-se citar o desenvolvimento rápido (85 a 95 dias), com alto teor de óleo nas sementes (ca. 42%). A Tabela 2.1 resume outras informações relacionadas com o cultivar.

**Tabela 2.1.** Características das sementes de girassol empregadas nesta Tese [7].

	Nome comum	Girassol variedade
Espécie, cultivar, família	Cultivar	IAC Iarama
	Nome científico	<i>Helianthus annuus</i>
	Família	Composta
	Massa Verde (t/ha)	20 a 30
Características da espécie	Massa Seca (t/ha)	4 a 5
	N (kg/ha)	Não fixa N
	Altura (m)	1,4 a 1,8
	Hábito de crescimento	Arbustivo ereto

**Tabela 2.1. Continuação.**

	Ciclo até o florescimento (dias)	45 a 55	
	Peso de 1000 sementes (g)	60	
	Profundidade (cm)	2 a 3	
Semeadura	Época	Ideal	Outubro a novembro
		Possível	Outubro a março
Qualidade da semente	Padrões mínimos	Germinação (%)	80
		Pureza (%)	98

### 2.3. Nutrição vegetal

Uma característica marcante dos organismos vivos, em especial das células que os compõe, relaciona-se com a capacidade apresentada pelas mesmas em captar substâncias do meio ambiente para síntese de componentes celulares ou emprego como fonte de energia. O fornecimento e a absorção destas substâncias pelos organismos recebe a denominação de nutrição, enquanto que os compostos fornecidos aos organismos são chamados de nutrientes [8].

Para plantas, os nutrientes apresentam como característica comum o fato de serem todos compostos inorgânicos, sendo que os mesmos podem ser divididos em duas classes principais [9]. A primeira delas engloba os macronutrientes, tal como o carbono, oxigênio magnésio, cálcio, enxofre e potássio, por exemplo. À exceção do carbono e oxigênio, todos são obtidos pelas plantas a partir do solo e se encontram em concentrações superiores a 0,1% (m/m) nos tecidos das plantas, considerando massa seca [10]. De maneira geral, os macronutrientes são encontrados no solo associados a uma fração orgânica, ou na forma de compostos inorgânicos com estruturas relativamente complexas para serem absorvidos pelas plantas. Neste sentido, tais elementos devem ser

convertidos às suas respectivas formas iônicas para possibilitar a captação pelas raízes [11].

O segundo grupo compreende os nutrientes presentes em menores concentrações nos tecidos vegetais (geralmente abaixo de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) tal como cobre, boro e zinco. Estes elementos são denominados micronutrientes e desempenham papel fundamental com relação à resistência dos vegetais a doenças. Neste caso, o controle na captação dos micronutrientes por parte do vegetal consiste em um fator de extrema importância para garantir a adaptação do organismo às condições do solo, evitando sua falta ou excesso. [11, 12].

Além da classificação apresentada, os macro e micronutrientes podem ser divididos em essenciais e não essenciais. Para ser definido como essencial um elemento deve atender aos seguintes critérios básicos: em caso de deficiência no metabolismo do vegetal não existirá um elemento substituto; a sua deficiência inviabiliza o desenvolvimento da planta; e o elemento deve apresentar-se envolvido diretamente na nutrição do vegetal, constituindo uma molécula essencial para o metabolismo da planta, como, por exemplo, o magnésio que constitui a clorofila, ou o cobre que atua no sítio ativo de diferentes proteínas. Assim, dentre os elementos estudados neste trabalho, o zinco é considerado um micronutriente essencial para o desenvolvimento das plantas superiores, como é o caso do girassol, atuando em sítios ativos de diferentes enzimas, viabilizando a manutenção do metabolismo [11]. Já o selênio também é caracterizado como um micronutriente essencial para o desenvolvimento da espécie em questão, participando da composição de algumas proteínas específicas [13].

## **2.4. O selênio no metabolismo vegetal**

Pelo fato de se apresentar como um micronutriente essencial, a concentração de selênio nos vegetais superiores deve ser rigorosamente controlada pelo metabolismo da planta. Assim, devem existir mecanismos para

controlar a absorção deste nutriente, bem como garantir sua eliminação efetiva no caso de contaminação [14].

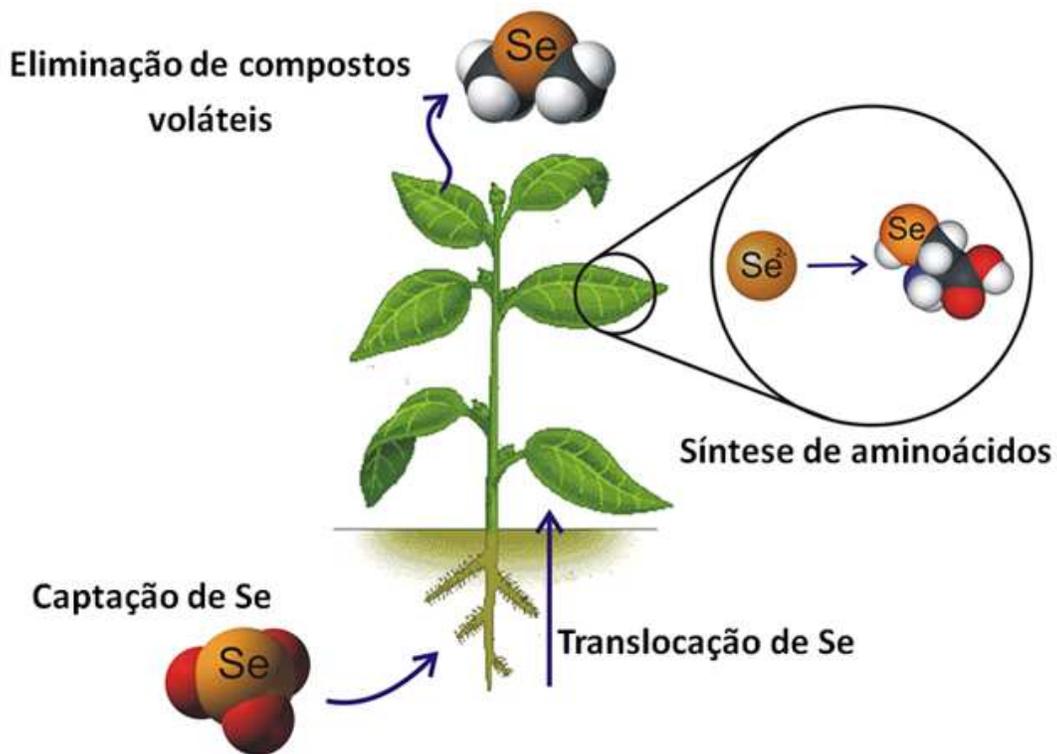
Nos solos, observa-se predominantemente a existência de duas espécies de selênio que podem ser absorvidas pelas plantas: os íons selenato, predominam em relação aos íon selenito em terrenos com maiores potenciais redox e valores de pH mais elevados [14]. No caso dos íons selenato, estes apresentam o mecanismo de incorporação pelas plantas amplamente conhecido pela literatura. Neste caso, a absorção se dá por meio dos transportadores de íons sulfato localizados na membrana plasmática das células das raízes das plantas. Após absorvidos, os íons são, então, conduzidos sob a forma de selenato até as partes superiores da planta [15, 16].

Já para os íons selenito, os mecanismos de absorção pelos vegetais apresentam-se muito mais complexos e ainda não foram completamente elucidados. Não se sabe se tais íons são absorvidos pelas plantas por difusão, hipótese sustentada há mais tempo na literatura, ou se a absorção se dá por meio da utilização dos transportadores de íons fosfato, também localizados na membrana plasmática celular [17]. Sabe-se, no entanto, que a absorção de íons selenito ocorre e conduz a metabolização de íons selenato, que apresentam maior mobilidade, e tornam possível o transporte do selênio até as partes aéreas da planta [14].

Nas folhas, o selênio é metabolizado e convertido a outras formas químicas, principalmente compostos voláteis tais como o dimetilseleneto e dimetildiseleneto, para possibilitar a eliminação do excedente por meio da transpiração foliar e evitar a incorporação às proteínas, como pode ser observado na ilustração da Figura 2.1.

Contudo, muitas vezes, tal estratégia não é efetiva para eliminar todo o selênio que causa a contaminação em uma planta. Assim, muitos organismos não conseguem evitar a síntese de selenoproteínas, formadas a partir de selenometioninas produzidas pela substituição aleatória do átomo de enxofre que compõe tais aminoácidos [18]. Desta forma, outra estratégia para minimizar os

efeitos adversos do selênio no metabolismo consiste na “passivação” deste elemento na planta por meio da modificação química dos selenoaminoácidos sintetizados. Muitas plantas desenvolveram a capacidade de modificar quimicamente tais aminoácidos evitando a incorporação dos mesmos à estrutura primária de proteínas, explorando, por exemplo, a metilação destas estruturas, como no caso da mostarda negra (*Brassica nigra*) [19]. Assim, a inserção de grupos metil em selenometioninas e selenocisteínas também consiste em uma estratégia que evita a incorporação do selênio em proteínas e reduz os danos ao organismo [14].



**Figura 2.1.** Estratégias adotadas pelas plantas para evitar os efeitos tóxicos causados pela contaminação por selênio.

Observa-se, então, que uma planta tolerante ao selênio não será aquela que apresenta a capacidade de evitar a absorção do elemento no solo, até por que o vegetal não conseguirá evitar este processo. O organismo tolerante será

aquele que apresentar a capacidade de eliminar, com maior eficiência, o selênio absorvido e, principalmente, minimizar a incorporação deste elemento de maneira descontrolada na estrutura primária de proteínas.

Neste sentido, o girassol se apresenta como uma planta interessante para o estudo proposto, uma vez que pode ser classificado como uma espécie indicadora da contaminação por selênio, ou seja, a espécie apresenta relativa resistência à contaminação moderada causada por este elemento, mas por outro lado sofre com os efeitos adversos quando submetidas a concentrações elevadas. Outras espécies, tal como a soja (*Glicine max*) podem ser consideradas como não-acumuladoras, apresentando o desenvolvimento prejudicado mediante pequenas elevações no teor de selênio no solo. Já para um terceiro grupo de plantas, consideradas tolerantes, o selênio não causa problemas para o bom desenvolvimento do vegetal, como é o caso de algumas espécies do gênero *Astragalus*. Tais plantas podem suportar concentrações situadas entre 20 e 40 mg g<sup>-1</sup> de Se no solo [19].

## **2.5. O metabolismo do zinco: captação e translocação**

O zinco é captado pelas plantas na forma de Zn<sup>2+</sup> e ainda hoje não se tem consenso sob a forma como ela se dá: por difusão ou mediada por transportadores específicos. Acredita-se que ambos atuam na captação deste elemento nas plantas com consumo de ATP em ambas [20].

Diversos fatores podem conduzir à inibição na captação de zinco. Baixas temperaturas e inibidores metabólicos podem ser considerados. No entanto, a literatura reporta de longa data [21] a influência de íons Cu<sup>2+</sup> como responsáveis por inibir, de maneira significativa, a captação de zinco em cana de açúcar, provavelmente pelo fato dos íons competirem pelo mesmo sistema de captação.

Efeitos de supressão na captação de zinco na presença de metais alcalinos terrosos, sob uma ampla faixa de concentrações, também podem ser observados. De maneira geral, os efeitos tornam-se mais acentuados na presença de íons

Mg<sup>2+</sup> do que quando comparado aos demais íons da mesma família, tais como Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> e Ba<sup>2+</sup> [20].

Não se pode deixar de mencionar o fato de que não só a presença de metais pode causar inibição na captação de zinco. A presença de micorrizas arbusculares associadas mutualisticamente às raízes das plantas também contribui para regular a captação deste nutriente, fazendo com que as plantas estejam mais preparadas para enfrentar condições adversas do meio em que se encontram, como pode ser observado no trabalho desenvolvido por Andrade *et al.* [22]. Os autores avaliaram a influência da micorriza em feijões cultivados na presença de zinco e puderam observar maior tolerância nas plantas onde o fungo estava presente.

De modo geral, para a maioria das espécies, concentrações de zinco abaixo de 10 – 15 µg de zinco / g de matéria seca são indicativo da deficiência deste elemento, enquanto concentrações na faixa de 20 – 100 µg de zinco / g de matéria seca podem ser consideradas como níveis normais para uma planta [20].

## **2.6. A importância dos estudos ionômicos aplicados às plantas, com foco na nutrição humana**

A deficiência de micronutrientes na nutrição humana aparece como um grave problema de saúde pública que afeta mais de dois bilhões de pessoas em todo o mundo, segundo dados da Organização Mundial de Saúde [23, 24]. Tal questão tem chamado a atenção de diferentes organizações no sentido de buscar soluções ou minimizar toda a problemática causada pela desnutrição.

Diferentes alternativas são apresentadas no sentido de minimizar tal problema. Dentre as mais empregadas destaca-se o procedimento de fortificação dos alimentos, onde o nutriente é adicionado em proporção adequada para suprir as necessidades do consumo humano [25]. Pode-se citar a adição de iodo ao sal de cozinha como exemplo típico. No entanto, para outros elementos, como o ferro,

este procedimento apresenta dificuldades para ser adotado devido à rápida oxidação do elemento.

Assim, devem ser exploradas soluções alternativas para obtenção dos resultados almejados. O emprego da biofortificação, que consiste na adição do nutriente ao longo do crescimento do vegetal, apresenta-se como uma alternativa de baixo custo e bastante efetiva para elevar o teor de minerais em plantas [26]. No entanto, para que se tenha a produção de cultivares cada vez mais eficientes e com teores de minerais adequados para consumo humano deve-se compreender os mecanismos pelos quais as plantas absorvem tais nutrientes, bem como identificar possíveis alterações na composição dos demais elementos que constituem o vegetal [27].

Para que este objetivo seja alcançado, deve-se compreender, de maneira bastante clara, os processos que ocorrem em plantas em nível fisiológico. No entanto, muitos processos ainda são desconhecidos pela biologia, pois não há muita pesquisa em nível molecular, o que dificulta o entendimento dos fenômenos observados, gerando limitações para o desenvolvimento de culturas mais eficientes sob o ponto de vista nutricional e, por que não, mais rentáveis. Neste sentido, os estudos ionômicos podem se apresentar como a ligação entre os fenômenos observados em nível fisiológico e aqueles que ocorrem em nível molecular, facilitando a compreensão do processo global [27, 28].

O exemplo discutido da nutrição humana não se caracteriza como o único onde os estudos ionômicos são relevantes. Pesquisas que visam o aumento da produção com o desenvolvimento de culturas de maior qualidade também apresentam aplicabilidade para tais estudos [27]. Pode-se destacar o desenvolvimento de culturas mais eficientes aplicadas na produção de biocombustíveis, de plantas mais tolerantes as mudanças climáticas e, até mesmo, em organismos vegetais utilizados em processos de fitorremediação [29, 30].

### **3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

#### **3.1. Preparo das soluções, padrões e limpeza dos materiais**

Todas as soluções e decomposições de amostras realizadas neste capítulo foram preparadas utilizando reagentes de grau analítico, ácido nítrico (Merck, Darmstadt, Alemanha) sub-destilado, bem como água deionizada ( $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ), obtida a partir de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, USA).

Para realização das quantificações dos diferentes elementos por ICP-MS empregou-se tubos de polipropileno para reduzir possíveis problemas relacionados com contaminação, sendo as soluções preparadas em capela de fluxo laminar.

Após o uso, todos os materiais foram lavados com água e detergente (Triton<sup>®</sup> X-100) e colocados em banho ácido (ácido nítrico 10% v/v), sendo mantidos nesta solução por, no mínimo, 8 horas. Posteriormente, eram lavados utilizando água deionizada e secos em estufa, à exceção dos materiais volumétricos que eram secos à temperatura ambiente.

#### **3.2. Cultivo dos girassóis**

Os girassóis foram cultivados em casa de vegetação do departamento de fisiologia vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp com colaboração do Prof. Dr. Paulo Mazzafera.

O solo empregado para cultivo também foi cedido pelo Instituto de Biologia da Unicamp. Para evitar a presença indesejada de micro-organismos o mesmo foi autoclavado durante 3 h e, posteriormente, teve seu pH corrigido para um valor em torno de 5,5, utilizando  $(\text{MgCO}_3)_4 \cdot \text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Devido à esterilização, fez-se necessário elevar a concentração de fosfato; para tanto, adicionou-se ca. 300 mg de monohidrogenofosfato de potássio no solo de cada vaso. Empregaram-se

potes de plástico com capacidade de 1000 mL que foram cheios com o solo.

Para o plantio, as sementes foram inicialmente desinfetadas com solução 1% (v/v) de hipoclorito de sódio comercial. Empregou-se 30 potes que receberam três sementes cada e que foram inseridas a *ca.* 3 cm de profundidade. Inicialmente, a irrigação foi realizada utilizando somente água destilada. O tratamento empregando soluções de zinco e selênio teve início somente após o desbaste e o aparecimento da primeira folha das plantas (5 dias após o plantio).

As 30 plantas foram cultivadas durante 44 dias nos meses de novembro e dezembro, sendo que, a partir do 5º dia de cultivo, as mesmas foram distribuídas em 5 condições distintas (6 plantas para cada condição), de acordo com a Tabela 2.2.

Com relação ao sal empregado para a irrigação com zinco, utilizou-se o acetato de zinco. Embora a utilização de nitrato possa ser interessante devido à alta solubilidade do sal, e conseqüente aumento da biodisponibilidade, o referido ânion poderia atuar como nutriente para este grupo de plantas.

Devido à ausência de dados na literatura no que se refere às concentrações fitotóxicas de zinco e selênio para girassol, os valores apresentados na Tabela 2.2 foram baseados em dados disponíveis para outras plantas.

Para zinco, baseou-se no trabalho de Montilla *et al.* [31] que cita a concentração fitotóxica de zinco nas folhas da maioria das plantas de *ca.* 400 mg kg<sup>-1</sup> (considerando massa seca). Para selênio, considerou-se o trabalho de Lyons *et al.* [32] que fornece a concentração fitotóxica de selênio para tecidos de trigo de 325 mg kg<sup>-1</sup>.

Desta forma, baseando-se nestes dados, empregou-se nas plantas tratadas com doses superiores uma massa de zinco ou selênio *ca.* 8% superior aos valores considerados fitotóxicos. Para as concentrações inferiores, optou-se por empregar massas de zinco ou selênio *ca.* 40% inferiores aos valores descritos na literatura.

**Tabela 2.2.** Condições empregadas para o cultivo das plantas controle e irrigadas com soluções de zinco e selênio.

<b>Condição</b>	<b>Irrigação</b>
Controle	Plantas irrigadas com água destilada.
Zinco – dose superior	Plantas irrigadas com 17,33 mg de $Zn^{2+}$ ao longo de cada semana, totalizando 433,33 mg de $Zn^{2+}$ ao final do período.
Zinco – dose inferior	Plantas irrigadas com 9,33 mg de $Zn^{2+}$ ao longo de cada semana, totalizando 233,33 mg de $Zn^{2+}$ ao final do período.
Selênio – dose superior	Plantas irrigadas com 14,08 mg de $SeO_3^{2-}$ ao longo de cada semana, totalizando 352,08 mg de $SeO_3^{2-}$ ao final do período.
Selênio – dose inferior	Plantas irrigadas com 7,58 mg de $SeO_3^{2-}$ ao longo de cada semana, totalizando 189,58 mg de $SeO_3^{2-}$ ao final do período.

O volume de água adicionado às plantas variou de acordo com a temperatura e umidade da casa de vegetação, bem como em função do desenvolvimento das plantas.

Após o período de cultivo as plantas (folhas, caules e raízes) foram lavadas com água deionizada, inseridas em sacos plásticos hermeticamente fechados e imediatamente imersos em nitrogênio líquido para armazenamento em biofreezer (Forma Scientific, modelo 356070) à temperatura de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.3. Determinação das espécies químicas nas diferentes regiões das plantas**

Para realizar a quantificação das diferentes espécies químicas presentes nas folhas, caules e raízes dos girassóis, realizou-se, primeiramente, a secagem

do material, previamente lavado com água deionizada, até massa constante utilizando uma estufa com temperatura ajustada a 60 °C. Posteriormente, as amostras foram maceradas utilizando nitrogênio líquido, sendo que o material obtido foi pesado diretamente em frascos de politetrafluoretileno e submetido à digestão ácida, de acordo com as condições descritas na Tabela 2.3, utilizando um forno de micro-ondas do tipo cavidade (Provecto Analítica, Jundiaí, Brasil) com magnetron de  $2450 \pm 13$  MHz e potência nominal de 1200 W.

**Tabela 2.3.** Condições empregadas para realizar a decomposição das amostras de folhas, caules e raízes de girassol utilizando radiação micro-onda.

Etapa	Potência (W)	Tempo (min)
1	400	5
2	790	8
3	320	4

Para digestão das amostras foram utilizados ca. 150 mg de material macerado, 6,0 mL de ácido nítrico sub-destilado e 0,5 mL de peróxido de hidrogênio (Merck, Darmstadt, Alemanha). As soluções obtidas após a decomposição foram evaporadas até quase a secura, utilizando um banho de areia (Quimis, Diadema, Brasil) com temperatura ajustada a 80 °C, filtradas e retomadas para 10 mL utilizando ácido nítrico sub-destilado a 1,0% (v/v).

Realizou-se as determinações quantitativas das seguintes espécies químicas: zinco, selênio, magnésio, fósforo, enxofre e ferro, utilizando um equipamento de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, PerkinElmer modelo ELAN DRC-e, Shelton, EUA). Tais espécies foram selecionadas, pois poderiam apresentar alterações devido aos diferentes tratamentos empregados. Neste caso, as condições de operação do equipamento de ICP-MS são descritas na Tabela 2.4.

**Tabela 2.4.** Condições de operação do equipamento de ICP-MS para determinação quantitativa de diferentes espécies químicas.

<i>Parâmetros de operação do equipamento de ICP-MS</i>					
Marca e modelo do equipamento	PerkinElmer ELAN DRC-e				
Câmara de nebulização	Ciclônica				
Nebulizador	Meinhard®				
Potência RF (W)	1200				
Fluxo do gás nebulizador – Ar (L min <sup>-1</sup> )	0,90 – 0,92 (Otimizado diariamente)				
Fluxo do gás auxiliar – Ar (L min <sup>-1</sup> )	1,2				
<i>Medidas</i>					
Modo de leitura	Peak hopping				
Dwell time (ms)	50				
Tempo morto do detector (ns)	60				
Sweeps	20				
Tempo de integração (ms)	1000				
Replicatas	3 (10 para enxofre)				
Razões m/z monitoradas	<sup>24</sup> Mg <sup>+</sup> , <sup>47</sup> PO <sup>+</sup> , <sup>48</sup> SO <sup>+</sup> , <sup>56</sup> Fe <sup>+</sup> , <sup>64</sup> Zn <sup>+</sup> , <sup>80</sup> Se <sup>+</sup>				
<i>Condições de operação otimizadas para cela dinâmica de reação</i>					
Elemento	Isótopo/espécie Monitorada	Gás de reação	Fluxo do gás (mL min <sup>-1</sup> )	RPq (V)	RPa (V)
Selênio	<sup>80</sup> Se <sup>+</sup>	Oxigênio	1,20	0,65	0
Enxofre	<sup>48</sup> SO <sup>+</sup>	Oxigênio	0,75	0,40	0
Fósforo	<sup>47</sup> PO <sup>+</sup>	Oxigênio	0,75	0,40	0,01
Ferro	<sup>56</sup> Fe <sup>+</sup>	Metano	1,20	0,75	0

A Tabela 2.5 apresenta as diferentes faixas de trabalho empregadas para as determinações das diferentes espécies químicas, fatores de diluição utilizados

e coeficientes de correlação para as curvas obtidas. Vale ressaltar que as faixas de trabalho adotadas apresentam-se acima dos valores calculados para os limites de quantificação segundo norma da IUPAC.

**Tabela 2.5.** Limites de detecção para as curvas analíticas empregadas para determinação de  $^{24}\text{Mg}^+$ ,  $^{47}\text{PO}^+$ ,  $^{48}\text{SO}^+$ ,  $^{56}\text{Fe}^+$ ,  $^{64}\text{Zn}^+$ ,  $^{80}\text{Se}^+$  empregando ICP-MS e fatores de diluição das amostras utilizadas nas determinações. Os limites de detecção foram definidos como o ponto de menor concentração das curvas analíticas.

<b>Espécie</b>	<b>Amostra</b>	<b>Fator de diluição</b>	<b>Limites de detecção (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>
Zn	Folhas	300	1,0
	Caules	150 / 300 (tratadas com Zn)	0,5
	Raízes	125 / 400 (tratadas com Zn)	0,5
	Sementes	500	1,0
	Solo	500	1,0
Se	Folhas	300 (plantas tratadas com Se)	1,0
		300 (plantas grupos controle e Zn)	0,050
	Caules	300 (plantas tratadas com Se)	0,5
		300 (plantas grupos controle e Zn)	0,050
	Raízes	300 (plantas tratadas com Se)	1,0
		300 (plantas grupos controle e Zn)	0,050
	Sementes	100	0,6
	Solo	100	0,6

**Tabela 2.5. Continuação.**

<b>Espécie</b>	<b>Amostra</b>	<b>Fator de diluição</b>	<b>Limites de detecção (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>
Mg	Folhas	300	20,0
	Caules	300	10,0
	Raízes	300	
	Sementes	100	50,0
	Solo	100	1,0
	Fe	Folhas	100
Caules		100	1,0
Raízes		1000 / 2000 (tratadas com Se)	20,0
SO	Folhas	500 / 1000 (tratadas com Se)	10,0
	Caules	250 / 500 (Zn inferior) / 1000 (tratadas com Se)	
	Raízes	500 / 1000 (tratadas com Se)	
	Sementes	500	50,0
	Solo	1000	
	PO	Folhas	250
Caules		100 / 250 (Se superior e controle)	
Raízes		250	
Sementes		1000	50,0
Solo		1000	

As concentrações das espécies químicas de maior interesse neste estudo também foram determinadas nas sementes correspondentes ao lote utilizado para cultivo das plantas. Para tanto, as mesmas foram maceradas em um almofariz com auxílio de nitrogênio líquido e secas em estufa a 60 °C até massa constante. Neste caso, ca. 200 mg do material foram adicionados em frascos de perfluoralcoxi e decompostos empregando o mesmo procedimento descrito para as folhas.

O método de decomposição descrito anteriormente, já foi empregado com êxito pelo grupo GEPAM para decomposição de outros materiais de origem vegetal [33], incluindo girassol [34, 35], com sua exatidão para a metodologia empregada sendo confirmada utilizando amostra certificada para as determinações de Ca, P, Mg e K.

A fim de manter um controle analítico do procedimento, determinou-se a concentração de zinco e selênio em uma amostra certificada - CRM 281 – *Trace Elements in Rye Grass*, produzida pelo *Institute for Reference Materials and Measurements*, sendo que o procedimento de decomposição adotado seguiu o mesmo protocolo já descrito.

### **3.4. Determinação das espécies químicas presentes no solo utilizado para cultivo**

Determinou-se no solo utilizado para cultivo das plantas, além de selênio e zinco, alguns dos principais nutrientes presentes no solo. Para tanto, realizou-se a amostragem do solo, que foi coletado em diferentes pontos e reunido em um recipiente plástico, sendo quarteado e seco em estufa a 60 °C. Em seguida, adicionou-se ca. 200 mg da amostra em frascos de perfluoralcoxi, seguido da adição dos reagentes para decomposição, que consistiam em 10,0 mL de água régia e 5,0 mL de ácido fluorídrico (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após realizar a decomposição, seguindo o programa descrito na Tabela 2.6, as amostras receberam a adição de ca. 300 mg de ácido bórico para garantir a total eliminação

de resíduos de íons fluoreto e, então, foram levadas até quase a secura, com auxílio de um banho de areia a temperatura ajustada a 80 °C. As amostras foram, então, filtradas e retomadas para 25,0 mL utilizando ácido nítrico 1,0% (v/v) subdestilado.

Vale ressaltar que alguns elementos já apresentavam concentração conhecida, uma vez que o substrato já havia sido determinado pelo Instituto de Biologia da Unicamp. Maiores detalhes serão discutidos, posteriormente, neste capítulo.

**Tabela 2.6.** Condições empregadas para realizar a decomposição do solo empregado no cultivo dos girassóis, utilizando radiação micro-onda.

<b>Etapa</b>	<b>Potência (W)</b>	<b>Tempo (min)</b>
1	250	3
2	500	5
3	600	5
4	700	5
5	80	2

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

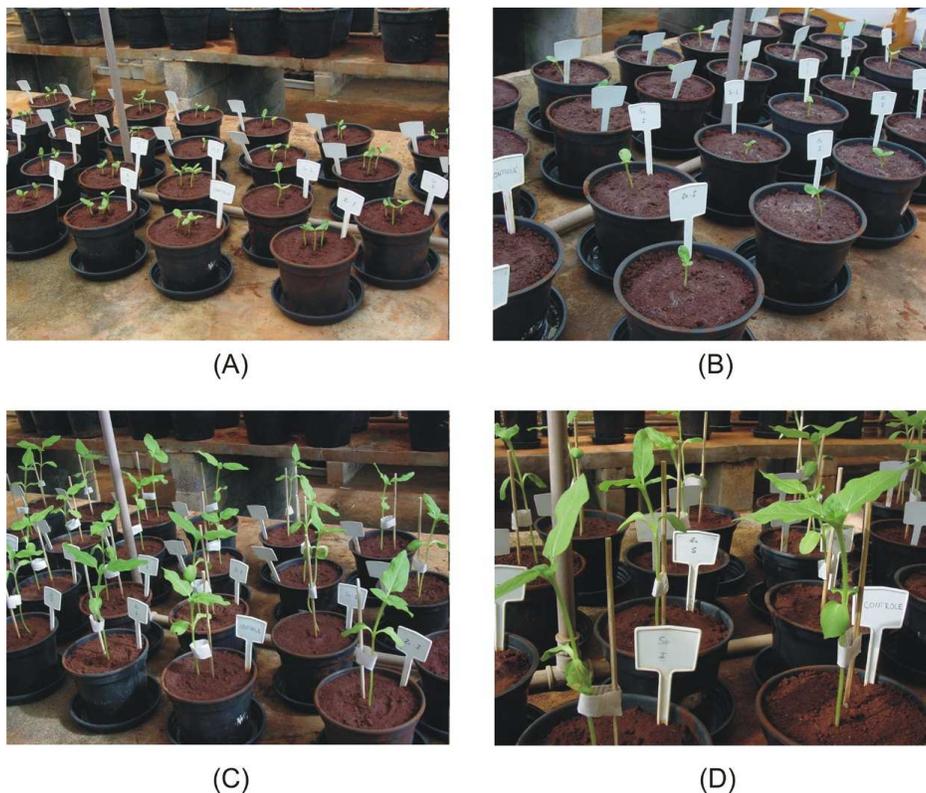
### **4.1. Plantio dos girassóis**

Alguns comentários serão realizados com relação ao período em que os girassóis foram cultivados. Para iniciar, deve-se discutir a questão da esterilização do solo utilizado. Este procedimento se faz necessário para eliminar as hifas de fungo que se unem a raiz do vegetal, formando uma estrutura denominada de micorriza. Esta associação facilita a absorção de nutrientes e água, mas pode resultar na retenção de zinco e selênio nas raízes dos vegetais e fornecer um resultado que não reflete a real influência dos íons no desenvolvimento das

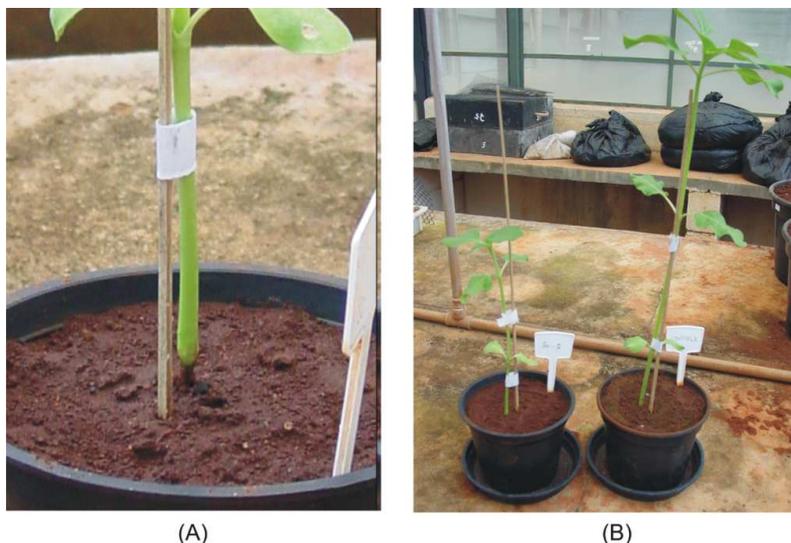
plantas. Por isso a adição de fosfato se justificou, no sentido de facilitar a absorção deste nutriente por parte da planta.

Devido ao desenvolvimento rápido da variedade, com cinco dias foi possível realizar o desbaste das plantas e iniciar a irrigação utilizando soluções de zinco e selênio (a irrigação a partir do 5º dia teve como objetivo auxiliar no desenvolvimento do sistema radicular das plantas). A Figura 2.2 apresenta algumas imagens exibindo as plantas com cinco dias de desenvolvimento, antes e após o desbaste, bem como ao 14º dia de desenvolvimento.

Ao longo do desenvolvimento dos girassóis, pôde-se observar que as plantas irrigadas com selênio, principalmente aquelas que recebiam adição das concentrações mais elevadas deste elemento, apresentavam suas bases necrosadas, como pode ser observado pela imagem da Figura 2.3. Vale ressaltar que inclusive uma das plantas foi perdida pela falta de sustentação da mesma.



**Figura 2.2.** Plantas com 5 dias de desenvolvimento: (A) antes do desbaste, (B) após o desbaste e (C e D) 14 dias após o plantio.



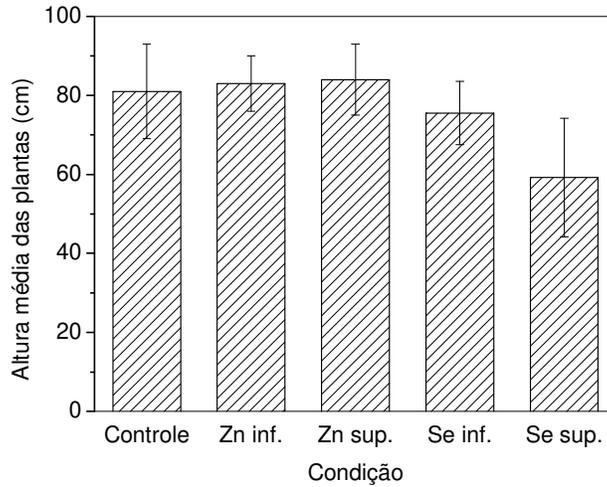
**Figura 2.3.** Imagem típica da base de uma planta cultivada com a dose superior de selênio: (A) após 27 dias de cultivo; (B) comparativo entre uma planta cultivada com dose superior de selênio, à esquerda, e uma planta controle, à direita.

Ao final dos 44 dias de cultivo, algumas plantas já começavam a apresentar a formação de botões (observado a partir do 42º dia) como pode ser visto na Figura 2.4. Manter o cultivo nestas condições deixaria de ser interessante visto que os íons adicionados passariam a se concentrar exatamente nestas novas estruturas.



**Figura 2.4.** Detalhe do botão de uma planta do grupo controle no 44º dia de desenvolvimento.

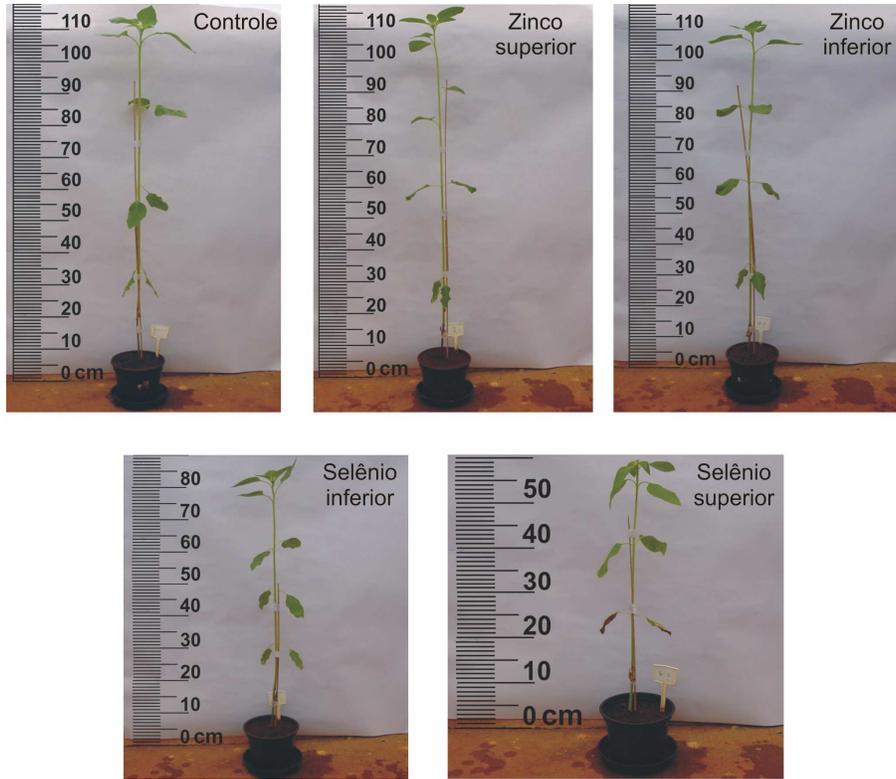
No dia da coleta das plantas, suas partes aéreas foram medidas e os resultados são apresentados no gráfico da Figura 2.5.



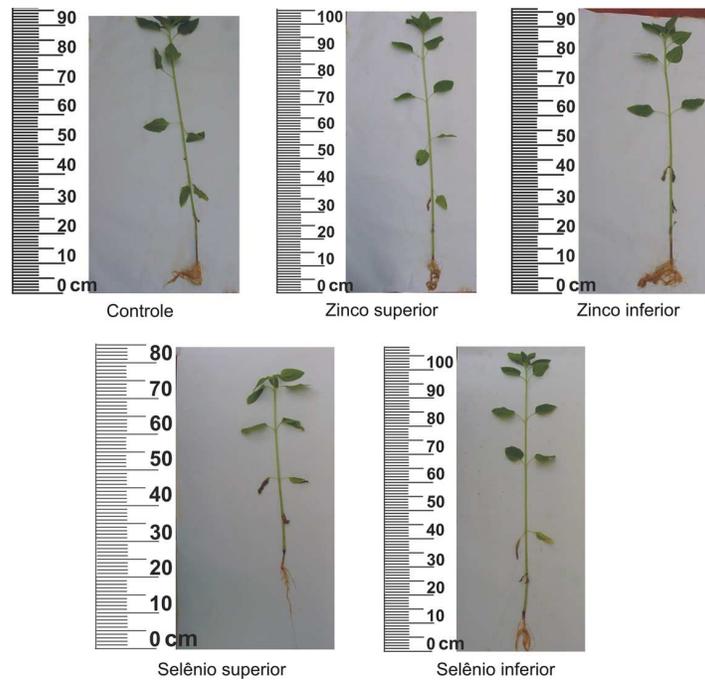
**Figura 2.5.** Desenvolvimento dos girassóis após 44 dias de cultivo. Número de réplicas: n = 8.

Embora as médias dos resultados obtidos sejam consideradas estatisticamente iguais, pode-se observar que as plantas cultivadas com a adição de selênio apresentaram-se menos desenvolvidas frente às plantas controle. Já as plantas cultivadas na presença de zinco apresentaram desenvolvimento semelhante às plantas irrigadas apenas com água. Fotos das plantas no dia coleta podem ser observadas na Figura 2.6.

Durante a coleta pôde-se notar que as plantas cultivadas na presença de selênio apresentavam menor massa de raiz quando comparado com as demais condições. Para as plantas controle e cultivadas na presença de zinco as raízes distribuía-se por todo o pote plástico, aumentando, inclusive, o grau de dificuldade para que as mesmas fossem preservadas durante a remoção. A Figura 2.7 apresenta imagens de algumas plantas representativas de cada tratamento.



**Figura 2.6.** Imagens das plantas ao 44<sup>o</sup> dia, momentos antes da coleta.



**Figura 2.7.** Imagens representativas para cada grupo de plantas submetidas aos tratamentos propostos, minutos após a retirada das mesmas dos vasos.

Por fim, embora as bases das plantas cultivadas com adição de selênio tenham apresentado necrose, suas raízes apresentavam-se estruturalmente intactas, mesmo estando presentes em menor volume.

## 4.2. Concentração dos elementos no solo

Os elementos de maior interesse neste estudo foram determinados no solo empregado para cultivo dos girassóis. A Tabela 2.7 apresenta os resultados obtidos para as referidas determinações. Pode-se notar que para o zinco os teores médios globais no solo devem se situar entre 17 e 160 mg kg<sup>-1</sup> [8], valores estes comparáveis com o resultado determinado no solo.

**Tabela 2.7.** Concentrações das espécies químicas (média ± desvio padrão, n = 3) determinadas no solo empregado para cultivo dos girassóis.

Elemento	Concentração (mg kg <sup>-1</sup> )
Zinco	173 ± 34
Selênio	134 ± 10
Magnésio	61 ± 16
Enxofre	26324 ± 920
Fósforo	7254 ± 974

Com relação ao fósforo, a Embrapa possui uma publicação específica sobre girassóis [1]. Nela descreve que no estado do Paraná, que apresenta elevada produtividade para a cultura, o teor deste elemento situa-se em torno de 6,0 mg dm<sup>-3</sup>. Considerando os dados obtidos neste trabalho, tem-se um valor de 9 ± 1 mg dm<sup>-3</sup> (considerando o valor determinado para fósforo de 7254 ± 974 mg kg<sup>-1</sup> e a densidade do solo utilizado, determinada experimentalmente, de 1,3 kg L<sup>-1</sup>) mostrando que a planta possuía excesso deste

nutriente devido a adição do mesmo ao solo com o objetivo de suprir as suas necessidades (como foi mencionado no procedimento experimental).

A mesma referência [1] apresenta resultados relacionados às concentrações de enxofre e magnésio nas folhas das plantas no início do florescimento. Tais dados podem ser utilizados para avaliar se as concentrações dos nutrientes no solo apresentam-se adequadas ou não para o cultivo da planta. A Tabela 2.8 reúne tais valores e os compara com os resultados obtidos neste trabalho. Níveis de suficiência médios indicam máxima atividade fisiológica, resultando em maiores taxas de crescimento. Para magnésio, a concentração nas folhas apresenta-se abaixo do adequado. No entanto, deve-se considerar que as plantas deste estudo foram coletadas pouco antes do florescimento, ou seja, após o período de crescimento. Mesmo assim, pode-se ter uma referência para avaliação da composição nutricional disponível para o bom desenvolvimento das plantas.

**Tabela 2.8.** Valores de referência para os teores médios de enxofre e magnésio nas folhas de girassol no início do florescimento [1] e comparação com os valores obtidos neste trabalho. Maiores detalhes referentes às quantificações de enxofre e magnésio nas folhas serão fornecidas ao longo deste capítulo.

Elemento	Valor referência (g kg <sup>-1</sup> )	Neste trabalho (g kg <sup>-1</sup> )
S	Baixo: < 3,0	Controle: 6,1
	Médio: 3,0 a 6,4	Tratamento com zinco: 6,9
	Alto: > 6,4	Tratamento com selênio: 16,1*
Mg	Baixo: <5,1	Controle: 2,4
	Médio: 5,1 a 9,4	Tratamento com zinco: 3,1
	Alto: > 9,4	Tratamento com selênio: 2,4

\* O valor referente à concentração de enxofre nas folhas das plantas tratadas com selênio sofre influência do selênio que foi adicionado no meio.

Com relação ao teor de selênio, o valor determinado é *ca.* 350 vezes superior à concentração média global para este elemento em solos, que é de *ca.* 0,4 mg kg<sup>-1</sup> [36]. No entanto, este valor pode apresentar uma variabilidade

relativamente grande, partindo de  $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$  em solos que se apresentam deficientes neste elemento até  $5000 \text{ mg kg}^{-1}$  em solos com características seleníferas [36]. Mesmo assim, deve-se enfatizar que, visualmente ao longo do cultivo, as plantas que não receberam adição deste elemento apresentaram desenvolvimento adequado, indicando que o selênio presente naturalmente no solo não causou problemas para o metabolismo das plantas.

### **4.3. Avaliação do perfil ionômico nas diferentes regiões das plantas**

Buscou-se avaliar o perfil iônico dos caules, raízes e folhas das plantas cultivadas mediante contaminação com zinco ou selênio, visando encontrar possíveis alterações nos teores de tais espécies químicas quando comparadas às plantas do grupo controle, bem como das sementes pertencentes ao lote empregado no plantio. Observou-se, também, que a avaliação de outros elementos poderia fornecer informações importantes para compreensão do metabolismo das plantas, tornando mais fácil a compreensão dos processos biológicos ocorridos em cada vegetal submetido a uma condição específica.

Antes, no entanto, o protocolo empregado para decomposição foi avaliado por meio da digestão ácida de um material de referência certificado (CRM 281), com a posterior quantificação de zinco e selênio. O resultado obtido, apresentado na Tabela 2.9 revela que não há diferença estatística ao nível de confiança de 95% quando se aplica o teste *t* de Student, o que confirma a possibilidade de aplicação do método de digestão proposto para as análises elementares, como já havia sido confirmado por Garcia *et al.* [35].

**Tabela 2.9.** Determinação de zinco e selênio empregando o procedimento para decomposição proposto e a comparação com o valor descrito na carta de certificação do material de referência certificado CRM 281 – *Trace Elements in Rye Grass*.

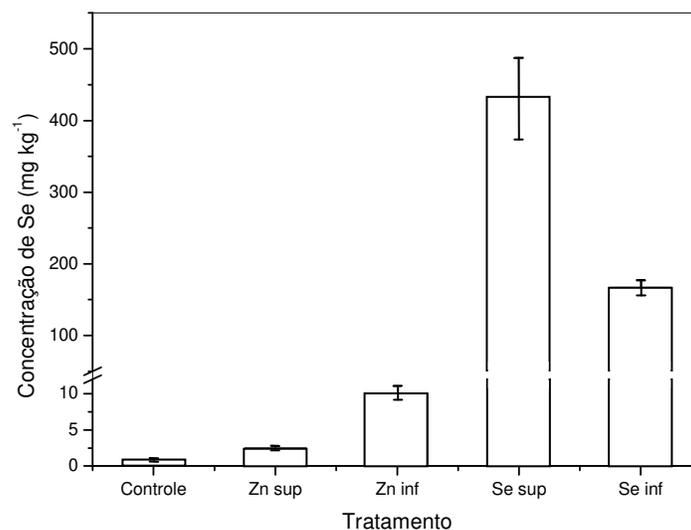
Analito	Concentração (mg kg <sup>-1</sup> )	
	Procedimento proposto	Valor certificado
Zinco	28 ± 3 mg kg <sup>-1</sup>	31 ± 2 mg kg <sup>-1</sup>
Selênio	31 ± 5 µg kg <sup>-1</sup>	28 ± 4 µg kg <sup>-1</sup>

#### 4.4. Plantas irrigadas com solução de selênio

##### 4.4.1. A translocação e a distribuição do selênio nas plantas

O ânion escolhido para irrigação das plantas tratadas na presença de selênio consistia no ânion selenito. A princípio, a estratégia adotada parecia não ser a mais adequada visto que a literatura reporta a absorção de íons selenato como principal fonte de selênio para plantas. No entanto, o principal motivo que influenciou na decisão de empregar íons  $\text{SeO}_3^{2-}$  como fonte de selênio para as plantas consistia no fato de que, atualmente, a literatura ainda não compreende, em sua totalidade, os mecanismos pelos quais os íons selenito são absorvidos a partir do solo. Vale ressaltar que não se pode descartar a importância de ambos os íons para a nutrição vegetal, uma vez que dependendo da capacidade de oxidação do solo, ou pH, tem-se a predominância de uma ou outra espécie. Cálculos termodinâmicos presentes na literatura apontam que, de maneira geral, em solos apresentando pH ácido, assim como o pH do solo utilizado neste trabalho (ca. 5,5), a espécie predominante consistia nos íons selenito, mais precisamente íons  $\text{HSeO}_3^-$ , se levarmos em consideração o fato de que este íon se apresenta como um ácido diprótico fraco com  $\text{pKa}_1 = 2,46$  e  $\text{pKa}_2 = 7,31$  [17].

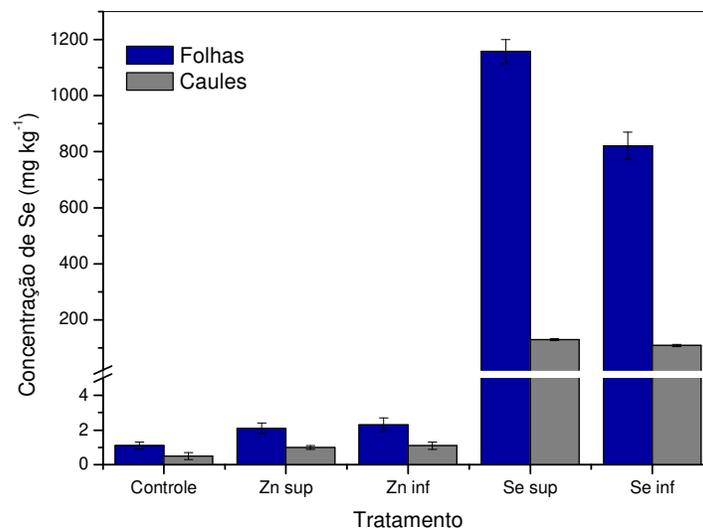
Mesmo considerando o fato de que a absorção de íons selenato ocorre de maneira preferencial, o gráfico apresentado na Figura 2.8 revela que a incorporação do selênio no tecido das raízes das plantas tratadas com selênio ocorreu de maneira significativa, ou seja, as plantas não conseguiram evitar a migração do excesso deste elemento do solo para os tecidos das raízes. Considerando a concentração média de selênio nas raízes das plantas dos grupos controle e tratadas com zinco, observa-se que estas apresentaram teores de selênio *ca.* 95 vezes inferiores aqueles observados nas plantas tratadas com a maior dose de selênio (selênio superior) e *ca.* 37 vezes inferiores ao das plantas tratadas com a menor dose de selênio (selênio inferior). Vale ressaltar que as raízes utilizadas no estudo foram devidamente limpas com água deionizada logo após a colheita. Desta forma, elimina-se a possibilidade de uma possível contaminação proveniente do solo contaminado com selênio.



**Figura 2.8.** Concentração de selênio, em miligramas do elemento por quilograma de material seco, determinada nas raízes dos girassóis para as diferentes condições de cultivo empregadas neste trabalho.

O mesmo perfil observado nas raízes também pode ser identificado nos caules e folhas das plantas, como é apresentado no gráfico da Figura 2.9. Novamente, a comparação das concentrações médias de selênio nas plantas dos grupos controle e tratadas com zinco com as concentrações presentes nas plantas

tratadas com as diferentes doses de selênio revelam os altos teores deste elemento também nas partes aéreas dos girassóis. As folhas das plantas tratadas com a maior dose de selênio apresentam teores deste elemento *ca.* 630 vezes superiores ao das plantas adotadas como referência, enquanto que para as plantas tratadas com a menor dose de selênio os teores são *ca.* 450 vezes superiores. Para os caules das plantas tratadas com a maior e menor dose de selênio, estes valores são *ca.* 150 e 120 vezes superiores ao das plantas de referência.



**Figura 2.9.** Concentração de selênio, em miligramas do elemento por quilograma de material seco, determinada nas folhas e caules dos girassóis para as diferentes condições de cultivo empregadas neste trabalho.

Baseando-se nestes dados, pode-se ter algumas conclusões com relação ao comportamento observado. A primeira delas refere-se ao fato de que a translocação do selênio ocorre de maneira efetiva das partes inferiores das plantas para as regiões aéreas. Outra questão está relacionada com o fato do selênio concentrar-se principalmente nas folhas das plantas tratadas com este elemento, como pode ser observado pelos altos valores observados no gráfico da Figura 2.8 para as condições selênio superior e inferior. Já para os girassóis dos grupos controle e tratados com zinco, embora exista uma tendência relacionada a

uma maior concentração deste elemento nas folhas, quando comparado aos caules, a aplicação do teste *t* de Student (nível de confiança de 95%) revela que os resultados podem ser considerados estatisticamente iguais.

Estes dados evidenciam duas questões: na primeira, conclui-se que as plantas que não receberam adição de selênio apresentaram uma distribuição homogênea deste elemento em todas as regiões, visando, exclusivamente, a manutenção do metabolismo. Já para as plantas tratadas com selênio observou-se, preferencialmente, a migração deste elemento para as folhas das plantas, com o objetivo de minimizar os danos causados pelo excesso do selênio adicionado durante a irrigação. A literatura reporta a existência de mecanismos de volatilização de compostos de selênio com o objetivo de promover a desintoxicação de um determinado organismo. Tais processos começaram a serem elucidados já no final do século XIX, onde se propunha, em animais, a possível eliminação de tal elemento pela respiração, devido à biosíntese de compostos voláteis de selênio, tal como o dimetilseleneto [37]. Para plantas superiores, tal mecanismo foi reportado apenas em meados da década de 1960 e pode-se identificar a presença de diferentes compostos voláteis de selênio sendo eliminados pela transpiração foliar, tal como o próprio dimetilseleneto e o dimetildiseleneto [14, 37].

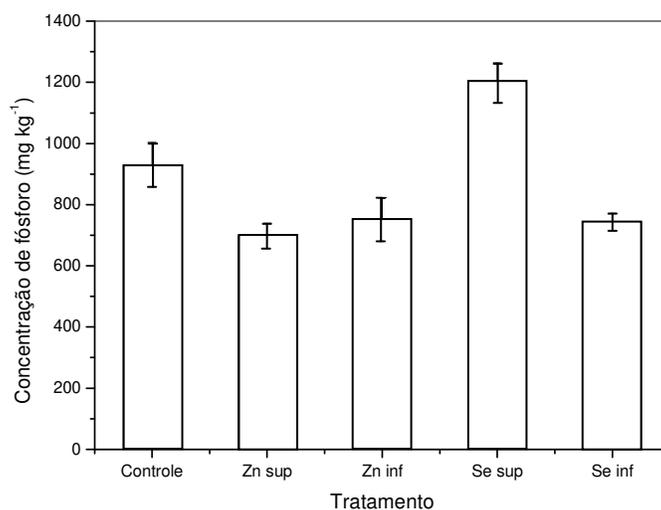
Não é possível afirmar se tal processo realmente ocorre em girassóis. Em buscas realizadas na literatura não se encontra dados relacionados com esta questão. No entanto, ao longo do cultivo das plantas era possível sentir nas folhas e no ambiente da estufa um cheiro muito intenso destes compostos voláteis de selênio, o que fornece um grande indicio de que esta estratégia esteja sendo adotada pelas plantas para minimizar os problemas causados pela contaminação. Novamente, vale ressaltar que caso o referido mecanismo de desintoxicação esteja ativado ele não responde de maneira satisfatória as necessidades da planta, uma vez que o selênio se apresenta em altas concentrações nas partes superiores. Apenas para ilustrar, Terry *et al.* [38] reportam que plantas da família *Brassicaceae* têm a capacidade de eliminar até 40 g de selênio por hectare ao dia

na forma de diferentes compostos voláteis, o que certamente pode caracterizá-la como uma planta tolerante a tal elemento.

#### 4.4.2. O mecanismo de incorporação do selênio

Como mencionado anteriormente, os mecanismos de incorporação do selênio sob a forma de selenito ainda não se apresentam totalmente elucidados pela comunidade científica. No entanto, sabe-se que, depois de incorporado, o selênio em algumas plantas é facilmente translocado das raízes para as regiões aéreas da planta sob a forma de selenato.

De acordo com as informações apresentadas e discutidas anteriormente [17], levando em consideração aspectos termodinâmicos, pode-se inferir que é pouco provável a interconversão de espécies (de selenito a selenato) no solo empregado para cultivo, devido ao pH. Assim, buscou-se avaliar o teor de fósforo nas raízes das plantas com o objetivo de encontrar possíveis alterações nas concentrações deste elemento, fornecendo evidências da possível absorção dos íons selenito via transportadores de fosfato. O gráfico apresentado na Figura 2.10 mostra os resultados obtidos para este estudo.



**Figura 2.10.** Concentração de fósforo, em miligramas do elemento por quilograma de material seco, determinada nas raízes dos girassóis para as diferentes condições de cultivo empregadas neste trabalho.

Pode-se observar que os níveis de fósforo para as plantas tratadas com os menores teores de selênio são semelhantes àqueles apresentados pelas plantas do grupo controle ou tratadas com zinco. Já para as plantas irrigadas com a maior concentração de selênio, nota-se uma ligeira elevação no teor de fósforo nas raízes ( $928 \pm 48 \text{ mg kg}^{-1}$  para as plantas do grupo controle e  $1199 \pm 41 \text{ mg kg}^{-1}$  para as plantas do grupo selênio superior), que podem ser considerados valores estatisticamente diferentes quando se emprega o teste *t* de Student ao nível de 95% de confiança. No entanto, como se está trabalhando com sistemas biológicos, estas alterações não podem ser consideradas significativas ao ponto de indicar mudanças nos teores de fósforo das plantas. Para se ter uma referência, há trabalhos na literatura empregando diferentes espécies vegetais [17, 39] que reportam uma redução na absorção de selenito que varia entre 20 e 70% causada por um aumento de 10 vezes na concentração de fosfato para plantas cultivadas em meio hidropônico. Tais variações podem ser consideradas muito mais significativas quando comparadas com a variação observada neste estudo.

Desta forma, não se pode afirmar que existam alterações na absorção de fósforo para as plantas tratadas com selênio. Assim, não se pode descartar as possibilidades de que os íons selenito tenham sido absorvidos tanto por difusão, ou seja, devido às diferenças entre a concentração dos íons na planta e no meio empregado para cultivo, quanto por meio dos transportadores de fosfato presentes nas raízes.

#### **4.4.3. Influência do selênio na absorção de nutrientes essenciais para a fotossíntese**

A clorofila consiste em um grupo de pigmentos fotossintéticos presente no cloroplasto das plantas cujas estruturas químicas consistem em um anel porfirínico que apresenta um átomo de magnésio complexado, sendo sintetizados nos vegetais por meio de uma rota metabólica semelhante àquela do grupo prostético heme nos animais [40].

Um dos problemas identificados ao longo do cultivo dos girassóis que recebiam adição de selênio consistia no fato de que os mesmos apresentavam suas folhas amareladas fornecendo indícios da existência de clorose, ou seja, as plantas não eram capazes de sintetizar quantidade suficiente de clorofila. A Figura 2.11 mostra a folha de uma planta pertencente ao grupo que recebeu a adição de selênio em maior concentração sendo representativa para o problema identificado ao longo do cultivo.

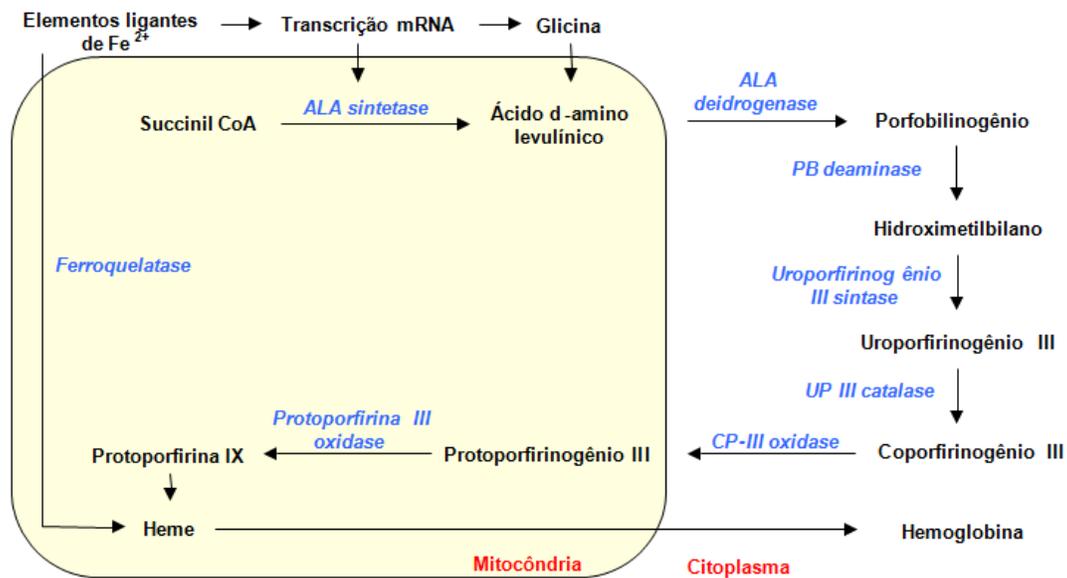


**Figura 2.11.** Imagem típica de uma folha de girassol apresentando clorose e pertencente a uma planta do grupo cultivado com a adição da máxima concentração de selênio, após 27 dias de cultivo.

Sabe-se que a deficiência na absorção de íons metálicos, em especial ferro e magnésio, pode conduzir a este problema. Assim, a abordagem deste estudo consistiu em avaliar possíveis alterações no teor destes elementos no sentido de determinar se a ocorrência de clorose está relacionada com a deficiência no teor de ferro ou magnésio nas plantas tratadas com selênio.

A princípio parece estranho avaliar o teor de ferro e relacioná-lo com possíveis alterações na síntese de clorofila, uma vez que, diferente do grupo heme, a clorofila apresenta um átomo de magnésio, e não de ferro, coordenado ao anel porfirínico. No entanto, sabe-se há bastante tempo que a síntese das porfirinas tanto em animais quanto em plantas é dependente da presença de íons ferro [41]. Na Figura 2.12 é apresentada a rota de síntese para o grupo heme.

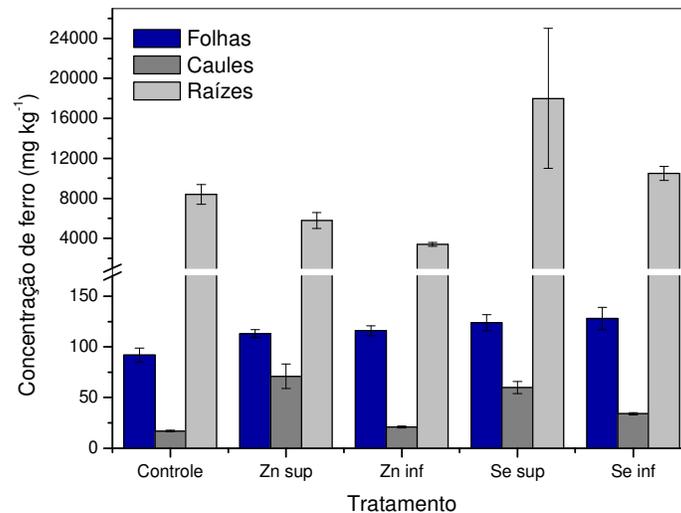
Nota-se que ela tem início com a síntese do ácido D-aminolevulínico a partir da reação entre glicina e succinil CoA, um intermediário do ciclo de Krebs. No entanto, para que a reação ocorra é necessária a participação da enzima ALA sintetase, que tem o gene que a codifica ativado na presença de íons  $Fe^{2+}$  [42, 43]. Assim, caso não haja ferro disponível para a planta ela não conseguirá sintetizar as porfirinas para se ligarem aos átomos de magnésio.



**Figura 2.12.** Rota de síntese para o grupo heme nos animais. Observe que os íons  $Fe^{2+}$  que participam da ativação do gene da enzima ALA sintetase são, ao final do processo, utilizados como substrato pela enzima ferroquelatase a qual promove a ligação metal-porfirina. Para as plantas, a síntese da porfirina segue rota semelhante. No entanto, ao final do processo íons magnésio ligam-se à molécula.

O gráfico apresentado na Figura 2.13 exibe os resultados obtidos para quantificação de ferro nos caules, folhas e raízes das plantas para as cinco condições de cultivo empregadas. Nele, pode-se observar que os teores de ferro nas raízes das plantas, para todas as condições de cultivo, foram superiores ao das partes aéreas. Este resultado era esperado uma vez que o controle para entrada dos íons ferro na planta é regido pelas raízes por meio da exudação de

compostos fenólicos que aumentam a solubilidade dos íons no solo facilitando a chegada do nutriente até as raízes [43]. Comparando os diferentes tratamentos de irrigação empregados, observa-se que não há variações significativas para a concentração deste elemento nesta região da planta. Assim, pode-se concluir que a adição de selênio não interferiu nos mecanismos para o controle da entrada de ferro nos girassóis.



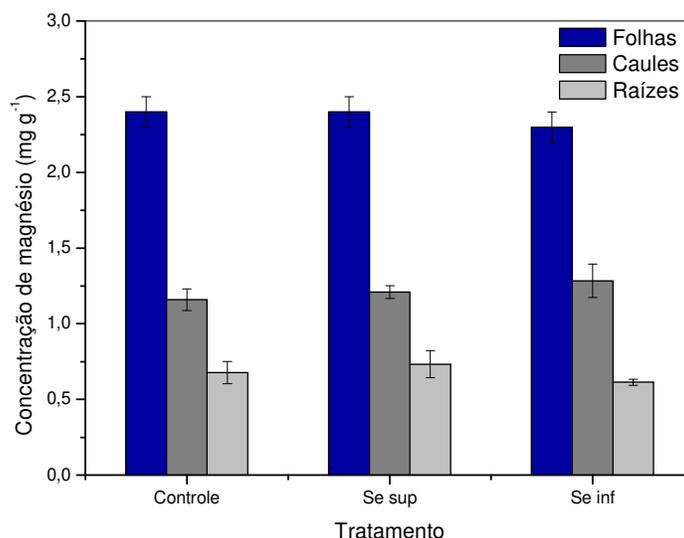
**Figura 2.13.** Concentração de ferro, em miligramas do elemento por quilograma de material seco, determinada nos caules, raízes e folhas dos girassóis para as cinco diferentes condições de cultivo empregadas neste trabalho.

Posteriormente à captação do ferro pelas raízes, os íons são transportados por fluxo de massa ou difusão para todas as partes do vegetal [43]. Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que os teores deste elemento nas folhas são superiores àqueles encontrados nos caules. O perfil obtido segue a tendência esperada, uma vez que as folhas apresentam um papel decisivo para realização da fotossíntese. Logo, como o teor de clorofila nas folhas é maior, os íons  $Fe^{2+}$  tendem a se acumular em maior proporção nesta região das plantas. Novamente, não se observa alterações significativas no teor de ferro quando se compara os diferentes tratamentos realizados, sendo o valor médio para a concentração deste elemento para as plantas dos grupos controle e tratadas com zinco igual a  $107 \pm$

13 mg kg<sup>-1</sup> enquanto que o valor médio para as plantas tratadas com selênio é de 126 ± 3 mg kg<sup>-1</sup>. Conclui-se, então, que a clorose não é originada devido à falta de ferro para ativação da enzima ALA-sintetase e síntese das porfirinas.

Uma segunda hipótese também foi levantada. Neste caso, as porfirinas seriam sintetizadas de maneira adequada formando o que se chama de feofitina (a porfirina sem o átomo de magnésio coordenado a sua estrutura). No entanto, ao final da síntese, a planta não teria íons magnésio disponíveis para se ligarem a feofitina e formar a clorofila.

Desta forma, a concentração de magnésio também foi avaliada. A Figura 2.14 apresenta os teores deste elemento nas diferentes regiões das plantas para o grupo controle e os dois grupos de plantas tratadas com selênio. Observa-se que os teores de magnésio nas folhas são superiores aqueles encontrados nas raízes e caules, sendo que, novamente, este resultado se enquadra aos padrões esperados para uma planta com metabolismo normal.



**Figura 2.14.** Concentração de magnésio, em miligramas do elemento por grama de material seco, determinada nos caules, raízes e folhas dos girassóis para as duas condições de cultivo que empregaram irrigação com selênio e para a condição de irrigação controle.

Comparando agora o teor de magnésio nas folhas das plantas tratadas com selênio com as plantas do grupo controle, observa-se que as concentrações deste elemento apresentam-se semelhantes para todas as condições de cultivo, indicando que não houve falta dos íons magnésio para formação da clorofila. Teores semelhantes deste elemento para caules e raízes também são encontrados para todas as condições de cultivo.

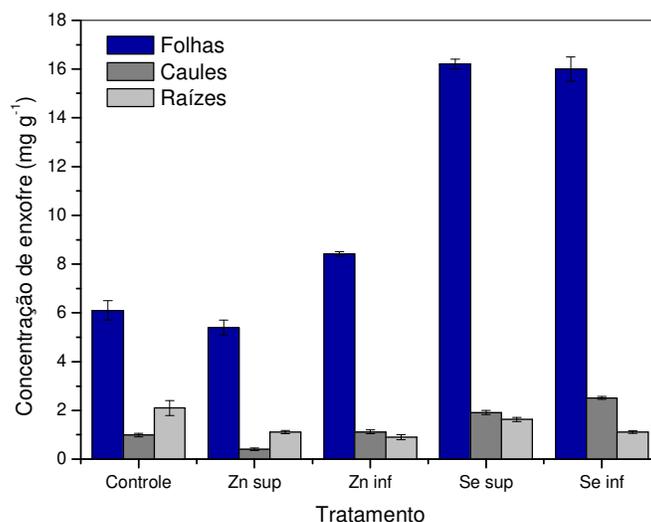
Assim, pode-se concluir que a aparente clorose observada nas plantas tratadas com selênio não ocorreu em decorrência da falta de íons ferro ou magnésio, uma vez que o perfil ionômico observado enquadra-se com aquele apresentado pelas plantas do grupo controle ou irrigadas com zinco.

#### **4.4.4. A interferência do selênio no metabolismo das plantas**

Como mencionado anteriormente, o selênio interfere de maneira significativa no metabolismo do enxofre nas plantas. Assim, determinou-se os teores deste elemento nos girassóis para avaliação de possíveis danos causados às plantas devido à irrigação com selênio.

O gráfico apresentado na Figura 2.15 exhibe os resultados obtidos para os teores de enxofre nas diferentes regiões das plantas para todos os tratamentos. Nele, observa-se que os teores de enxofre nos caules e raízes das plantas são bastante semelhantes e não se pode dizer que existam diferenças significativas entre os diferentes grupos de plantas.

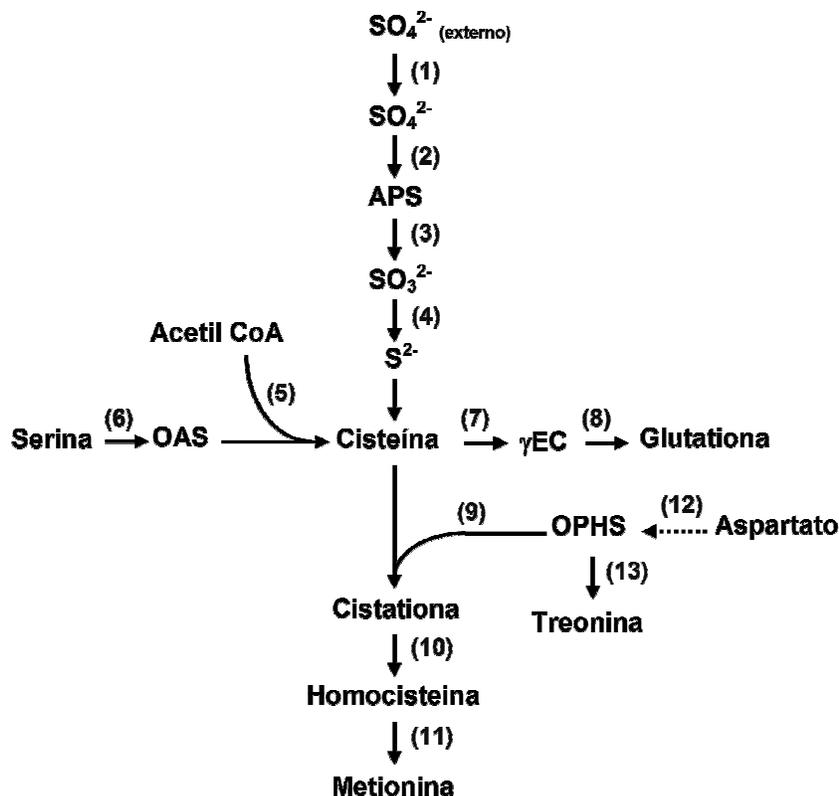
No entanto, quando se avalia o teor de enxofre nas folhas, observa-se que as plantas tratadas com selênio apresentam concentrações médias que chegam a ser ca. 2,5 vezes superiores às das demais plantas. Esse resultado reflete o desequilíbrio fisiológico do vegetal exatamente na região da planta onde se tem o destino final do selênio, que consiste nas folhas.



**Figura 2.15.** Concentração de enxofre, em miligramas do elemento por grama de material seco, determinada nos caules, raízes e folhas dos girassóis para as diferentes condições de cultivo empregadas neste trabalho.

Avaliando dados da literatura, pôde-se obter evidências de que os resultados obtidos são coerentes, sendo que os mesmos podem ser avaliados sob dois pontos de vista distintos. No primeiro, deve-se considerar dois fatores: primeiramente, o fato de que, neste caso, a captação de selênio pela planta apresenta-se independente dos transportadores de sulfato, sendo que o emprego de íons selenito para cultivo faz com que a absorção ocorra, preferencialmente, por difusão. Em segundo lugar, tem-se o fato de que o selênio interfere na rota da biossíntese da cisteína, glutatona e metionina, apresentada na Figura 2.16. Pode-se observar que a síntese destes três compostos apresenta ligação direta com a captação de enxofre pela planta. Assim, devido às semelhanças nas propriedades químicas dos átomos de enxofre e selênio, tem-se a incorporação aleatória do selênio (devido à alta concentração) à rota de síntese da cisteína, levando ao aumento na atividade da enzima *o*-acetilserina tiolase (indicada na Figura 2.16 pelo número 5). Isso resulta numa maior demanda para produção da coenzima acetil CoA e, conseqüentemente, da *o*-acetilserina (OAS). Observa-se,

então, que passa a haver um desequilíbrio completo dos precursores da cisteína na rota metabólica.



**Figura 2.16.** A rota para biossíntese da cisteína, metionina e glutatona. Enzimas envolvidas: (1) Transportadores de íons sulfato; (2) ATP sulfurilase; (3) Adenosina fosfosulfato redutase; (4) Sulfito redutase; (5) *O*-acetilserina tiolase; (6) Serina acetil transferase; (7) Glutamilcisteína sintase; (8) Glutatona sintetase; (9) Cistationa  $\gamma$ -sintetase; (10) Cistationa  $\beta$ -liase; (11) Metionina sintase; (12) Aspartato quinase, aspartato semialdeído desidrogenase, homoserina desidrogenase; homoserina quinase; (13) Treonina quinase. Abreviaturas: APS – adenosina fosfosulfato; OAS – *o*-acetilserina; OPHS – *o*-fosfohomoserina [adaptado de 14].

Como a concentração de *o*-acetilserina é um dos compostos responsáveis pela regulação da captação de enxofre pela planta, e este composto apresenta-se em alta concentração, o organismo entende que existe um déficit de enxofre e responde com a ativação dos transportadores de sulfato presentes na raiz. Como

resultado, tem-se níveis de enxofre elevados nas regiões da planta que apresentam as maiores concentrações de selênio.

Neste ciclo, as concentrações de cisteína e glutatona também irão influenciar na captação de enxofre pela planta. Como tais moléculas não estão sendo sintetizadas de maneira preferencial, tem-se novamente um sinal positivo para ativação dos transportadores de sulfato.

Sob este primeiro ponto de vista, o resultado indica que o selênio estaria sendo empregado pela planta para síntese de aminoácidos. No entanto, até este momento, não se pode concluir se estes aminoácidos estariam sendo utilizados para a síntese de proteínas ou se estariam sendo modificados numa tentativa da planta de eliminá-los. Devido aos problemas encontrados pelas plantas para se desenvolver durante o período de cultivo, tem-se uma forte evidência de que, realmente, as proteínas foram sintetizadas empregando selenometioninas e selenocisteínas. Vale ressaltar que resultados paralelos obtidos posteriormente pelo grupo GEPAM, empregando a hifenação LA-ICP-MS, confirmam um aumento no teor de selenometionina para as plantas tratadas com selênio.

Os resultados apresentados na Figura 2.15 também podem ser avaliados por um segundo ponto de vista. Neste caso, não se pode deixar de levar em consideração o fato de que o selênio pode ter provocado o aumento de substâncias que causam estresse oxidativo [44-46]. Como consequência, tem-se elevada a produção de enzimas com o objetivo de combater tais substâncias e que são ricas em cisteínas, como, por exemplo, a glutatona, o que conduziria a uma maior demanda por átomos de enxofre, justificando o perfil obtido [47, 48].

## **4.5. Plantas irrigadas com solução de zinco**

### **4.5.1. A translocação e a distribuição de zinco nas plantas**

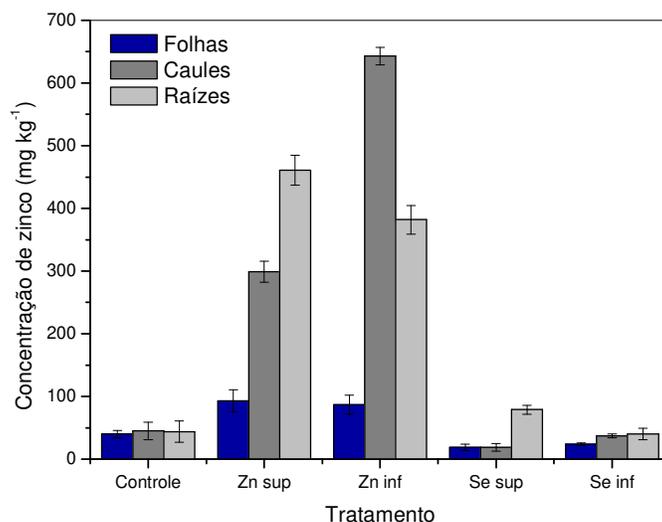
A determinação de zinco foi realizada nas diferentes regiões das plantas para todos os tratamentos de cultivo empregados neste trabalho. A distribuição

deste metal nas diferentes regiões das plantas pode ser observada no gráfico apresentado na Figura 2.17.

Observa-se que tanto para as plantas do tratamento controle quanto para aquelas tratadas com selênio não há variações nos teores de zinco que possam ser consideradas significativas sob o ponto de vista biológico. No entanto, quando se avalia a concentração média de zinco nas raízes e caules para as plantas dos dois tratamentos com zinco observa-se que os teores deste elemento são *ca.* 7 vezes e *ca.* 13 vezes superiores, respectivamente, quando comparado aos teores deste elemento nas demais condições de cultivo. Isto demonstra que o zinco adicionado ao longo do período de cultivo foi absorvido pelas plantas de maneira efetiva.

Quando se avalia a translocação deste elemento para as folhas, nota-se que este processo não se dá de maneira efetiva, diferente do que ocorria com o selênio nas plantas tratadas com selenito. Embora os teores de zinco nas plantas tratadas com zinco sejam *ca.* 3 vezes superiores aqueles encontrados nas demais plantas, observa-se claramente que existem mecanismos para evitar a translocação do excesso deste elemento. Para ressaltar esta questão, nota-se que, de maneira geral, para as plantas controle e tratadas com selênio, o teor de zinco é praticamente igual em todas as regiões das plantas. A literatura reporta que os teores mais adequados de zinco nas folhas para o bom desenvolvimento do girassol situam-se entre 29 e 43 mg g<sup>-1</sup> do elemento [1]. No caso deste estudo os teores para as plantas tratadas com zinco aproximam-se de 100 mg g<sup>-1</sup>.

A resistência à translocação consiste em uma estratégia conhecida para minimizar problemas relacionados com contaminação por metais [49] e, aparentemente, pode ser um mecanismo empregado pelos girassóis para reduzir os efeitos adversos causados pela presença de zinco em excesso. No entanto, este não se apresenta como a única alternativa responsável para proporcionar tolerância ao excesso de metais. Apenas para ilustrar, têm-se as fitoquelatinas que são responsáveis por ligar íons metálicos e armazená-los, de maneira segura, longe das proteínas do citoplasma [49].

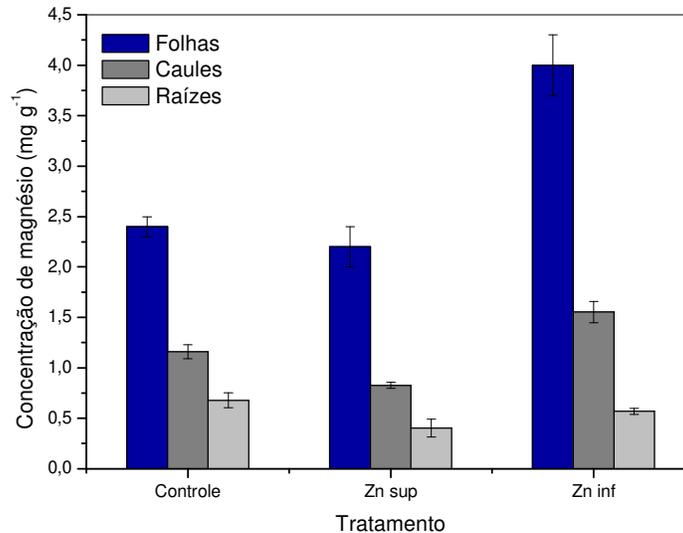


**Figura 2.17.** Concentração de zinco, em miligramas do elemento por quilograma de material seco, determinada nos caules, raízes e folhas dos girassóis para as diferentes condições de cultivo empregadas neste trabalho.

#### 4.5.2. Avaliação do estresse causado pela adição de zinco

O fato das plantas tratadas com zinco não apresentarem níveis deste elemento semelhantes ao dos caules e das raízes poderia indicar uma alteração no metabolismo destas plantas, conduzindo a uma situação de estresse. No entanto, existe um aspecto que pode ser avaliado no sentido de determinar indícios de problemas no metabolismo das plantas. A literatura reporta problemas relacionados com a captação de magnésio nas regiões superiores das plantas quando se atinge os níveis fitotóxicos de zinco [43]. Este fato é observado pois ambos consistem em íons divalentes que possuem afinidade semelhantes por diferentes compostos. Para ilustrar, pode-se citar a inibição no acúmulo de magnésio em folhas e frutos de tomate causado pelo cultivo em solo contendo altas concentrações de zinco [50]. Vale ressaltar que este problema não leva a planta a apresentar características visuais de um vegetal com deficiência em magnésio.

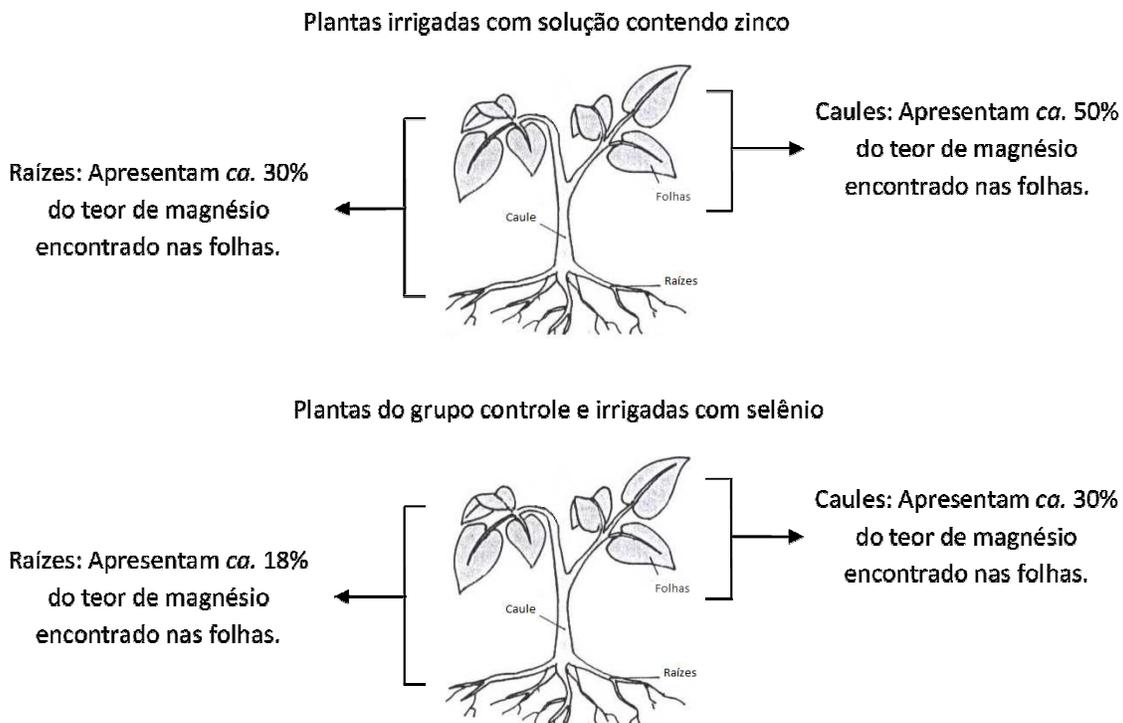
O gráfico apresentado na Figura 2.18 exibe os teores de magnésio nos caules, folhas e raízes para as plantas do grupo controle e os dois tratamentos empregando irrigação com solução contendo zinco. Pode-se observar que as plantas não apresentaram redução no acúmulo de magnésio nas folhas quando comparado ao grupo de plantas controle.



**Figura 2.18.** Concentração de magnésio, em miligramas do elemento por grama de material seco, determinada nos caules, raízes e folhas dos girassóis para as condições de cultivo que empregaram irrigação com solução de zinco e para o grupo de plantas controle.

Para reforçar este fato, quando se avalia, proporcionalmente, as concentrações de zinco nas diferentes regiões da planta, nota-se que os girassóis irrigados com este elemento continuam apresentando altos teores de magnésio nas folhas, como pode ser observado na ilustração apresentada na Figura 2.19.

Assim, pode-se afirmar que não há indícios de problemas relacionados com o acúmulo de magnésio nas plantas tratadas com zinco, sendo este mais um indicativo de que as plantas não apresentaram problemas em seu desenvolvimento devido à adição deste metal.



**Figura 2.19.** Comparação entre os teores de magnésio nas diferentes regiões das plantas submetidas aos diferentes tratamentos empregados neste trabalho.

#### 4.6. Concentração dos elementos nas sementes

As determinações das concentrações das espécies químicas de interesse para este estudo foram realizadas para as sementes de girassol e são apresentados na Tabela 2.10.

Nota-se que as concentrações de zinco e selênio nas sementes são próximas daquelas encontradas para as diferentes regiões das plantas do grupo controle, como pode ser observado nos gráficos apresentados nas Figuras 2.8, 2.9 e 2.17, o que demonstra a manutenção adequada do equilíbrio destes íons no metabolismo dos girassóis. Já para magnésio, o teor deste elemento apresenta-se próximo daquele encontrado nas raízes das plantas do grupo controle, o que também indica que se manteve em níveis constantes ao longo do cultivo. Com relação aos níveis de enxofre e fósforo estes se apresentam inferiores aos

encontrados nas diferentes regiões da planta refletindo o fato de que as sementes apresentam-se em estado latente e não exigem a captação destes elementos para obtenção de energia ou para a síntese de proteínas.

**Tabela 2.10.** Concentrações dos elementos (média  $\pm$  desvio padrão, n = 3) determinadas nas sementes de girassol pertencentes ao lote empregado para cultivo.

<b>Elemento</b>	<b>Concentração (mg kg<sup>-1</sup>)</b>
Zinco	39 $\pm$ 6
Selênio	2,6 $\pm$ 0,4
Magnésio	2610 $\pm$ 66
Enxofre	1557 $\pm$ 181
Fósforo	4,9 $\pm$ 0,6

## 5. CONCLUSÕES PARCIAIS

O plantio dos girassóis, realizado ao longo dos meses de novembro e dezembro (melhor época do ano para cultivo) possibilitou o bom desenvolvimento das plantas. Infelizmente, até hoje, a literatura não apresenta nenhum estudo sobre os valores fitotóxicos de zinco e selênio para girassol. Embora, as plantas cultivadas na presença de zinco tenham se desenvolvido de maneira semelhante às plantas controle, àquelas cultivadas na presença de selênio apresentaram menor estatura, bem como necrose em suas bases evidenciando diferenças entre os organismos.

O estudo ionômico proposto mostrou-se de grande valia para complementar futuras avaliações da espécie estudada. Pode-se compreender de maneira mais clara o destino dos íons metálicos na estrutura das plantas, avaliando as suas distribuições.

Com relação ao selênio, observou-se que a translocação do elemento ocorreu de maneira efetiva para as folhas das plantas. No entanto, os mecanismos para sua eliminação não foram eficientes, resultando em problemas no desenvolvimento dos girassóis deste grupo. Pôde-se inferir uma possível incorporação deste elemento nos aminoácidos sintetizados devido ao aumento na concentração de enxofre, mas ainda não é possível afirmar se tais aminoácidos foram inseridos à estrutura primária das proteínas sintetizadas. Tal resposta poderá ser obtida com os estudos posteriores focando a identificação do selênio empregando um sistema de ablação a laser acoplado ao ICP-MS, após separação prévia das proteínas por eletroforese em gel.

Observou-se, também, que o elevado teor de selênio não causou carência a planta com relação à captação e distribuição de íons ferro e magnésio para síntese da clorofila, ou seja, não havia falta de matéria-prima para síntese do composto.

Com respeito ao zinco, nota-se que o elemento concentra-se principalmente nas raízes e caules das plantas. Assim, diferente do selênio, o metal não é translocado eficientemente para as folhas. Não se sabe se o zinco permanece livre na planta, ligado a uma proteína específica, ou distribuído por diversas proteínas. Além disso, não há alteração nos teores de magnésio para os girassóis deste grupo, o que fornece mais um indício de que as plantas não sofreram danos devido à adição do metal.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Leite, R. M. V. B. C., Brighenti, A. M.; Castro C.; *Girassol no Brasil*, 1ª edição, **2005**, Embrapa Soja, Londrina, Brasil.
- [2] Buainain, A. M.; Batalha, M. O.; *Cadeia produtiva da agroenergia*, volume 3, 1ª edição, **2007**, Editora Qualidade, Brasília, Brasil.
- [3] Toledo, F. F.; Souza, J. S. I.; *Enciclopédia agrícola brasileira: E-H*, 1ª edição, **2004**, Editora USP, São Paulo, Brasil.
- [4] Filho, J. A.; *Matriz energética brasileira: da crise à grande esperança*, 1ª editora, **2003**, Editora Mauad, Rio de Janeiro, Brasil.

- [5] Lee, M.; Yang, M.; *Rhizofiltration using sunflower (*Helianthus annuus* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. *vulgaris*) to remediate uranium contaminated groundwater*, J. Hazard Mater, **2010**, 173, 589-596.
- [6] Sinigani, A. A. S.; Khalilikhah, F.; *Phytoextraction of lead by *Helianthus annuus*: effect of mobilizing agent application time*, Plant soil environ, **2008**, 10, 434-440.
- [7] Jacobs, J. M.; Mottaz, H. M.; Yu, L.; Anderson, D. J.; Moore, R. J.; Chen, W. U.; Auberry, K. J.; Strittmatter, E. F.; Monroe, M. E.; Thrall, B. D.; Camp II, D. G.; Smith, R. D.; *Multidimensional proteome analysis of human mammary epithelial cells*, J. Proteome Res., **2004**, 3, 68-75.
- [8] Mengel K.; Kirkby, E. A.; *Principles of plant nutrition*, 5ª edição, **2001**, Springer, Dordrecht, Holanda.
- [9] Prinzenberg, A.E.; Barbier, H.; Salt, D.E.; Stich, B.; Reymond, M.; *Relationships between Growth, Growth Response to Nutrient Supply, and Ion Content Using a Recombinant Inbred Line Population in *Arabidopsis**, Plant Physiol.; **2010**, 154, 1361-1371.
- [10] Chesworth, W.; *Encyclopedia of soil science*, 1ª edição, **2008**, Springer, Dordrecht, Holanda.
- [11] Gissel-Nielsen, G.; Jensen, A.; *Plant nutrition: molecular biology and genetics*, 1ª edição, **1999**, Springer, Dordrecht, Holanda.
- [12] Rojas-Tapias, D. F.; Bonilla, R.R. Dussán, J.; *Effect of Inoculation with Plant Growth-Promoting Bacteria on Growth and Copper Uptake by Sunflowers*, Water Air Soil Pollut. **2012**, 223, 643-654.
- [13] Sparks, D. L.; *Advances in agronomy*, 1ª edição, **2003**, Gulf Professional Publishing, San Diego, EUA.
- [14] Hawkesford, M. J.; *Sulfur in plants: an ecological perspective*, 1ª edição, **2007**, Springer, Dordrecht, Holanda.
- [15] Biswal, U. C.; Biswal, B.; Raval, M. K.; *Chloroplast biogenesis: from proplastid to gerontoplast*, 1ª edição, **2003**, Springer, Dordrecht, Holanda.
- [16] Terry, N.; Bañuelos, G. S.; *Phytoremediation of contaminated soils and water*, 1ª edição, **1999**, CRC Press, Boca Raton, EUA.
- [17] Li, H.; McGrath, S. P.; Zhao, F.; *Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite*. New Phytol., **2008**, 178, 92-102.
- [18] Hawkesford, M.J., De Kok, L.J., *Managing sulphur metabolism in plants*, Plant Cell Environ., **2006**, 29, 382-395.
- [19] White, P. J.; Bowen, H. C.; Parmaguru, P.; Fritz, M.; Spracklen, W. P.; Spiby, R. E.; Meacham, M. C.; Mead, A.; Harriman, M.; Trueman, L. J.; Smith, B. M.; Thomas, B.; Broadley, M. R.; *Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana**, J. Exp. Bot., **2004**, 55, 1927-1937.
- [20] Mengel, K.; Kirkby, E. A.; *Principles of Plant Nutrition*, 5ª edição, **2001**, Dordrecht, Holanda.
- [21] Bowen, J. E.; *Absorption of copper zinc and manganese by sugarcane leaf tissue*, Plant Physiol., **1969**, 44, 255-261.
- [22] Andrade, S. A. L.; Gratão, P. L.; Schiavinato, M .A.; Silveira, A. P. D.; Azevedo, R. A.; Mazzafera, P.; *Zn uptake, physiological response and stress*

*attenuation in mycorrhizal jack bean growing in soil with increasing Zn concentrations*, Chemosphere, **2009**, 75, 1363-1370.

[23] Marshall, S. J.; *Vitamins and mineral deficiencies harm one-third of the world's population, says new report*, Bull World Health Organization, **2004**, 83, 230-235.

[24] Norton, G.J.; Deacon, C.M.; Xiong, L.; Huang, S.; Meharg, A.A.; Price, A.H.; *Genetic mapping of the rice ionome in leaves and grain: identification of QTLs for 17 elements including arsenic, cadmium, iron and selenium*, Plant Soil, **2010**, 329, 139-153.

[25] Timmer, C. P.; *Biotechnology and food systems in developing countries*, J. Nutr., **2003**, 133, 3319-3322.

[26] White, P. J.; Broadley, M. R.; *Biofortifying crops essential mineral elements*, Trends Plant Sci., **2005**, 10, 586-593.

[27] Coruzzi, G.; Gutierrez, R. A.; Gutiérrez, R.; *Plants systems biology*, 1ª edição, **2009**, Wiley, Nova Iorque, EUA.

[28] Fleet, J. C.; Replogle, R.; Salt, D.E.; *Systems Genetics of Mineral Metabolism*, J. Nutr., 2011, 26, 520- 525.

[29] Mounicou, S.; Szpunar, J.; Łobinski, R.; *Metallomics: the concept and methodology*, Chem. Soc. Rev., **2009**, 38, 1119-1138.

[30] Baxter, I.; *Ionomics: The functional genomics of elements*, Brief. Func. Gen., **2010**, 9, 149-156.

[31] Montilla I.; Parra, M. A.; Torrent, J.; *Zinc phytotoxicity to oilseed rape grown on zinc-loaded substrates consisting of Fe oxide-coated and calcite sand*, Plant soil, **2003**, 257, 227-236.

[32] Lyons, G. H.; Stangoulis, J. C. R.; Graham, R. D.; *Tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) to high soil and solution selenium levels*, Plant Soil, **2005**, 270, 179-188.

[33] Matos, G. D.; *Utilização do vermicomposto como material adsorvente no tratamento de resíduos de laboratório*. Dissertação de mestrado, **2003**, Universidade Estadual de Campinas.

[34] Garcia, J. S.; Gratão, P. L.; Azevedo, R. A.; Arruda, M. A. Z.; *Metal contamination effects on sunflower (*Helianthus annuus* L.) growth and protein expression in leaves during development*. J. Agric. Food Chem., **2006**, 54, 8623-8630.

[35] Garcia, J. S.; *Avaliação do desenvolvimento de girassol por meio de análises de proteínas e metaloproteínas*, Tese de doutorado, **2006**, Universidade Estadual de Campinas.

[36] Lollar, B. S.; *Environmental geochemistry*. Volume 9: *Treatise on geochemistry*, 1ª edição, **2005**, Elsevier, Milão, Itália.

[37] Padmavathiamma, P. K.; Li, L. Y.; *Phytoremediation technology: hyper-accumulation metals in plants*. Water Air Soil Pollut., **2007**, 184, 105-126.

[38] Terry, N.; Carlson, C.; Raab, T. K.; Zayed, A. M.; *Rates of selenium volatilization among crop species*, J. Environ. Qual., **1992**, 21, 341-344.

[39] Hopper, J. L.; Parker, D. R.; *Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulfate*, Plant Soil, **1999**, 210, 199-207.

- [40] Attwood, T. K.; Cammack, R.; *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*, 2ª edição, **2006**, Oxford University Press, Oxford, UK.
- [41] Marsh Jr., H. V.; Evans, H. J.; Matrone, G.; *Investigations of the role of iron in chlorophyll metabolism. I. Effect of iron deficiency on chlorophyll and heme content and on the activities of certain enzymes in leaves*, *Plant Physiol.*, **1963**, 38, 632-638.
- [42] Barker, A. V.; Pilbeam, D. J.; *Handbook of plant nutrition*, 1ª edição, **2006**, CRC Press, Boca Raton, EUA.
- [43] Bose, B.; Hemantaranjan, A.; *Developments in physiology, biochemistry and molecular biology of plants*, 1ª edição, **2005**, New India Publishing, Nova Deli, India.
- [44]Gomes-Junior, R. A.; Gratão, P. L.; Gaziola, S. A.; Mazzafera, P. Lea, P. J. Azevedo, R. A.; *Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures*, *Func. Plant Biol.*, **2007**, 34, 449-456.
- [45] Gopal, R.; Nautiyal, N.; Phytotoxic effects of cadmium exposure and metal accumulation in sunflower, *J. Plant Nutr.*, **2011**, 34, 1616-1624.
- [46] Nehnevajova, E.; Lyubenova, L.; Herzig, R.; Schröder, P.; Schwitzguébel, J.P.; Schmülling, T.; Metal accumulation and response of antioxidant enzymes in seedlings and adultsunflower mutants with improved metal removal traits on a metal-contaminated soil, *Envirom. Exper. Botany*, **2012**, 76, 39-48.
- [47] Júnior, L.R.; Höehr, N.F.; Vellasco, A.P.; Kubota, L.T.; Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo, *Quim. Nova*, **2001**, 24, 112-119.
- [48] Walliwalagedara, C.; Atkinson, I.; Kuelen, H.;Cutright, T.; Wei, R.; Differential expression of proteins induced by lead in the Dwarf Sunflower *Helianthus annuus*, *Phytochem.*, **2010**, 71, 1460-1465.
- [49] Shaw, A. J.; *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*, 1ª edição, **1990**, CRC Press, Boca Raton, EUA.
- [50] Kaya, C.; Burton, M. A. S.; Higgs, D. E. B.; *Responses of tomatos CVs growth to fruit-harvest stage under zinc stress in glasshouse conditions*. *J. Plant Nutr.*, **2001**, 24, 369-382.



## Capítulo 3

---

**Extração e separação das proteínas das folhas de girassol empregando eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida e identificação de selênio nos *spots* proteicos empregando a hifenação LA-ICP-MS.**



## **1. OBJETIVO**

Os dados apresentados no segundo capítulo desta Tese forneceram evidências da possível incorporação de selênio nos aminoácidos sintetizados pelos girassóis tratados com este elemento, em especial nas folhas das plantas. Assim, neste capítulo, buscou-se evidências experimentais de que tais aminoácidos contendo selênio estariam sendo incorporados à estrutura primária das proteínas sintetizadas. Para tanto, empregou-se a técnica de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida para separação das proteínas de folhas de girassol e posterior análise de selênio empregando a técnica de ablação a laser acoplada ao ICP-MS.

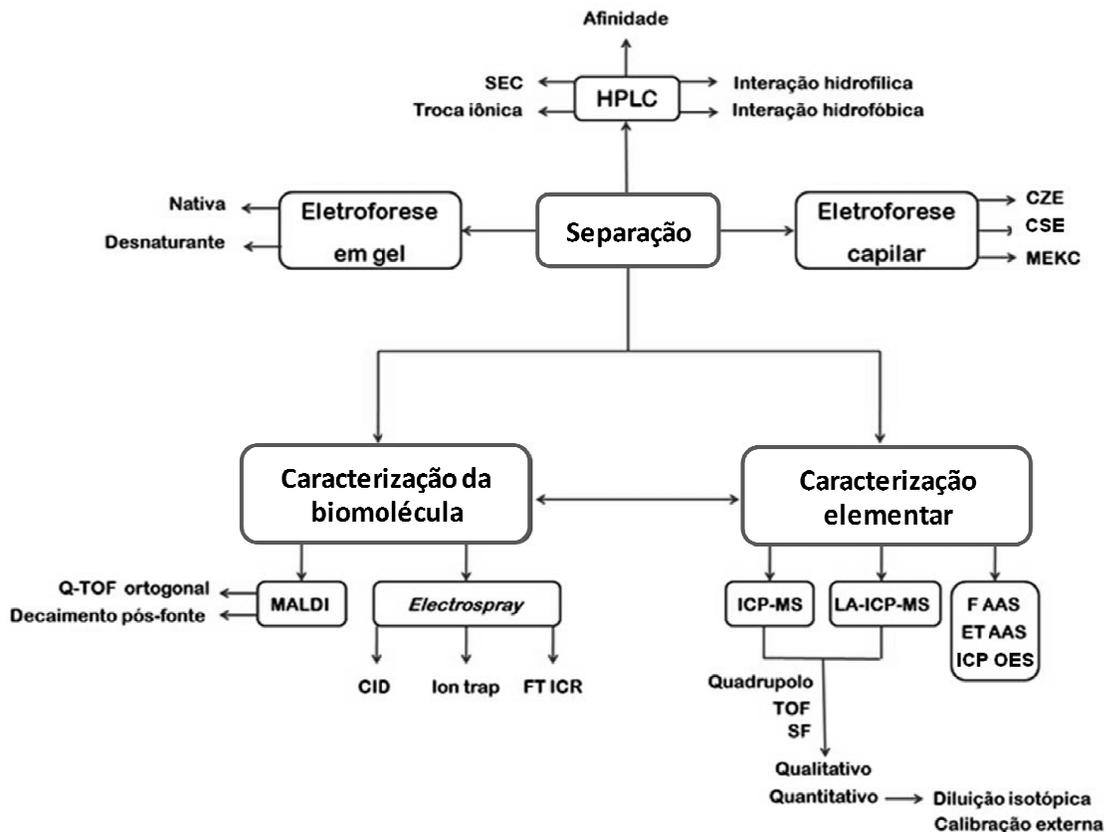
## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Abordagens analíticas empregadas em estudos metalômicos**

Diferentes estratégias analíticas podem ser adotadas quando se estuda metais ou não-metais ligados a proteínas [1]. De modo geral, em todo estudo, emprega-se uma técnica de separação, em uma ou mais dimensões, para possibilitar o fracionamento da amostra, uma técnica para detecção e/ou quantificação dos heteroátomos ligados à molécula alvo ou fração proteica selecionada e uma técnica para determinação da identidade das proteínas, como pode ser observado no diagrama apresentado na Figura 3.1 [2-4].

Cada uma destas etapas exige a manipulação adequada da amostra, visto que, em diversas situações, têm-se matrizes altamente complexas [5-7]. Assim, para realização de tais estudos deve-se, inicialmente, atentar para os procedimentos adotados no preparo das amostras, com o objetivo de maximizar a extração das proteínas, sempre buscando preservar a ligação com os metais. Magalhães e Arruda [8] avaliaram esta questão após estudar diferentes procedimentos de extração de proteínas de castanha da índia e concluíram que,

embora a aplicação de energia ultrassônica consistisse na estratégia mais eficiente para extração de proteínas, ela não poderia ser empregada para um estudo metalômico, pois não preservava a integridade da ligação metal-proteína.



**Figura 3.1.** Técnicas analíticas empregadas em estudos metalômicos. HPLC: *High-Performance Liquid Chromatography*; SEC: *Size exclusion Chromatography*; CZE: *Capillary Zone Electrophoresis*; CSE: *Capillary Sieving Electrophoresis*; MEKC: *Micellar Electrokinetic Chromatography*; CID: *Collision-Induced Dissociation*, FT ICR: *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*; ICP-MS: *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, LA-ICP-MS: *Laser Ablation Coupled to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, F AAS: *Flame Atomic Absorption Spectrometry*; ET AAS: *Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*; ICP OES: *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy*; TOF: *Time-of-flight Analyzer*, SF: *Sector Field Analyzer*.

Referente às diferentes técnicas analíticas empregadas para separação das proteínas pode-se citar como as mais empregadas a cromatografia líquida [9, 10],

eletroforese em gel e eletroforese capilar [11, 12], sendo que a Tabela 3.1 reúne as principais características de cada uma [13]. Observa-se que a principal vantagem da eletroforese em gel consiste na sua alta resolução, sendo possível, inclusive, a separação de isoformas. Além disso, cada técnica apresenta características particulares, o que as torna complementares entre si, sendo mais adequadas para uma dada classe de proteína ou matriz.

No que diz respeito às técnicas analíticas utilizadas para detecção de metais, o emprego de ICP-MS se apresenta como a ferramenta mais difundida para este propósito, mesmo sem fornecer informações estruturais a respeito das biomoléculas [14, 16]. Dentre as principais vantagens da aplicação da espectrometria de massas inorgânica destacam-se os baixos limites de detecção para a maioria dos elementos [17], o que é uma característica indispensável quando se trabalha com amostras onde as concentrações dos mesmos são geralmente baixas; redução dos problemas relacionados com efeitos de matriz; grande faixa linear dinâmica; possibilidade de se obter resultados referentes à composição isotópica da amostra, permitindo realizar a quantificação por diluição isotópica e possibilidade de hifenação com diferentes técnicas de separação de maneira simples [15]. A possibilidade de aplicação de micro ou nanonebulizadores também é uma vantagem que deve ser ressaltada, principalmente quando se trabalha com amostras biológicas em que os volumes são bastante diminutos. Apenas para exemplificar, no trabalho desenvolvido por Giusti *et al.* [18] avaliou-se o desempenho de uma nova geometria de nanonebulizador configurado para operar com vazões menores que  $0,5 \mu\text{L min}^{-1}$ , possibilitando, inclusive, a hifenação com um cromatógrafo a líquido operando com fase móvel composta por 95% de solvente orgânico, sem necessidade de refrigeração ou injeção de oxigênio no plasma.

**Tabela 3.1.** Principais características apresentadas pelas técnicas de separação empregadas em estudos metalômicos.

Parâmetro	Técnica de separação		
	Cromatografia líquida	Eletroforese capilar	Eletroforese em gel
<b>Princípio da separação</b>	Depende da modalidade	Mobilidade eletroforética	Carga e tamanho
<b>Qualidade da separação</b>	Boa	Entre LC e gel	Muito boa
<b>Volume de amostra</b>	μL	nL	μL
<b>Tempo de análise</b>	30 min - 2 horas	< 1 hora	1 - 2 dias
<b>Deteção de metais e proteínas</b>	<i>On-line / off-line</i>	<i>On-line / off-line</i>	<i>Off-line</i>
<b>Repetibilidade</b>	Boa	Media	Mediana (excelente para eletroforese em gel diferencial – DIGE)
<b>Tipo de amostra</b>	Proteínas e peptídeos	Proteínas e peptídeos	Proteínas
<b>Principal vantagem</b>	Versatilidade	Recuperação elevada	Alta resolução
<b>Principal desvantagem</b>	Eficiência de separação (comparado a CE ou GE)	Repetibilidade	Restrita a proteínas hidrofílicas

Outras técnicas espectroscópicas para detecção de metais também podem ser consideradas, como, por exemplo, a fluorescência de raios-X [8, 19, 20], que pode ser empregada em determinações elementares *in situ* em uma planta hiperacumuladora. O emprego de absorção atômica com atomização eletrotérmica [21], em chama [22] e até a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) [23] também pode ser considerado, principalmente para amostras contendo altos teores salinos (por exemplo, para

determinação de metais após separação empregando cromatografia por exclusão de tamanho).

## **2.2. A estratégia analítica e instrumentação empregadas neste estudo metalômico e em outros trabalhos desta área**

Diferentes estratégias podem ser adotadas para se obter a resposta para uma dada pergunta em um estudo metalômico. A alternativa adotada dependerá da instrumentação disponível, da amostra estudada, bem como do foco que é dado à pesquisa.

No caso específico desta Tese, optou-se por empregar a separação de proteínas via eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, que possibilita a posterior determinação de metais ligados às proteínas, bem como permite explorar a técnica de eletroforese em gel sob um ponto de vista mais clássico, numa abordagem exclusivamente proteômica, onde informações referentes à expressão ou inibição de uma dada proteína também podem ser obtidas [24].

Estudos semelhantes podem ser conduzidos empregando outro tipo de instrumentação analítica, como, por exemplo, por meio de um equipamento de espectrometria de massas molecular com fonte de ionização por *electrospray* [25]. Neste caso, a identificação de peptídeos ligados a metais ou não-metals, e posterior correlação com uma determinada proteína, pode ser conduzida mediante a realização de experimentos sob diferentes condições, como no trabalho desenvolvido por Ballihaut *et al.*, [26] onde os autores identificaram selênio incorporado à estrutura de peptídeos pertencentes a leveduras tratadas com este elemento após prévio fracionamento da amostra.

Ainda, para a abordagem onde um equipamento de espectrometria massas orgânica é utilizado, pode-se realizar a quantificação relativa de metaloproteínas, obtendo-se resultados referentes à expressão em organismos tratados sob diferentes condições, eliminando-se o emprego da eletroforese em gel. Para tanto, deve-se fazer uso de reagentes específicos como iTRAQ ou iCAT [27].

No entanto, é importante enfatizar que embora um equipamento com fonte de ionização por *electrospray* forneça informações estruturais, pelo fato de ser uma técnica de ionização muito suave, o mesmo apresenta sensibilidade inferior ao ICP-MS [25]. Além do mais, no caso da análise de selenoproteínas, pode haver a supressão da ionização uma vez que a massa de selenopeptídeos injetada é muito pequena. Assim, mesmo com a perda de informação estrutural, a utilização de uma fonte de ionização por plasma é indispensável em muitos estudos nessa área.

Recentes avanços em termos de instrumentação são observados para equipamentos de ICP-MS e proporcionam reduções ainda mais significativas nos limites de detecção para muitos elementos. Dependendo da configuração do equipamento, diferentes estratégias podem ser adotadas em uma determinação. Equipamentos que permitem operar com celas de colisão para remoção de interferentes promovem a eliminação dos íons poliatômicos, geralmente usando hélio [28]. Vale ressaltar que esta alternativa resulta em um aumento dos limites de detecção devido aos altos fluxos do gás colisional empregado, sendo assim restrita a elementos presentes em elevadas concentrações nas amostras.

Equipamentos que contêm um quadrupolo para remoção de interferentes podem promover a reação dos íons indesejados com um gás, eliminando a interferência. A literatura reporta a aplicação de monóxido de carbono [29] ou metano [30] como alternativa viável para redução dos limites de detecção na determinação de selênio quando se trabalha com o ICP-MS acoplado a um equipamento de ablação a laser.

Neste trabalho, optou-se por reagir o íon de interesse, neste caso  $^{80}\text{Se}^+$ , com um gás reacional ( $\text{O}_2$ ) e monitorar o íon produto ( $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ ) na  $m/z$  96. A literatura também reporta esta alternativa como uma estratégia eficiente para redução dos limites de detecção, quando o oxigênio é utilizado como gás reacional. Observa-se que tais alternativas contribuem, de maneira bastante eficiente [30], para remoção de interferentes, sem necessidade da utilização de equipamentos de alta resolução.

### 2.3. Limitações das estratégias analíticas empregadas

As estratégias analíticas empregadas para separação das proteínas e detecção de metais ou não-metals nos *spots* proteicos não estão livres de limitações e interferências. Iniciando pela técnica de separação empregada neste trabalho, observa-se que embora a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida forneça excelentes resultados em termos de resolução e informações referentes à expressão de proteínas, a mesma apresenta sérias limitações relacionadas à separação de biomoléculas hidrofóbicas [31]. Tal restrição surge devido à impossibilidade de solubilizá-las em tampões compatíveis com a técnica que, de maneira geral, empregam altas concentrações de ureia e tiourea com o objetivo de favorecer a solubilização do maior número de proteínas. Além do mais, a matriz de acrilamida empregada para preparo dos géis permite a separação de proteínas situadas no intervalo de massa molar entre *ca.* 10 e 100 kDa. Assim, existem sérias limitações para conduzir estudos empregando a abordagem analítica proposta neste trabalho para separação de algumas classes de macromoléculas, como proteínas de membrana, polipeptídeos ou complexos proteicos, por exemplo [32].

Podem ser encontradas na literatura estratégias analíticas distintas para possibilitar a separação de proteínas pertencentes à classes específicas [33, 34]. De maneira geral, empregam-se as técnicas de cromatografia líquida ou eletroforese capilar em suas diferentes modalidades. O uso de cromatografia por exclusão possibilita isolar uma determinada fração proteica sob baixa pressão, minimizando a desnaturação e, conseqüentemente, preservando a interação entre metais e proteínas [35]. O uso de cromatografia por troca iônica também pode ser considerado e, neste caso, não há necessidade da aplicação de solventes orgânicos, o que também minimiza a desnaturação proteica [36].

Ainda com relação à técnica de eletroforese em gel, deve-se considerar a possibilidade de perda de metais ligados às mesmas quando se realiza uma

separação. Estudos realizados recentemente empregando isótopos enriquecidos mostram que pode haver a substituição de um elemento por outro que apresente maior afinidade pelo sítio ativo da proteína [37]. Basicamente, a força de ligação entre o sítio e o elemento é o que determinará se o mesmo permanecerá ou não ligado a biomolécula [38]. Já no caso da separação de selenoproteínas por eletroforese em gel este problema não existe, uma vez que o selênio apresenta-se incorporado à estrutura primária das proteínas e não pode ser perdido [39, 40].

Existem também problemas relacionados com a hifenação envolvendo o equipamento de ablação a laser e o ICP-MS. Embora seja possível obter menores limites de detecção quando o laser é operado por meio da formação de linhas (*raster mode*), neste modo é mais fácil para se obter falsos positivos devido a flutuações do sinal analítico em curtos períodos de tempo [41]. As origens de tal instabilidade ainda são desconhecidas e, por isso, consistem em temas de pesquisas científicas.

### **3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

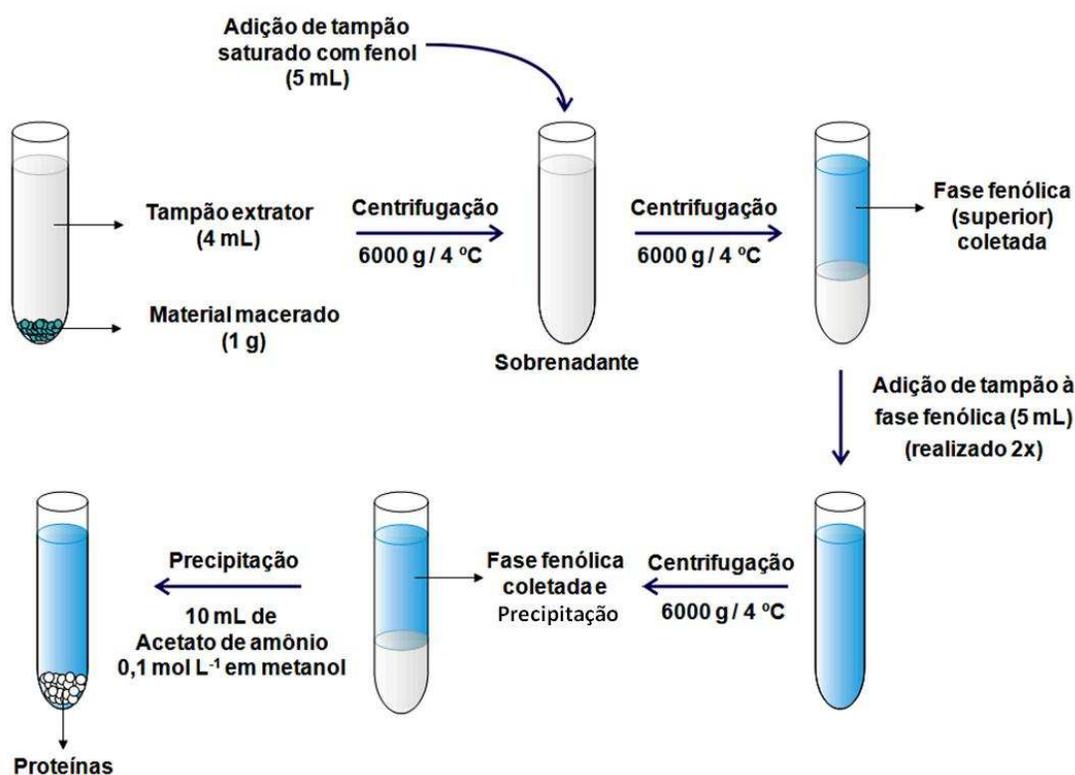
#### **3.1. Preparo de soluções e limpeza de materiais**

Todas as soluções foram preparadas utilizando reagentes de grau analítico (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) e soluções padrão para calibração (Merck, Darmstadt, Alemanha), bem como água deionizada ( $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ), obtida a partir de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, USA).

Após o uso, todos os materiais foram lavados com água e detergente (Triton<sup>®</sup> X-100) e colocados em banho ácido (ácido nítrico 10% v/v), sendo mantidos nesta solução por, no mínimo, 8 horas. Posteriormente, foram lavados utilizando água deionizada e secos em estufa, à exceção dos materiais volumétricos que eram secos à temperatura ambiente.

### 3.2. Metodologia empregada para extração das proteínas de folhas de girassol

O protocolo adotado para extração das proteínas de folhas de girassol consistiu na extração empregando fenol [42], apresentado no primeiro capítulo desta Tese e descrito no diagrama esquemático da Figura 3.2. O protocolo possibilitou a extração das proteínas com adequada remoção dos interferentes, permitindo adequada separação por meio da técnica de eletroforese em gel.



**Figura 3.2.** Diagrama esquemático apresentando o procedimento experimental para a extração das proteínas de folhas de girassol com posterior separação empregando a técnica de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida.

Resumidamente, o tampão de extração utilizado neste caso consistia em uma mistura composta por 700 mmol L<sup>-1</sup> de sacarose, 50 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA, 100

mmol L<sup>-1</sup> de KCl, 10 mmol L<sup>-1</sup> de tioureia, 50 mmol L<sup>-1</sup> de DTT, 2 mmol L<sup>-1</sup> PMSF dissolvidos em tampão Tris-HCl 500 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,5.

Após aplicação do procedimento descrito na Figura 3.2, lavou-se o precipitado obtido com 5 mL de acetato de amônio 100 mmol L<sup>-1</sup> em metanol gelado e 1 mL de acetona gelada. Ao final, o teor de proteínas totais foi determinado empregando o método espectrofotométrico de Bradford [43], utilizando albumina do soro bovino (fração V) como proteína padrão para construção da curva de calibração.

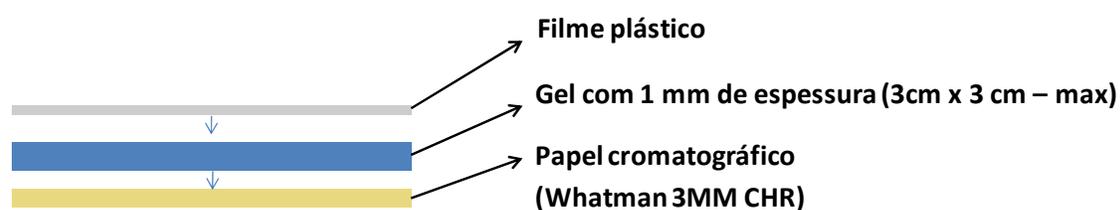
### **3.3. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida**

As proteínas extraídas por meio do protocolo apresentado no item 2.2 foram separadas empregando a técnica de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. Para tanto, empregou-se o protocolo descrito no primeiro capítulo desta Tese. Resumidamente, as proteínas foram resolubilizadas com 250 µL de tampão contendo 7,0 mol L<sup>-1</sup> de ureia; 2,0 mol L<sup>-1</sup> de tioureia; 2,0% (m/v) de CHAPS; 0,5% (m/v) de anfólitos (faixa de pH entre 3 e 10) e 1,0% (m/v) de DTT e aplicadas em fitas pré-fabricadas contendo anfólitos imobilizados (com gradiente linear de pH situado entre 3 e 10) para realização do procedimento de focalização isoeletrica das proteínas. As fitas foram mantidas por 12 h em óleo mineral e inseridas em um focalizador isoeletrico – Multiphor II system (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), sendo empregando o seguinte procedimento de focalização: 0-500 V (0,5 kVh); 500-1000 (0,8 kVh); 1000-10000 (11,3 kVh); 10000 (5,0 kVh). Após a focalização isoeletrica, as proteínas foram reduzidas durante 15 min utilizando tampão para equilíbrio contendo 1,0% (m/v) DTT e em seguida alquiladas por mais 15 min empregando tampão para equilíbrio contendo 2,5% (m/v) iodoacetamida. A composição do tampão de equilíbrio consistia em solução contendo 6,0 mol L<sup>-1</sup> ureia; 30% (v/v) glicerol; 2,0% (m/v) SDS; 0,002% (m/v) azul de bromofenol e 50 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8,8. Em seguida, realizou-se a separação das proteínas em função da massa molar das mesmas empregando

géis de poliacrilamida com concentração de 12,5% (m/v) e dimensões de 13 cm (SE 600 Ruby™ system, Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia). A voltagem máxima empregada consistia em 600 V e a corrente elétrica fixada em 25 mA. Os géis foram preparados em triplicata e corados empregando Coomassie Brilliant Blue G-250 coloidal [44]. As imagens foram digitalizadas empregando um digitalizador de imagens (ImageScanner II, Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) com o densitômetro operando a 300 dpi. O programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GeneBio, Geneva, Suíça) foi empregado para análise de imagens.

### 3.4. Secagem dos géis de eletroforese

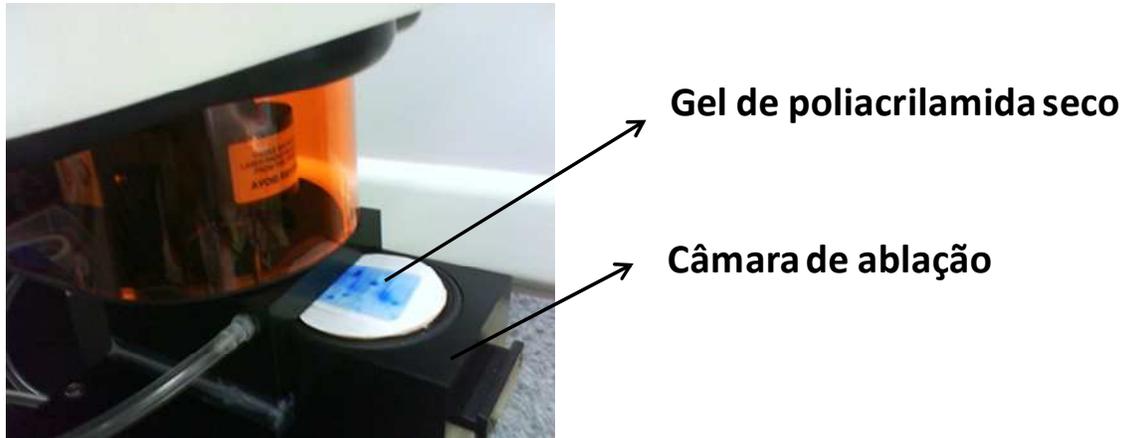
Para detecção de selênio nos *spots* dos géis de eletroforese empregando a técnica de ablação a laser, faz-se necessário secar a matriz de poliacrilamida. Para tanto, pequenas áreas dos géis, com dimensões máximas de 3 x 3 cm, foram cortadas e colocadas sobre um papel de filtro (Whatman 3MM CHR), como apresentado na Figura 3.3. O gel foi então coberto por um filme plástico (papel celofane poroso) e seco em um secador de géis (modelo GD 2000 – Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) sob vácuo durante 75 min a 40 °C.



**Figura 3.3.** Diagrama apresentando a montagem otimizada para promover a secagem dos géis de poliacrilamida.

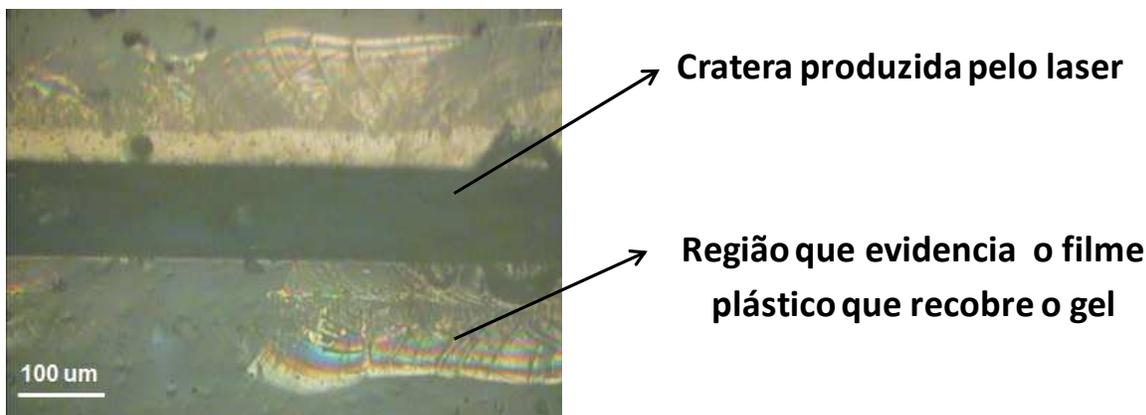
Após concluir o processo de secagem, os sistemas gel/suporte não apresentavam mais que 2 mm de espessura, possibilitando fixá-los na câmara de ablação do laser com fita adesiva, como pode ser observado na Figura 3.4. Para

análise, optou-se por não remover o filme plástico que recobre o gel, pois este procedimento poderia danificá-lo. Assim, optou-se por utilizar o laser, em um primeiro momento, para realizar a remoção da película plástica que recobre o gel e, posteriormente, empregando-o para ablar a matriz de poliacrilamida e determinar selênio nos *spots*.



**Figura 3.4.** Imagem da câmara de ablação contendo um gel de poliacrilamida seco fixado para posterior análise.

A imagem apresentada na Figura 3.5 mostra uma imagem obtida com a câmera do equipamento de ablação a laser. A linha que aparece no centro da imagem mostra uma cratera produzida pelo laser. Neste caso, realizou-se duas varreduras em linha com velocidade de  $100 \mu\text{m s}^{-1}$ , sendo que a primeira varredura teve como objetivo apenas remover a película plástica que reveste o gel. Vale ressaltar que, neste processo, o laser ablava apenas o filme plástico, ou seja, não havia perda de selênio ou sinal deste elemento durante a remoção do filme plástico.



**Figura 3.5.** Imagem do gel de poliacrilamida seco obtida com a câmera do sistema de ablação a laser. A cratera exibida no centro da imagem evidencia o local de incidência do laser que, neste caso, foi configurado para operar com velocidade de  $100 \mu\text{m s}^{-1}$  e diâmetro do feixe de  $100 \mu\text{m}$ . Na imagem, o laser incidiu sob a mesma região por duas vezes, sendo que na primeira teve como objetivo remover o filme plástico que recobre o gel e na segunda realizar a ablação da matriz seca de poliacrilamida.

### **3.5. Otimização dos parâmetros instrumentais dos equipamentos de ablação a laser e ICP-MS**

Para otimização das condições de operação dos equipamentos de ablação a laser (New Wave UP-213, Fremont, EUA) com fonte de laser de Nd:YAG (213 nm) e ICP-MS (ELAN DRC-e, PerkinElmer, Shelton, EUA), preparou-se soluções de acrilamida contendo  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de íons selenito. Tal solução foi polimerizada produzindo géis de poliacrilamida que, posteriormente, foram submetidos ao mesmo procedimento de secagem adotado para as amostras contendo proteínas de folhas de girassol. As análises dos géis de eletroforese empregando LA-ICP-MS foram, então, realizadas em sala limpa classe 10000.

Dentre os parâmetros instrumentais otimizados para o equipamento de ablação a laser encontram-se a largura da fenda que determina o diâmetro do feixe do laser; a frequência de pulsos e a intensidade do laser. Já para o

equipamento de ICP-MS avaliou-se a potência empregada para formação do plasma e vazão dos gases auxiliar e transportador (argônio foi empregado em ambos os casos). Para estes estudos, realizou-se uma varredura com o laser nos géis de poliacrilamida contendo padrão de íons selenito, empregando as condições do método descritas na Tabela 3.2. As áreas sob os sinais analíticos obtidos foram utilizadas para determinação das condições ótimas de operação.

A relação  $m/z$  que possibilitava obtenção dos maiores valores de relação sinal-ruído também foi avaliada. Neste caso, para otimização do sistema empregou-se uma solução padrão de selênio  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  introduzida no ICP-MS por meio de um nebulizador Meinhard® e câmara de nebulização ciclônica sem refrigeração. Oxigênio foi empregado na cela de reação do equipamento para remoção dos interferentes.

**Tabela 3.2.** Parâmetros empregados no método utilizado para otimização das condições instrumentais dos equipamentos de ICP-MS e ablação a laser.

<b>Parâmetros</b>	<b>Condição</b>
<i>ICP-MS</i>	
Tempo de integração por ponto (ms)	500
Número de pontos	150
Tempo de leitura (s)	141
<i>Laser</i>	
Velocidade de varredura ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	100
Distância percorrida (mm)	4.2

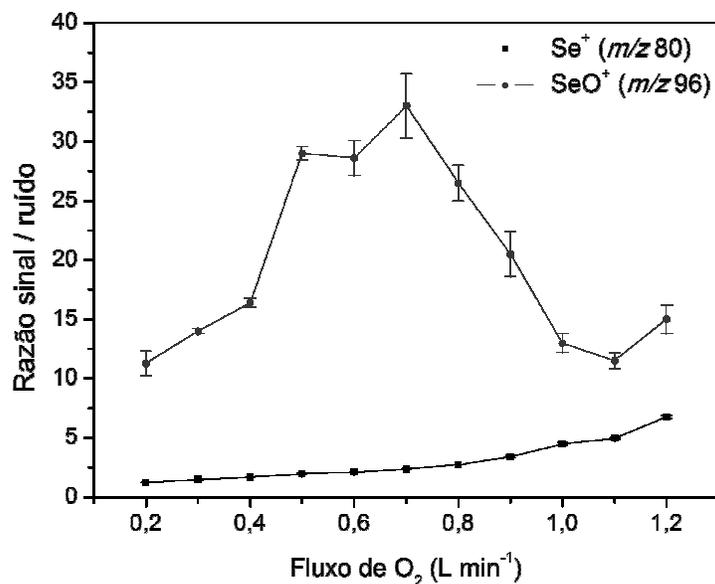
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Otimização das condições de operação do ICP-MS

#### 4.1.1. Eliminação de interferentes

A determinação de selênio empregando a técnica de ICP-MS exige cuidados no que tange a eliminação de interferentes, em especial o dímero de argônio ( $^{40}\text{Ar}_2^+$ ) na  $m/z$  80. Diferentes estratégias podem ser consideradas para eliminação de espécies poliatômicas [29, 45], sendo que duas foram avaliadas para possibilitar a determinação adequada. Na primeira, realizou-se a determinação de selênio na  $m/z$  80 buscando a eliminação do dímero de argônio, ou outras espécies interferentes como  $^{64}\text{Zn}^{16}\text{O}^+$ , após reação das espécies interferentes com oxigênio, enquanto, a segunda opção, consistiu em promover a reação do selênio com oxigênio na cela de reação e monitorar o íon produto ( $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ ) na  $m/z$  96.

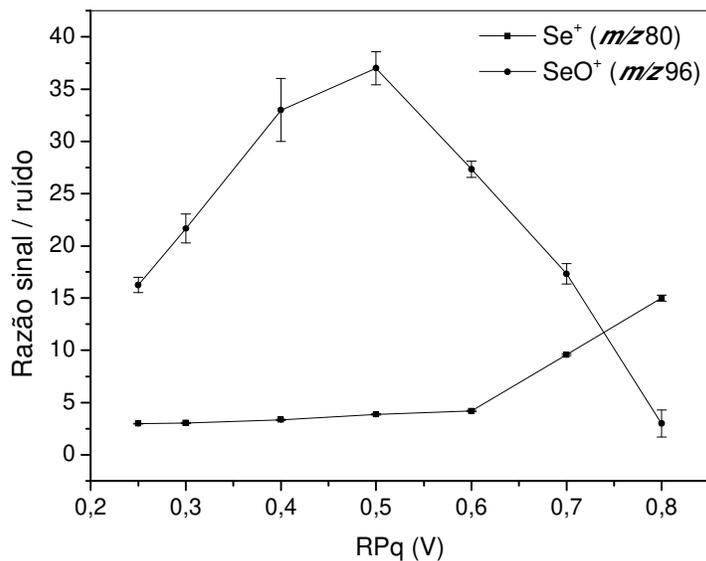
O gráfico da Figura 3.6 apresenta a relação sinal-ruído obtida para diferentes vazões de oxigênio para os dois estudos propostos, mantendo-se fixos os parâmetros de rejeição (RPa e RPq) do quadrupolo da cela de reação em 0 e 0,4 V, respectivamente. Neste caso, tais variáveis representam os parâmetros  $q$  e  $a$  da equação de Mathieu, que rege a estabilidade de íons em campos quadrupolares [46]. Observa-se que a relação sinal-ruído apresenta maior valor a  $0,7 \text{ L min}^{-1}$  quando se monitora o óxido de selênio na  $m/z$  96. Neste caso, maiores vazões do gás resultam em redução da relação sinal-ruído, visto que aumentam o número de colisões envolvendo oxigênio e o óxido formado, o qual apresenta maior seção de choque. Já o monitoramento do íon  $^{80}\text{Se}^+$  na  $m/z$  80 gera resultados menos satisfatórios, visto que, nesta situação, a aplicação de  $1,2 \text{ L min}^{-1}$  de oxigênio não foi suficiente para promover a completa eliminação da espécie  $\text{Ar}_2^+$  e evitar a redução de sinal para os íons  $^{80}\text{Se}^+$ .



**Figura 3.6.** Otimização da vazão de oxigênio empregada para eliminação de interferentes na determinação de selênio após injeção de solução contendo  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  deste elemento. Neste estudo, os parâmetros RPa e RPq do quadrupolo da cela de reação foram mantidos fixos em 0 e 0,4 V, respectivamente.

Baseando-se nos resultados obtidos no estudo da vazão de oxigênio empregada, buscou-se a otimização do parâmetro RPq, visando maximizar a transmissão de íons até o quadrupolo analítico e, conseqüentemente, até o detector. O gráfico apresentando na Figura 3.7 exibe os resultados obtidos para as duas alternativas avaliadas. No caso da determinação dos íons  $\text{SeO}^+$ , a vazão de  $\text{O}_2$  foi fixada em  $0,7 \text{ L min}^{-1}$ , enquanto para a determinação dos íons  $\text{Se}^+$ , a vazão de  $\text{O}_2$  foi mantida em  $1,2 \text{ L min}^{-1}$ .

Os resultados obtidos revelam que a relação sinal-ruído apresenta maior valor para a determinação da espécie  $\text{SeO}^+$  quando o parâmetro de rejeição q é fixado em 0,5 V. Considerando o monitoramento da espécie  $\text{Se}^+$ , observa-se que com a aplicação de altos valores de potencial (0,7 ou 0,8 V), ou seja, uma faixa de transmissão de íons bastante estreita, consegue-se aumentar a relação sinal-ruído devido à redução na transmissão de interferentes. No entanto, o desempenho analítico apresenta-se inferior aquele obtido quando se monitora o óxido de selênio.

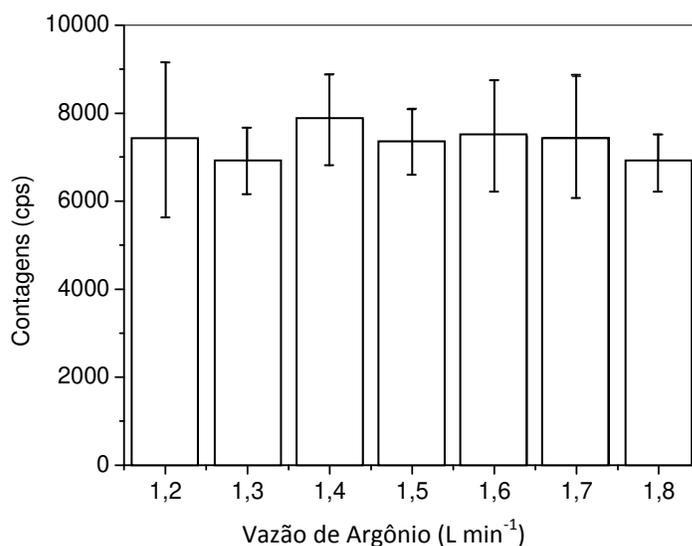


**Figura 3.7.** Otimização do potencial RPq (parâmetro de rejeição  $q$  da equação de Mathieu) empregado no quadrupolo da cela de reação para determinação de selênio após injeção de solução contendo  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  deste elemento. Neste estudo, a vazão de oxigênio foi mantida fixa em  $0,7$  e  $1,2 \text{ L min}^{-1}$  para o monitoramento dos íons  $\text{SeO}^+$  e  $\text{Se}^+$ , respectivamente.

Assim, optou-se por monitorar o íon  $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$  na  $m/z$  96 nos estudos posteriores, pois possibilitou a obtenção dos menores limites de detecção, o que é fundamental quando se trabalha com amostras contendo baixas concentrações de selênio, como é o caso das proteínas que foram submetidas a um procedimento prévio de fracionamento.

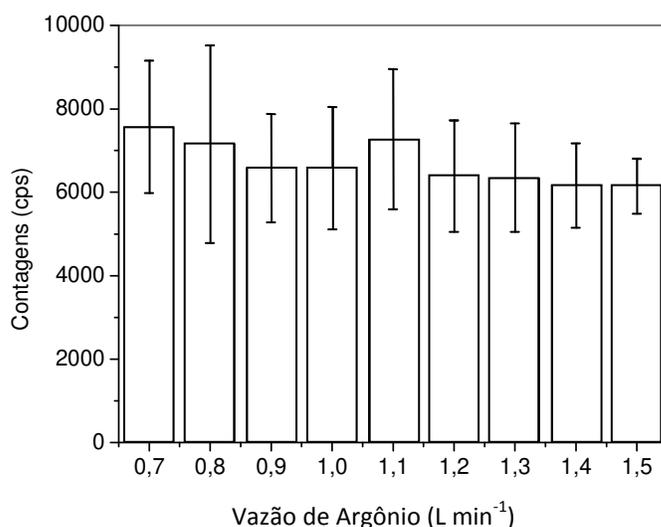
#### 4.1.2. Avaliação das vazões dos gases auxiliar e transportador

Com o objetivo de otimizar o transporte do material ablado, bem como obter condições operacionais de estabilidade do plasma, as vazões de argônio empregadas como gases auxiliar e transportador foram avaliadas utilizando os géis de poliacrilamida polimerizados na presença de padrão de íons selenito, como pode ser observado nos gráficos apresentados nas Figuras 3.8 e 3.9.



**Figura 3.8.** Avaliação da vazão de gás auxiliar (argônio) no intervalo compreendido entre 1,2 e 1,8 L min<sup>-1</sup>, obtida após avaliação de géis de poliacrilamida polimerizados a partir de soluções de acrilamida contendo 10 mg L<sup>-1</sup> de íons selenito. Neste caso, os demais parâmetros empregados no estudo consistiam na potência da bobina de radiofrequência igual a 1270 W, vazão do gás de transportador de 1,1 L min<sup>-1</sup>; frequência do laser de 20 Hz; intensidade de 100% (ca. 28 J cm<sup>-2</sup>) e diâmetro do feixe do laser de 100 µm.

Observa-se que, para ambos, não se encontrou diferença estatística significativa (aplicando teste estatístico ANOVA com nível de confiança de 95%) para os intervalos de vazões estudados. A literatura reporta [47] melhoras na eficiência de detecção, definida como o a razão entre o número de íons que atinge o detector e o número de átomos liberados durante o processo de ablação, quando se emprega hélio como gás transportador. A explicação concentra-se na maior eficiência do hélio para promover a ionização das espécies no plasma devido à elevada energia fornecida pelo gás, bem como pelo fato de minimizar a deposição da massa ablada sobre a superfície da amostra.

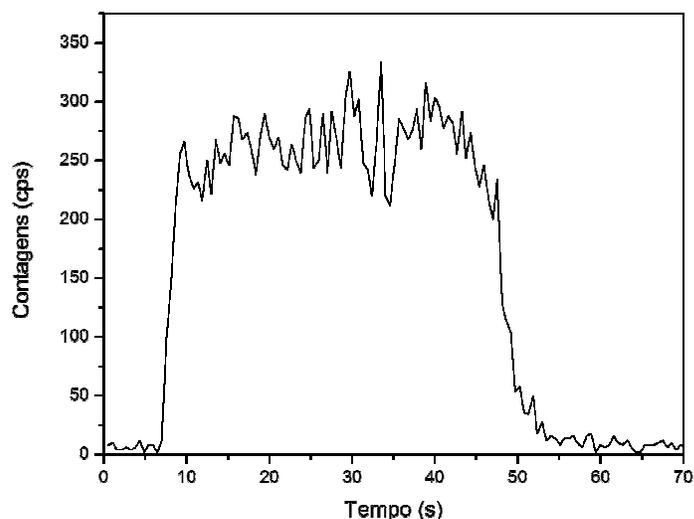


**Figura 3.9.** Avaliação da vazão de gás transportador (argônio) no intervalo compreendido entre 0,7 e 1,5 L min<sup>-1</sup>, obtida após avaliação de géis de poliacrilamida polimerizados a partir de soluções de acrilamida contendo 10 mg L<sup>-1</sup> de íons selenito. Neste caso, os demais parâmetros empregados no estudo consistiam na potência da bobina de radiofrequência igual a 1270 W, vazão do gás de auxiliar de 1,8 L min<sup>-1</sup>; frequência do laser de 20 Hz; intensidade de 100% (ca. 28 J cm<sup>-2</sup>) e diâmetro do feixe do laser de 100 μm.

No caso estudado, a simples alteração da vazão do argônio utilizado como gás transportador não foi suficiente para minimizar efeitos de deposição. Além disso, o aumento da vazão do gás auxiliar do plasma não provocou redução do sinal obtido devido ao maior fracionamento dos íons na região da tocha do ICP-MS. Assim, devido às características do ICP empregado no estudo, optou-se por fixar a vazão dos gases auxiliar e transportador em 1,8 e 1,1 L min<sup>-1</sup>, respectivamente, buscando garantir uma maior estabilidade do plasma formando, uma vez que vazões reduzidas podem conduzir a extinção do mesmo ou até causar danos à tocha.

### 4.1.3. Avaliação da potência aplicada à bobina de radiofrequência

A potência empregada na bobina de radiofrequência do equipamento de ICP-MS revelou ser um dos parâmetros de maior importância para aumento do sinal analítico. A Figura 3.10 apresenta um sinal típico, obtido após aplicação do método apresentado na Tabela 3.2. Para cada condição, calculou-se a área dos sinais e construiu-se o gráfico da Figura 3.11.

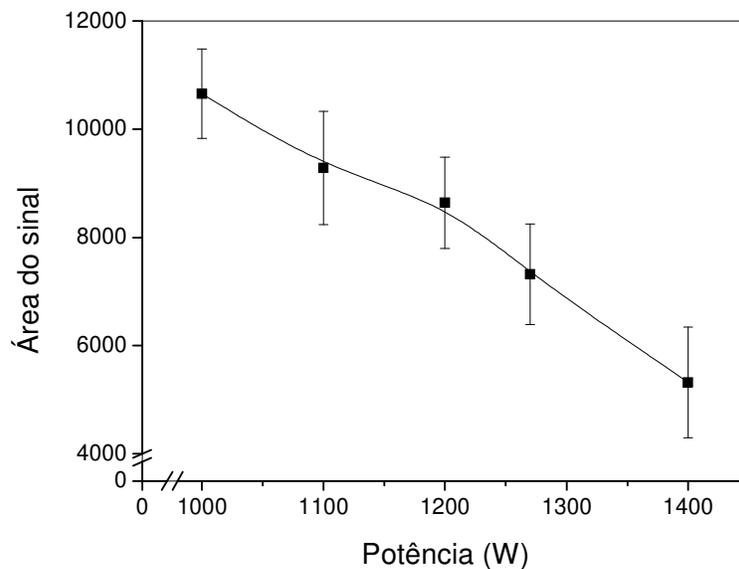


**Figura 3.10.** Sinal analítico obtido para ablação de um gel de poliacrilamida polimerizado a partir de uma solução de acrilamida contendo  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de selenito empregando as seguintes condições de operação: bobina de radiofrequência igual a  $1000 \text{ W}$ ; vazão do gás auxiliar de  $1,8 \text{ L min}^{-1}$ ; vazão de gás transportador de  $1,1 \text{ L min}^{-1}$ ; frequência do laser de  $20 \text{ Hz}$ ; intensidade de  $100\%$  (ca.  $28 \text{ J cm}^{-2}$ ) e diâmetro do feixe do laser de  $100 \text{ }\mu\text{m}$ . O sinal foi obtido por meio do método apresentado na Tabela 3.2, com tempo de coleta de dados do ICP-MS de  $141 \text{ s}$  e tempo de operação do laser de  $42 \text{ s}$ .

Observa-se que com a redução da potência aplicada na bobina de radiofrequência tem-se um aumento na resposta analítica, mesmo para determinação de selênio, que é um elemento que apresenta uma primeira energia de ionização elevada ( $9,75 \text{ eV}$  [48]). Neste caso, como não é necessário fornecer energia para promover processos de desolvatação ou de transferência para a fase gasosa, parte da energia excedente do plasma é utilizada para promover a

ionização preferencial de outras moléculas ou íons presentes na matriz de acrilamida, acarretando na redução do sinal analítico.

Vale ressaltar que, neste caso, a formação de íons  $\text{Se}^{2+}$  é pouco provável para justificar uma redução do sinal analítico de quase 50% quando se compara o emprego de 1000 e 1400 W, porque o valor da segunda energia de ionização do selênio é muito elevado (ca. 20 eV [48]). O favorecimento da formação da espécie  $\text{SeO}^+$ , como consequência do emprego da menor potência, também não pode ser considerado como fator determinante para aumento do sinal analítico em função da magnitude do sinal analítico obtido.



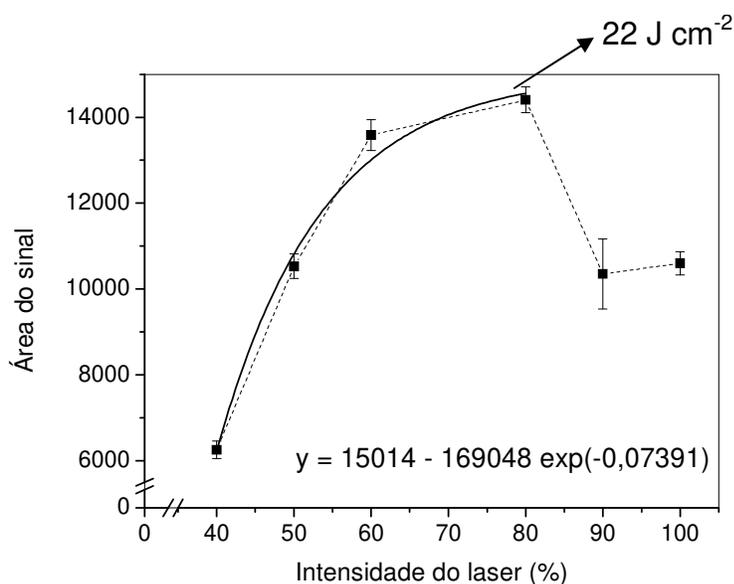
**Figura 3.11.** Áreas dos sinais analíticos obtidas para o estudo da otimização da potência aplicada durante o processo de ablação utilizando géis de poliácrlamida contendo íons selenito.

#### 4.1.4. Avaliação da intensidade do laser

A intensidade do laser foi outro parâmetro avaliado neste estudo. Por meio do gráfico apresentado na Figura 3.12 observa-se que com o aumento da intensidade do laser e, conseqüentemente, da fluência, tem-se um aumento exponencial do sinal analítico, com um máximo obtido quando se aplica 80% da energia máxima disponível (ca. 22 J  $\text{cm}^2$ ). Sabe-se que a ablação de soluções

poliméricas ocorre acima de um valor mínimo (ca. 10 – 100 mJ cm<sup>2</sup>) e que o comportamento observado para o estudo está dentro da tendência esperada.

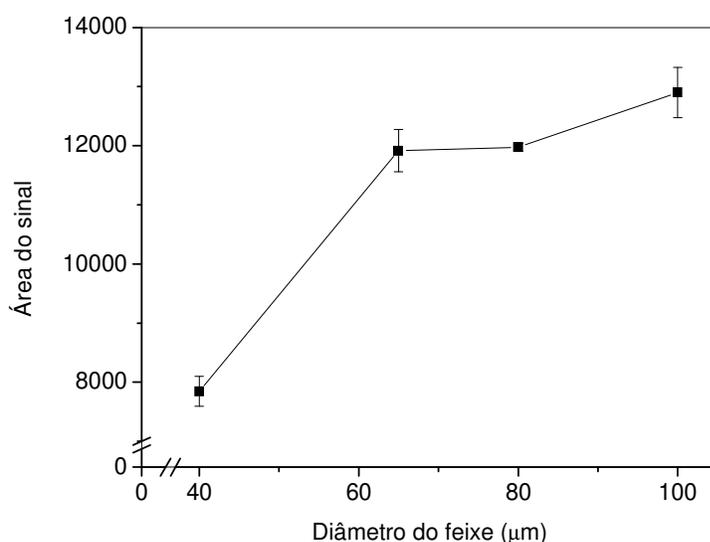
Observa-se, ainda, a partir do gráfico apresentado na Figura 3.12, que operando o laser com intensidade superior a 80% do valor máximo tem-se um decréscimo na área do sinal analítico obtido. Apenas com os dados obtidos experimentalmente neste estudo não é possível definir qual processo estaria envolvido na redução do sinal, mas pode-se cogitar a ocorrência de uma possível sinterização do analito à matriz devido a elevada energia fornecida, conduzindo a formação de compostos que não são ionizados no plasma.



**Figura 3.12.** Área do sinal analítico obtida em função da intensidade do laser para gel de poliacrilamida polimerizado a partir de uma solução de acrilamida contendo 10 mg L<sup>-1</sup> de selenito empregando as seguintes condições de operação: bobina de radiofrequência igual a 1000 W; vazão do gás de auxiliar de 1,8 L min<sup>-1</sup>; vazão de gás transportador de 1,1 L min<sup>-1</sup>; frequência do laser de 20 Hz; diâmetro do feixe do laser de 100 µm. A linha contínua descreve a equação exponencial que se ajusta aos dados obtidos, cuja equação é apresentada junto ao gráfico.

#### 4.1.5. Avaliação do diâmetro do laser e frequência empregada

Avaliou-se a fenda utilizada para seleção do diâmetro do feixe de laser. O equipamento de ablação empregado neste trabalho apresenta uma placa metálica circular contendo orifícios com diferentes diâmetros que permitem a passagem do laser. Assim, seleciona-se, por meio de *software*, o diâmetro de feixe desejado e o equipamento ajusta, automaticamente, a fenda correspondente. Neste estudo, quatro diferentes valores foram estudados, como pode ser observado no gráfico apresentado na Figura 3.13.

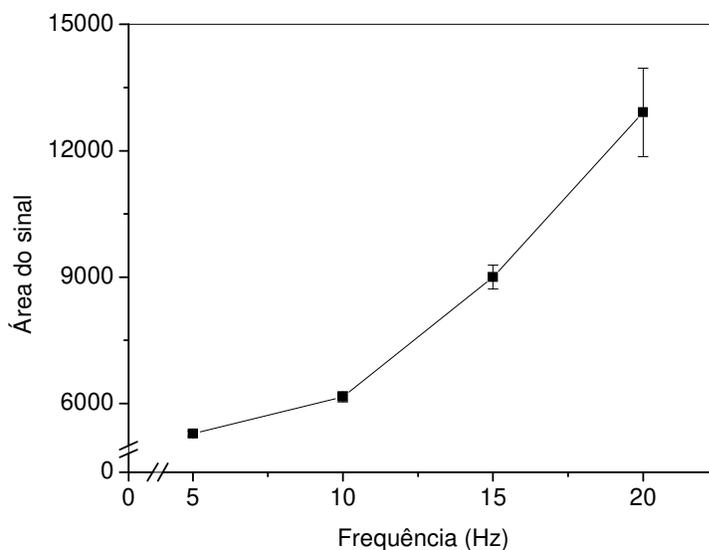


**Figura 3.13.** Área do sinal analítico obtida em função do diâmetro do feixe de laser para gel de poliacrilamida polimerizado a partir de uma solução de acrilamida contendo  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de selenito empregando as seguintes condições de operação: bobina de radiofrequência igual a  $1000 \text{ W}$ ; vazão do gás de auxiliar de  $1,8 \text{ L min}^{-1}$ ; vazão de gás transportador de  $1,1 \text{ L min}^{-1}$ ; frequência do laser de  $20 \text{ Hz}$ ; intensidade do laser de  $80\%$ .

Observa-se que, com o aumento do diâmetro do laser, obtêm-se uma maior área para o sinal analítico obtido, considerando o método proposto para a otimização, apresentado na Tabela 3.2. Tal perfil era esperado, uma vez que a quantidade de material ablada aumenta proporcionalmente com o diâmetro do

laser. Pode-se, inclusive, observar visualmente por meio da câmera de vídeo que monitora o processo de ablação que a quantidade de material transportado até o ICP-MS aumenta com o aumento do diâmetro do feixe utilizado.

Com relação à frequência do pulso do laser, estudou-se quatro valores diferentes para este parâmetro, como pode ser observado no gráfico apresentado na Figura 3.14. Nota-se que a elevação da frequência aplicada gera um aumento da resposta analítica, sendo que o valor de 20 Hz representa o limite máximo que pode ser utilizado no equipamento em questão.



**Figura 3.14.** Área do sinal analítico obtida em função frequência do laser para gel de poli(acrilamida) polimerizado a partir de uma solução de acrilamida contendo  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de selenito empregando as seguintes condições de operação: bobina de radiofrequência igual a  $1000 \text{ W}$ ; vazão do gás de auxiliar de  $1,8 \text{ L min}^{-1}$ ; vazão de gás transportador de  $1,1 \text{ L min}^{-1}$ ; intensidade do laser de  $80\%$ , diâmetro do feixe de  $100 \mu\text{m}$ .

Vale ressaltar que o ajuste da frequência do laser também depende da velocidade com que a varredura do gel é realizada. Assim, seria possível obter uma resposta analítica com a mesma magnitude daquela obtida para  $20 \text{ Hz}$  (em termos de área do sinal analítico), mas empregando uma frequência do laser menor. No entanto, neste caso, seria necessário, para a varredura de uma mesma

área, utilizar uma velocidade de varredura inferior a  $100 \mu\text{m s}^{-1}$ , o que implicaria em redução da frequência analítica.

Por fim, a Tabela 3.3 reúne as condições ótimas para operação do equipamento de ablação a laser acoplado ao ICP-MS após otimização das condições instrumentais de operação para ambos os instrumentos.

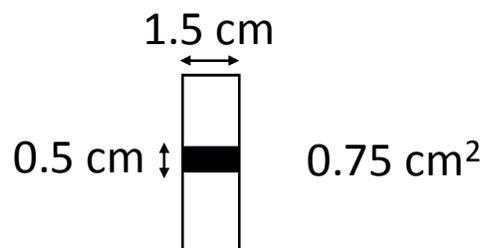
**Tabela 3.3.** Parâmetros instrumentais ótimos para detecção de selênio por meio da hifenação LA-ICP-MS.

<i>Condições de operação do ICP-MS</i>					
Potência aplicada na bobina de radiofrequência (W)		1000			
Vazão de gás transportador - Argônio ( $\text{L min}^{-1}$ )		1,1			
Vazão de gás auxiliar - Argônio ( $\text{L min}^{-1}$ )		1,8			
<i>Condições de operação da Cella Dinâmica de Reação</i>					
Elemento	Espécie monitorada	Gás reacional	Vazão de gás ( $\text{L min}^{-1}$ )	RP <sub>q</sub> (V)	RP <sub>a</sub> (V)
Selênio	$^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$	Oxigênio	0,70	0,50	0
<i>Condições de operação do equipamento de ablação a laser</i>					
Frequência (Hz)		20			
Intensidade do laser (%)		80			
Energia (mJ); Fluência ( $\text{J cm}^2$ )		1,9; 22			
Velocidade de varredura ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )		100			
Diâmetro do feixe de laser ( $\mu\text{m}$ )		100			

## 4.2. Avaliação de um sistema hipotético empregando selenometionina

Avaliou-se um sistema hipotético para géis polimerizados na presença de selenometionina. Baseando-se em dados de densidade óptica, obtidos previamente pelo grupo GEPAM [49], considerou-se que a massa proteica média em uma banda bem definida de um gel de SDS-PAGE situa-se em torno de  $0,5 \mu\text{g}$  de proteína. Assumiu-se, também, que a área média de uma banda é de *ca.*  $0,75 \text{ cm}^2$ , como pode ser visto na Figura 3.15.

Assim, baseando-se nos dados de massa média de proteína em uma banda e considerando que a área de um gel bidimensional de poliacrilamida contém *ca.*  $240 \text{ cm}^2$  e que o volume de solução de acrilamida necessário para prepará-lo é de *ca.*  $25 \text{ mL}$ , preparou-se uma solução de acrilamida contendo  $3,2 \text{ mg L}^{-1}$  de selenometionina.



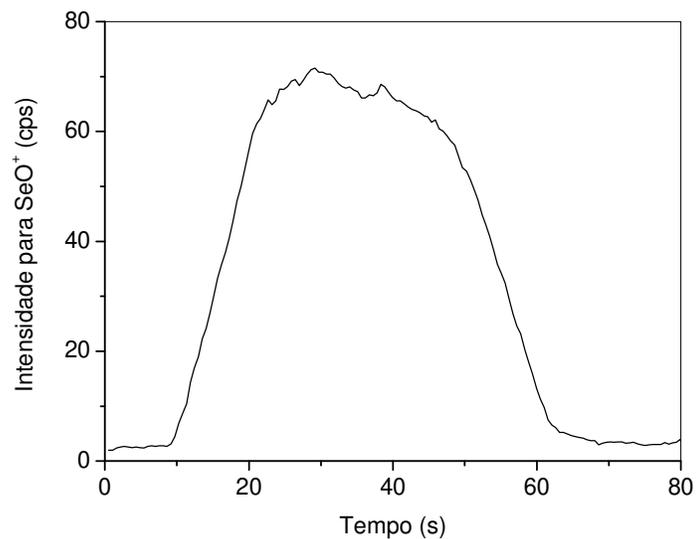
**Figura 3.15.** Diagrama esquemático mostrando as dimensões consideradas para determinação do tamanho médio de uma banda proteica em uma separação eletroforética bidimensional.

Após a polimerização, este gel corresponde a uma banda proteica que simula uma proteína hipotética contendo selênio em 100% de seus aminoácidos (considerando que os aminoácidos apresentam uma mesma massa molar média). Obviamente, esta situação é considerada hipotética, pois não existe uma proteína cuja estrutura primária é composta apenas por selenometionina ou selenocisteína.

As condições instrumentais otimizadas do método, apresentados na Tabela 3.3 foram, então, utilizadas para detecção de selênio nos géis contendo selenometionina. Pode-se observar, por meio do sinal analítico apresentado na

Figura 3.16, que a intensidade máxima para os sinais obtidos situa-se entre 70 e 80 contagens por segundo (cps).

Espera-se, assim, que para uma amostra real, o sinal analítico obtido seja inferior a 70 cps, pois a probabilidade estatística para se encontrar metioninas ou cisteínas em proteínas é de ca. 6,4% [50]. Além disso, nem todas as metioninas ou cisteínas de uma proteína apresentarão a substituição de seus átomos de enxofre por átomos de selênio.

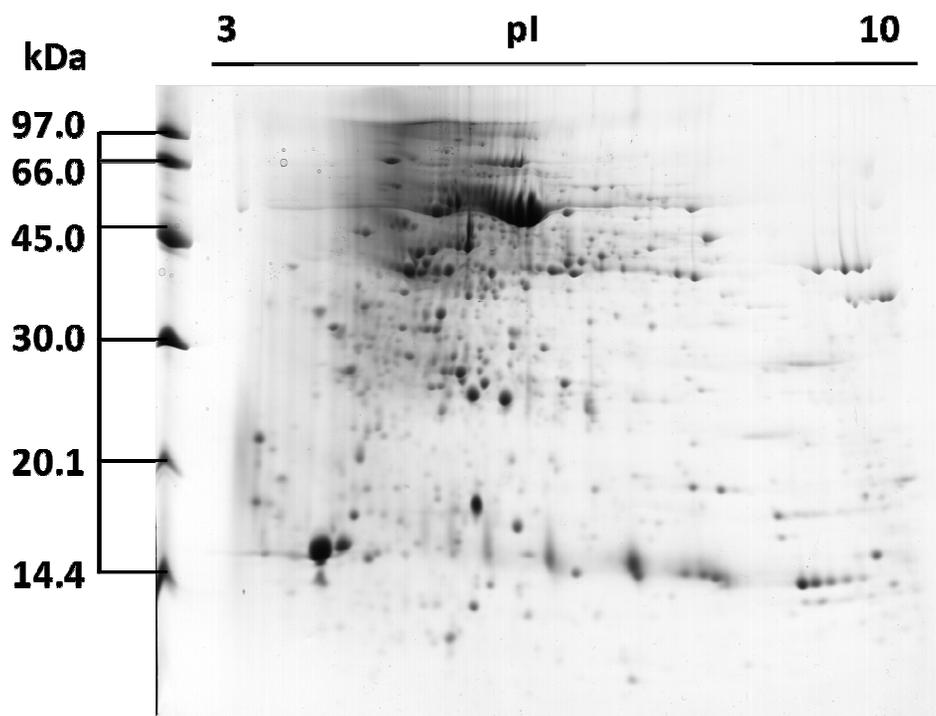


**Figura 3.16.** Sinal analítico obtido para o íon  $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$  após ablação de um gel de poliacrilamida polimerizado a partir de uma solução de acrilamida contendo  $3,2 \text{ mg L}^{-1}$  de selenometionina. O resultado obtido representa uma proteína hipotética onde 100% de seus aminoácidos contêm um átomo de selênio incorporado aos seus resíduos laterais. Suavização aplicada: média adjacente com janela de 2 pontos.

Vale ressaltar que este estudo simula uma situação hipotética que pode variar em função da estrutura primária da proteína analisada, da massa de proteína contida no *spot* bem como da capacidade da planta de promover a eliminação selênio absorvido ou evitar a incorporação deste elemento na estrutura primária das proteínas.

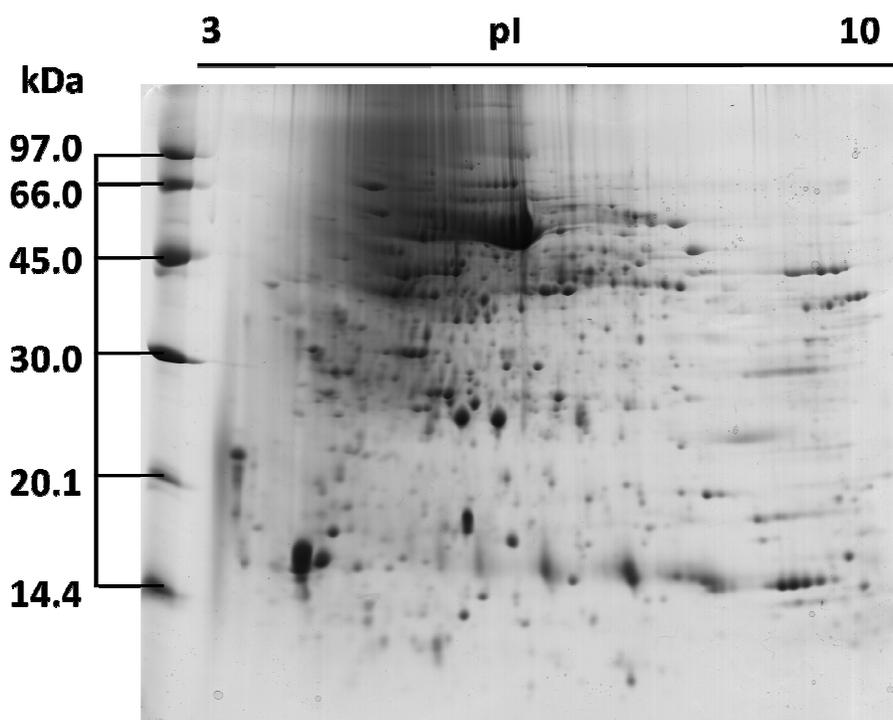
### 4.3. Análise do perfil eletroforético obtido para o grupo de amostras controle e de plantas tratadas com selênio

O perfil eletroforético obtido para as amostras de plantas do grupo controle (irrigadas somente com água) é apresentado na Figura 3.17. Para este grupo de plantas pôde-se identificar, por meio da análise das imagens dos géis empregando o programa ImageMaster 2D Platinum 6.0,  $499 \pm 8$  spots proteicos com uma correlação de 70% entre réplicas (n=3) para géis preparados de maneira independente desde a etapa de extração das proteínas a partir das folhas. Considerando a reprodutibilidade da técnica de eletroforese bidimensional em gel de poliácridamida, pode-se afirmar que valores superiores a 70% indicam boa correlação entre as réplicas.



**Figura 3.17.** Perfil eletroforético obtido após separação de proteínas de folhas de girassol (*Helianthus annuus* L.) de plantas do grupo controle. A massa de proteína aplicada no gel foi de 485 µg.

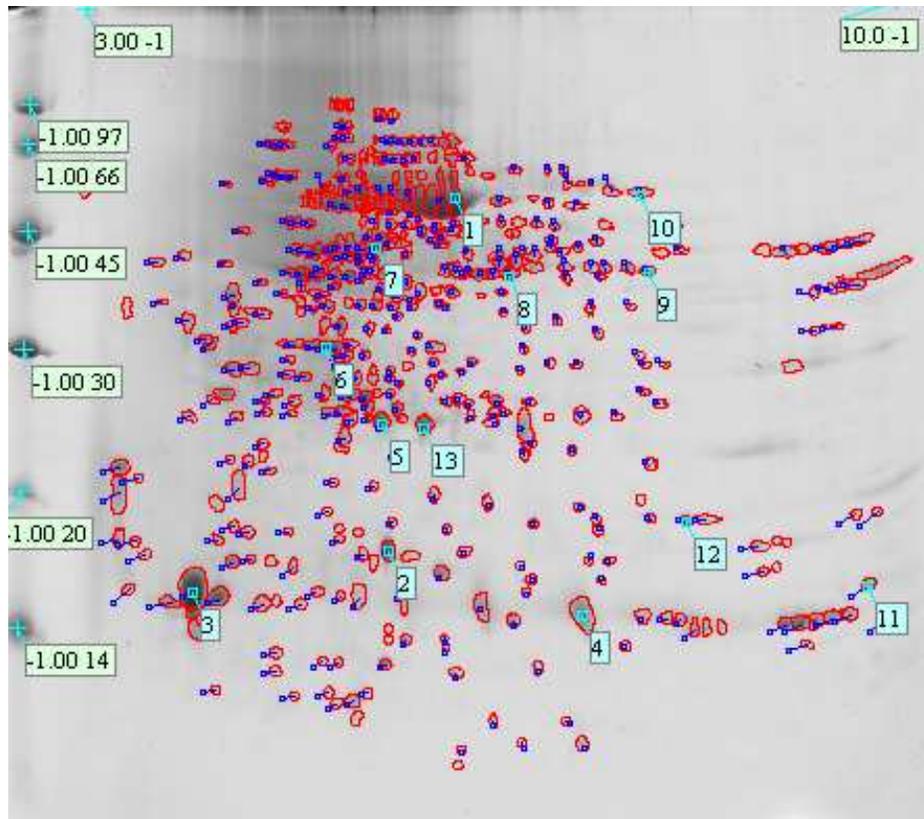
Para as amostras tratadas com selênio o perfil eletroforético obtido pode ser observado na Figura 3.18. Géis deste grupo de plantas apresentaram  $483 \pm 13$  spots com uma correlação de 73% entre réplicas. Novamente, pode-se afirmar que o procedimento de extração de proteínas e o protocolo adotado para separação eletroforética das mesmas apresentam-se adequados para obtenção de resultados reprodutíveis.



**Figura 3.18.** Perfil eletroforético obtido após separação de proteínas de folhas de girassol (*Helianthus annuus* L.) de plantas do grupo irrigado com solução de selênio (352 mg de  $\text{Se}_2\text{O}_3^-$  adicionados ao longo de 44 dias) . A massa de proteína aplicada no gel consistia em 485  $\mu\text{g}$ .

Avaliando, ainda, a correlação entre as diferentes réplicas de géis para as plantas tratadas com selênio, a Figura 3.19 exhibe um diagrama que confirma a boa correlação entre os spots das diferentes réplicas de géis. Observe que esta figura exhibe diversos vetores (em azul), um para cada spot. Nota-se que os vetores localizados numa dada região do gel estão orientados para uma mesma direção, o

que valida a correlação de 73% descrita anteriormente para estas amostras. Caso os vetores se apresentassem dispostos de maneira aleatória os dados de correlação não teriam validade, pois o software não estaria conseguindo correlacionar um determinado *spot* para as diferentes réplicas.



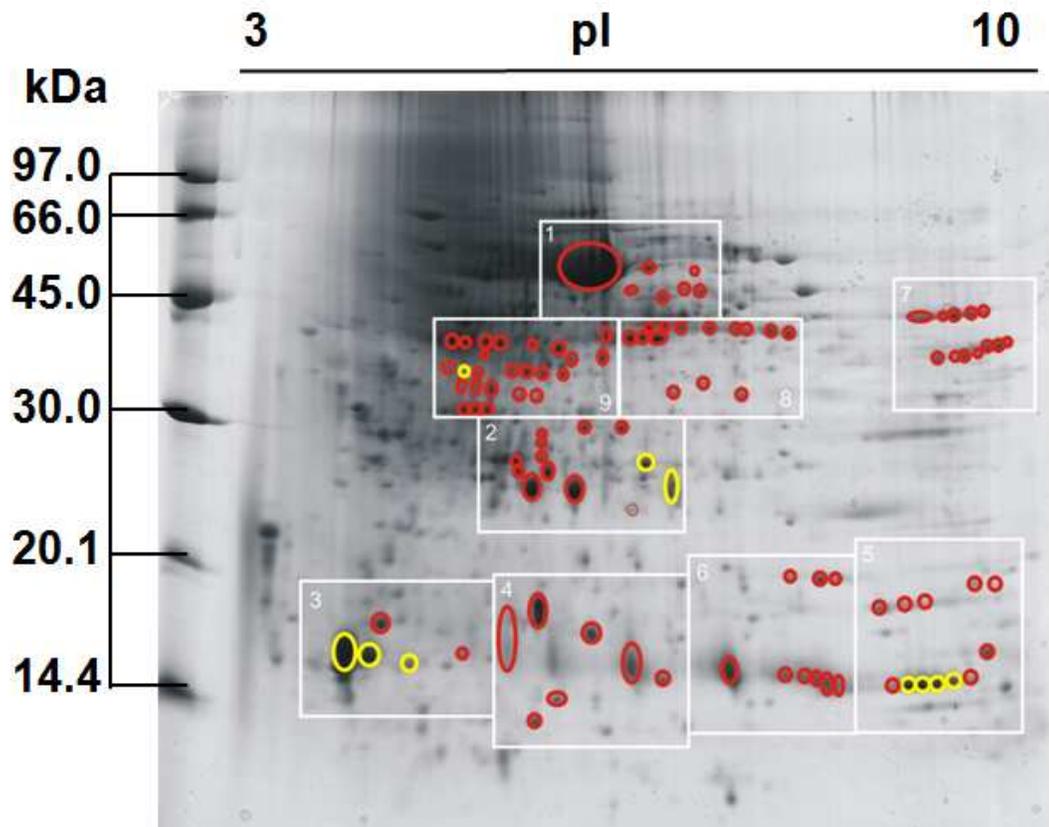
**Figura 3.19.** Imagem de um gel de eletroforese obtido após separação de proteínas de folhas de girassol para uma planta irrigada com solução de selenito. Na figura são exibidos os *spots* identificados (circulados em vermelho) e os vetores (em azul) que correlacionam os *spots* desta réplica com aqueles encontrados nas demais réplicas do mesmo grupo de plantas. Os números indicados nas caixas representam referências que auxiliam o *software* na correlação dos *spots*.

Quando se compara os géis obtidos a partir de plantas do grupo controle com aqueles das plantas tratadas com selênio, observa-se que a correlação entre

os géis é reduzida para 64%. Embora esse número seja pouco inferior ao limite de tolerância de 70% entre réplicas, pode-se dizer que existem pequenas variações sob o ponto de vista de expressão de proteínas quando se compara as plantas controle com aquelas tratadas com selênio. No entanto, não se pode eliminar a possibilidade de utilização da técnica de DIGE (*Differential Gel Electrophoresis*) para avaliação dos resultados obtidos, uma vez que, neste caso, qualquer variação causada em função do procedimento de separação seria eliminado, visto que as proteínas de cada amostra são marcadas com diferentes fluoróforos e separadas na mesma corrida eletroforética e em um único gel de poliacrilamida [51], resultando na obtenção de resultados ainda mais conclusivos em função da redução de variações experimentais.

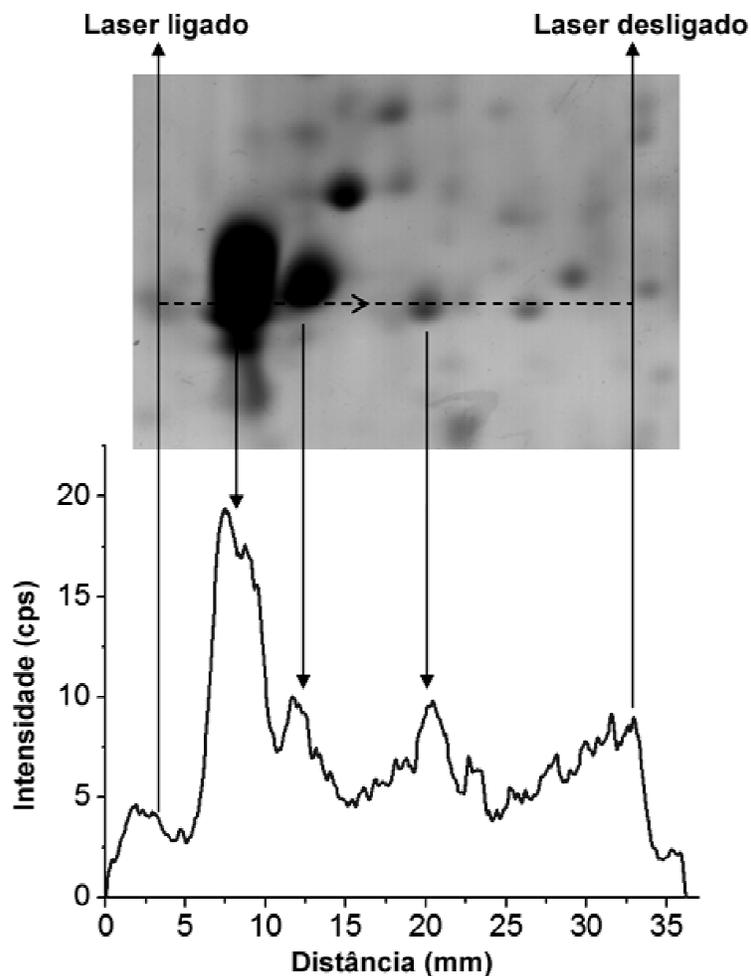
#### **4.4. Detecção de selênio nos *spots* proteicos**

O gel apresentado na Figura 3.20 exibe as diferentes regiões inseridas na câmara de ablação do equipamento de laser. Os *spots* indicados por círculos vermelhos foram avaliados, mas não se detectou selênio nos mesmos. Já para os *spots* destacados por círculos amarelos pôde-se detectar a presença deste elemento. Analisou-se 104 *spots* (ca. 21% do total), identificando-se a presença de selênio em apenas 10 destes *spots* (9,6% das proteínas avaliadas).



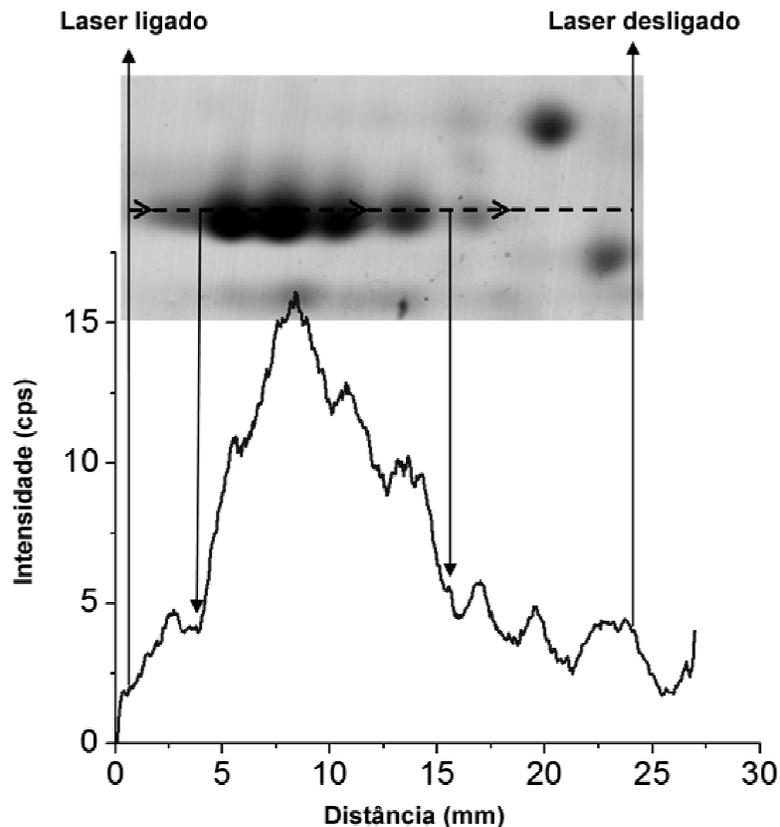
**Figura 3.20.** Imagem de um gel de eletroforese obtido a partir de extrato proteico de folhas de girassol tratados com selênio. As regiões demarcadas no gel indicam as áreas inseridas na câmara de ablação. Os círculos amarelos representam os *spots* onde se identificou a presença de selênio, enquanto os círculos vermelhos representam *spots* analisados que não apresentaram sinais para este elemento.

As Figuras 3.21 e 3.22 destacam duas regiões dos géis onde se pode identificar a presença de selênio. Em todas, correlacionam-se imagens de regiões do gel com o sinal analítico obtido para selênio. Como esperado, os sinais são inferiores a 70 contagens, o que confirma a estimativa realizada previamente envolvendo o estudo com géis polimerizados na presença de selenometionina. Na Figura 3.22 é possível, inclusive, observar a presença de selênio em diferentes isoformas de uma mesma proteína, cuja identidade ainda é desconhecida.



**Figura 3.21.** Sinal analítico obtido para o íon  $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ , em contagens por segundo (cps), obtido após ablação do gel de poliácridamida seco (região número 3, Figura 3.20). A linha tracejada indica a região do gel ablada, enquanto as setas exibem o momento em que o laser foi ligado e desligado, bem como auxiliam visualmente a correlação da imagem com o sinal analítico. Suavização aplicada: média adjacente com janela de 20 pontos.

Vale ressaltar que mesmo não havendo remoção do plástico poroso que recobre os géis, ainda assim, foi possível identificar selênio mas apenas na segunda varredura do gel com o laser, sendo detectado apenas ruído quando se incidiu o laser sobre o plástico. Outra ressalva deve ser feita relação ao fato do laser não apresentar energia suficiente para atingir o papel de filtro que serve como suporte para o gel.

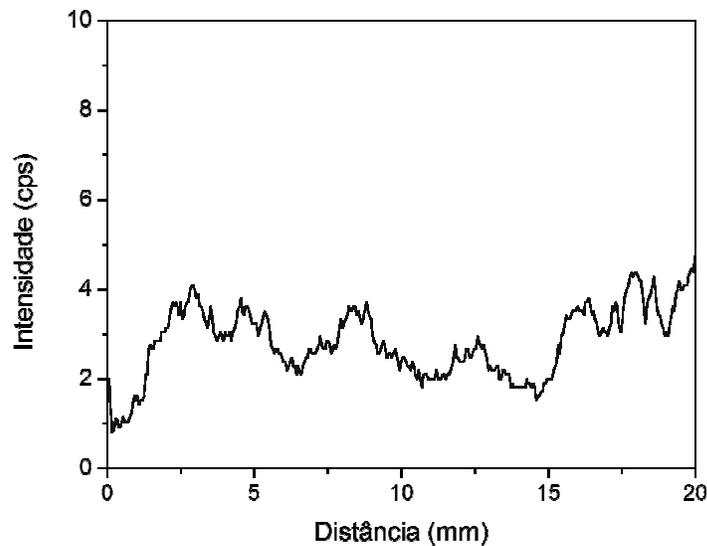


**Figura 3.22.** Sinal analítico obtido para o íon  $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ , em contagens por segundo (cps), obtido após ablação do gel de poliacrilamida seco (região número 5, Figura 3.20). A linha tracejada indica a região do gel ablada, enquanto as setas exibem o momento em que o laser foi ligado e desligado, bem como auxiliam visualmente a correlação da imagem com o sinal analítico. Suavização aplicada: média adjacente com janela de 20 pontos.

Outra questão que deve ser mencionada relaciona-se com o fato de que os *spots* que apresentaram a presença de selênio também foram avaliados nas plantas do grupo controle. Neste caso, observou-se apenas o ruído referente ao sinal analítico.

Por fim, a Figura 3.23 exibe uma região do gel de poliacrilamida sem nenhum *spot* proteico, ou seja, um branco analítico. Observa-se que nesta situação o número máximo de contagens obtidas para o sinal obtido é de ca. 4 contagens, considerando o mesmo tratamento matemático adotado para as

Figuras 3.21 e 3.22 (suavização utilizando média adjacente com janela de 20 pontos).



**Figura 3.23.** Sinal analítico obtido para a  $m/z$  96, em contagens por segundo (cps), obtido após ablação de uma região do gel de poliacrilamida seco sem nenhum *spot* proteico. Suavização aplicada: média adjacente com janela de 20 pontos.

## 5. CONCLUSÕES PARCIAIS

A otimização de parâmetros instrumentais visando à hifenação entre o equipamento de ICP-MS e o sistema para ablação a laser foi apresentada neste capítulo. Dentre os parâmetros de maior relevância no estudo pode-se citar a potência aplicada na bobina de radiofrequência e a fluência empregada no laser. Para o primeiro parâmetro, a redução da potência para geração do plasma (1000 W) foi uma alternativa interessante para possibilitar o aumento do sinal analítico. Neste caso, foi possível promover a ionização do selênio mesmo com redução da energia do plasma, visto que não há necessidade de promover processos de dessolvatação ou transferência para a fase gasosa quando se realizam processos de ablação.

Com relação à fluência do laser, observou-se que o valor de  $22 \text{ J cm}^{-2}$ , formado com um laser com feixe de  $100 \mu\text{m}$  de diâmetro operando com 80% da energia máxima disponível (1,9 mJ), foi adequado para obtenção do maior sinal analítico. Neste caso, observou-se um crescimento exponencial do sinal à medida que a energia do laser foi aumentada, atingindo-se o máximo em 80%. Acima deste valor, outros processos, que podem ser tanto de natureza física quanto química, podem estar influenciando nesta questão como, por exemplo, a sinterização do analito na matriz de poliacrilamida ou a geometria da cratera formada no processo de ablação, reduzindo a quantidade de material que é conduzida até o equipamento de ICP-MS, resultando na redução do sinal analítico.

Por outro lado, alterações nas vazões de argônio, utilizado com gás transportador e auxiliar nos intervalos de  $0,7$  a  $1,5 \text{ L min}^{-1}$  e  $1,2$  e  $1,8 \text{ L min}^{-1}$ , respectivamente, não proporcionaram aumento do sinal analítico e foram ajustados a fim de manter a estabilidade do plasma.

No que tange as amostras de girassol, os resultados apresentados revelaram que, aparentemente, existem pequenas alterações no perfil proteômico dos extratos avaliados neste trabalho quando comparados às plantas irrigadas com solução de selênio e aquelas do grupo controle, evidenciando que não é observada a total supressão ou indução da biosíntese de uma dada proteína para as plantas em estudo neste trabalho, levando em consideração a fração proteica separada por eletroforese em gel.

Com relação à hipótese da síntese de aminoácidos contendo selênio e possível incorporação dos mesmos a estrutura primária das proteínas, pôde-se confirmá-la. No entanto, este processo não se deu de maneira generalizada. Pôde-se identificar a presença do elemento em apenas 9,6% do total de *spots* analisados. O motivo para este pequeno número pode relacionar-se com o fato da incorporação do selênio ter sido minimizada por estratégias adotadas pelo metabolismo do vegetal, tal como eliminação via transpiração foliar, visto que dados apresentados no segundo capítulo desta Tese demonstraram que existe a translocação do selênio para as folhas das plantas. Outra questão que pode

justificar o baixo número de proteínas contendo selênio relaciona-se com o baixo número de aminoácidos contendo enxofre na estrutura primária das mesmas. Desta forma, a concentração de selênio nos *spots* não pôde ser detectada por meio da hifenação LA-ICP-MS.

Desta forma, mesmo com o baixo número de selenoproteínas localizadas nos géis de poliacrilamida, a planta não conseguiu evitar os sérios danos ao metabolismo, como problemas de crescimento, necroses nas folhas e nas bases dos caules.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Timerbaev, A.R.; Pawlak, K.; Gabbiani, C.; Messori, L.; *Recent progress in the application of analytical techniques to anticancer metallodrug proteomics*, *Trend. Anal. Chem.*, **2011**, 30, 1120-1138.
- [2] Mounicou, S.; Lobinski, R.; *Challenges to metallomics and analytical chemistry solutions*, *Pure Appl. Chem.*, **2008**, 80, 2565-2575.
- [3] Silva, A.A.; Delatorre, C.A.; Moraes, M.G.; *Ionoma de plantas: cenário e perspectivas*, *Ciência Rural*, **2011**, 41, 1390-1397.
- [4] García-Barrera, T.; Gómez-Ariza, J.L.; González-Fernández, M.; Moreno, F.; García-Sevillano, M.A.; Gómez-Jacinto, V.; *Biological responses related to agonistic, antagonistic and synergistic interactions of chemical species*, *Anal. Bioanal. Chem.*, no prelo.
- [5] Bodzon-Kulakowska A.; Bierczynska-Krzysik, A.; Dylag, T.; Drabik, A.; Suder, P.; Noga, M.; Jarzebinska, J.; Silberring, J.; *Methods for samples preparation in proteomic research*, *J. Chromatogr. B*, **2007**, 849, 1-31.
- [6] Lay Jr., J.O.; Borgmann, S.; Liyanage, R.; Wilkins, C.L.; *Problems with the "omics"*, *Trends Anal. Chem.*, **2006**, 25, 1046-1056.
- [7] Liu, F.; Gan, P.P.; Wu, H.; Woo, W.S.; Ong, E.S.; Li, S.F.Y.; *A combination of metabolomics and metallomics studies of urine and serum from hypercholesterolaemic rats after berberine injection*, *Anal. Bioanal. Chem.*, no prelo.
- [8] Magalhães, C.S.; Arruda, M.A.Z.; *Sample preparation for metalloprotein analysis: A case study using horse chestnuts*, *Talanta*, **2007**, 71, 1958-1963.
- [9] Grebe, M.; Pröfrock, D.; Kakuschke, A.; Broekaert, J.A.C.; Prange, A.; *Metalomics approach for the identification of the iron transport protein transferrin in the blood of harbour seals (*Phoca vitulina*)*, *Metallomics*, **2010**, 2, 683-693.
- [10] González-Fernández, M.; González-Fernández, T.; Gómez-Ariza, J.L.; *Molecular mass spectrometric identification of superoxide dismutase in the liver of*

- mice *Mus musculus* and *Mus spretus* using a metallomics analytical approach, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, 401, 2779-2783.
- [11] Issa, H.J.; Chan, K.C.; Janini, G.M.; Conrads, T.P.; *Multidimensional separation of peptides for effective proteomic analysis*, *J. Chromatogr. B*, **2005**, 817, 35-47.
- [12] Prange, A.; Pröfrock, D.; *Application of CE-ICP-MS and CE-ESI-MS in metalloproteomics: challenges, developments, and limitations*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**, 383, 372-389.
- [13] da Silva, M.A.O.; Sussulini, A.; Arruda, M.A.Z.; *Metalloproteomics as an interdisciplinary area involving proteins and metals*, *Expert Rev. Proteomics*, **2010**, 7, 387-400.
- [14] Sanz-Medel, A.; Montes-Bayón, M.; de la Campa, M.R.F.; Encinar, J.R.; *Elemental mass spectrometry for quantitative proteomics*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 390, 3-16.
- [15] Wang, M.; Feng, W.Y.; Zhao, Y.L.; Chai, Z.F.; *ICP-MS-based strategies for protein quantification*, *Mass Spectrom. Rev.*, **2010**, 29, 326-348.
- [16] Sussulini, A.; Banzato, C.E.M.; Arruda, M.A.Z.; *Exploratory analysis of the serum ionic profile for bipolar disorder and lithium treatment*, *Int. J. Mass. Spectrom.*, **2011**, 307, 182-184.
- [17] Timerbaev, A.R.; *Determination of Metal Species in Biological Samples: From Speciation Analysis to Metallomics*, *J. Anal. Chem.*, **2012**, 67, 179-185.
- [18] Giusti, P.; Lobinski, R.; Szpunar, J.; Schaumlöffel, D.; *Development of a nebulizer for a sheathless interfacing of nanoHPLC and ICPMS*, *Anal. Chem.*, **2006**, 78, 965-971.
- [19] Ortega, R.; *Synchrotron radiation for direct analysis of metalloproteins on electrophoresis gels*, *Metallomics*, **2009**, 1, 137-141.
- [20] Silva, M.P.; Tomal, A.; Pérez, C.A.; Ribeiro- Silva, A.; Poletti, M.E.; *Determination of Ca, Fe, Cu and Zn and their correlations in breast cancer and normal adjacent tissues*, *X-ray Spectrom.*, **2009**, 38, 103-111.
- [21] Pomazal, K.; *Hydrophobic interaction chromatographic separation of proteins in human blood fractions hyphenated to atomic spectrometry as detector of essential elements*, *J. Chromatogr. A*, **2002**, 960, 143-150.
- [22] Sussulini, A.; Souza, G.H.M.F.; Eberlin, M.N.; Arruda, M.A.Z.; *Comparative metallomics for transgenic and non-transgenic soybeans*, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2007**, 22, 1501-1506.
- [23] Manley, S.A.; Byrns, S.; Lyon, A.W.; Brown, P.; Gailer, J.; *Simultaneous Cu-, Fe-, and Zn-specific detection of metalloproteins contained in rabbit plasma by size-exclusion chromatography-inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy*, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2009**, 14, 61-74.
- [24] Chevalier, F.; *Highlights on the capacities of "Gel-based" proteomics*, *Proteome Sci.*, **2010**, 8, 10.
- [25] Lobinski, R.; Schaumlöffel, D.; Szpunar, J.; *Mass spectrometry in bioinorganic analytical chemistry*, *Mass Spectrom. Rev.*, **2006**, 25, 255-289.
- [26] Ballihaut, G.; Pécheyran, C.; Mounicou, S.; Preud, H.; Grimaud, R.; Lobinski, R.; *Multimode detection (LA-ICP-MS, MALDI-MS and nanoHPLC-ESI-MS2) in 1D*

- and 2D gel electrophoresis for selenium-containing proteins, *Trends Anal. Chem.*, **2007**, 26, 183-190.
- [27] Bettmer, J.; *Application of isotope dilution ICP-MS techniques to quantitative proteomics*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 397, 3495-3502.
- [28] Tanner, S.D.; Baranov, V.I.; Bandura, D.R.; *Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review*, *Spectrochim. Acta B*, **2002**, 57, 1361-1452.
- [29] Chery, C.C.; Gunther, D.; Cornelis, R.; Vanhaecke, F.; Moens, L.; *Detection of metals in proteins by means of polyacrylamide gel electrophoresis and laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry: Application to selenium*, *Electrophoresis*, **2003**, 24, 3305-3313.
- [30] Fan, T.W.M.; Pruszkowski, E.; Shuttleworth, S.; *Speciation of selenoproteins in Se-contaminated wildlife by gel electrophoresis and laser ablation-ICP-MS*, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2002**, 17, 1621-1623.
- [31] Moebius, J.; Zahedi, R.P.; Lewandrowski, U.; Berger, C.; Walter, U.; Sickmann, A.; *The human platelet membrane proteome reveals several new potential membrane proteins*, *Mol. Cell. Proteomics*, **2005**, 4, 1754-1761.
- [32] Lu, B.; McClatchy, D.B.; Kim, J.Y.; Yates III, J.R.; *Strategies for shotgun identification of integral membrane proteins by tandem mass spectrometry*, *Proteomics*, **2008**, 8, 3947-3955.
- [33] Madera, M.; Mann, B.; Mechref, Y.; Novotny, M.V.; *Efficacy of glycoprotein enrichment by microscale lectin affinity chromatography*, *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31, 2722-2732.
- [34] Tsai, C.; Wang, Y.; Chen, Y.; Lai, C.; Lin, P.; Pan, K.; Chen, J.; Khoo, K.; Chen, Y.; *Immobilized metal affinity chromatography revisited: pH/acid control toward high selectivity in phosphoproteomics*, *J. Proteom. Res.*, **2008**, 7, 4058-4069.
- [35] Jacobs, J.M.; Mottaz, H.M.; Yu, L.; Anderson, D.J.; Moore, A.J.; Chen, W.U.; Auberry, K.J.; Strittmatter, E.F.; Monroe, M.E.; Thrall, B.D.; Camp, D.G.; Smith, R.D.; *Multidimensional proteome analysis of human mammary epithelial cells*, *J. Proteom. Res.*, **2004**, 3, 68-75.
- [36] Millea, K.M.; Krull, I.S.; Cohen, S.A.; Gebler, J.C.; Berger, S.J.; *Integration of multidimensional chromatographic protein separations with a combined "Top-Down" and "Bottom-Up" proteomic strategy*, *J. Proteom. Res.*, **2006**, 5, 135-146.
- [37] Becker, J.S.; Pozebon, D.; Dressler, V.L.; Lobinski, R.; *LA-ICP-MS studies of zinc exchange by copper in bovine serum albumin using an isotopic enriched copper tracer*, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2008**, 23, 1076-1082.
- [38] Peters, J.T.; *Ligand Binding by Albumin*, in: *All About Albumin*, Academic Press, San Diego, **1995**, pp. 76-132.
- [39] da Silva, M.A.O.; de Andrade, S.A.L.; Mazzafera, P.; Arruda, M.A.Z.; *Evaluation of sunflower metabolism from zinc and selenium addition to the culture: A comparative metallomic study*, *Int. J. Mass Spectrom.*, **2011**, 307, 55-60.
- [40] White, P.J.; Bowen, H.C.; Parmaguru, P.; Fritz, M.; Spracklen, W.P.; Spiby, R.E.; Meacham, M.C.; Mead, A.; Harriman, M.; Trueman, L.J.; Smith, B.M.; Thomas, B.; Broadley, M.R.; *Interactions between selenium and sulphur nutrition in Arabidopsis thaliana*, *J. Exp. Bot.*, **2004**, 55, 1927-1937.

- [41] Jiménez, M.S.; Gomez, M.T.; Rodriguez, L.; Martinez, L.; Castillo, J.R.; *Some pitfalls in PAGE-LA-ICP-MS for quantitative elemental speciation of dissolved organic matter and metalomics*, Anal. Bioanal. Chem., **2009**, 393, 699-707.
- [42] da Silva, M.A.O.; Garcia, J.S.; de Souza, G.; Eberlin, M.N.; Gozzo, F.C.; Arruda, M.A.Z.; *Evaluation of sample preparation protocols for proteomic analysis of sunflower leaves*, Talanta, **2010**, 80, 1545-1551.
- [43] Bradford, M.M.; *Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding*, Anal. Biochem., **1976**, 72, 248-254.
- [44] Candiano, G.; Bruschi, M.; Musante, L.; Santucci, L.; Ghiggeri, G.M.; Carnemolla, B.; Orecchia, P.; Zardi, L.; Righetti, P.G.; *Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis*, Electrophoresis, **2004**, 25, 1327-1333.
- [45] Hattendorf, B.; Gunther, D.; *Strategies for method development for an inductively coupled plasma mass spectrometer with bandpass reaction cell. Approaches with different reaction gases for the determination of selenium*, Spectrochim. Acta B, **2003**, 58, 1-13.
- [46] March, R.E.; *An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry*, J. Mass Spectrom., **1997**, 32, 351-369.
- [47] Walle, M.; Koch, J.; Flamigni, L.; Heiroth, S.; Lippert, T.; Hartung, W.; Gunther, D.; *Detection efficiencies in nano- and femtosecond laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry*, Spectrochim. Acta B, **2009**, 64, 109-112.
- [48] Ferro, R.; Saccone, A.; *Intermetallic Chemistry*, 1<sup>a</sup> edição, **2008**, Pergamon Press, Amsterdam.
- [49] da Silva M. A. O.; *Avaliação de sistemas baseados em ponto nuvem para a extração de albumina e estudos conformacionais após a extração*, Dissertação de mestrado, **2008**, Universidade Estadual de Campinas.
- [50] Miseta, A.; Csutora, P.; *Relationship between the occurrence of cysteine in proteins and the complexity of organisms*, Mol. Biol. Evol., **2000**, 17, 1232-1239.
- [51] Timms, J.F.; Cramer, R.; *Difference gel electrophoresis*, Proteomics, **2008**, 8, 4886-4897.

## Capítulo 4

---

**Emprego da hifenação LA-ICP-MS para realização de análises quantitativas de selênio e enxofre diretamente nas folhas de girassol e criação de imagens bidimensionais exibindo a distribuição destes elementos nas estruturas estudadas.**



## 1. OBJETIVO

Os dados apresentados anteriormente revelaram a translocação de selênio principalmente para as folhas dos girassóis. Nesse sentido, buscou-se realizar neste capítulo a análise quantitativa direta de selênio e enxofre nas folhas das plantas empregando a hifenação LA-ICP-MS. Para tanto, realizou-se o cultivo de um novo grupo de girassóis irrigados com íons selenito e outro grupo de plantas controle utilizado para validação da metodologia, permitindo, assim, a análise quantitativa da distribuição dos referidos elementos nas folhas das plantas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Potencialidades e limitações do sistema LA-ICP-MS com a construção de imagens para análise de amostras biológicas

A aplicação da hifenação LA-ICP-MS para análise de amostras biológicas com a posterior construção de imagens pode ser encontrada na literatura para avaliação de diferentes questões relacionadas à distribuição de diversos elementos em matrizes de origem vegetal ou animal [1]. Destacam-se, no entanto, os esforços realizados no sentido de avaliar questões relacionadas ao preparo das amostras previamente à inserção das mesmas na câmara de ablação, bem como experimentos focando nas estratégias para possibilitar a determinação quantitativa ou qualitativa nas amostras [2].

Com relação à questão do preparo de amostras, o grande problema para realizar uma determinação empregando LA-ICP-MS consiste no fato de que a manipulação do material biológico pode causar a redistribuição do elemento a ser determinado no órgão ou tecido avaliado, o que acaba gerando um resultado distinto daquele que seria obtido caso as análises fossem conduzidas *in situ*. Moradi *et al.* [3] avaliam esta questão estudando a distribuição de níquel em folhas de uma planta hiperacumuladora do gênero *Berkeleya*. Para tanto, os autores

desenvolveram um procedimento em laboratório que foi comparado com um procedimento clássico que utiliza dimetilglioxima para corar as folhas [4]. No procedimento desenvolvido pelos autores, as folhas das plantas foram congeladas com nitrogênio líquido, seguido da impregnação das mesmas com uma resina epóxi, que exigia cura a 50 °C por 24 horas. O material foi, então, cortado em lâminas de 15 mm, sendo a distribuição de níquel avaliada via LA-ICP-MS. Segundo os resultados apresentados pelos autores, não existiram diferenças em termos da distribuição de níquel nas folhas tratadas com a resina quando comparadas àquelas coradas com dimetilglioxima. Vale ressaltar que o tratamento das folhas com nitrogênio líquido não garante a integridade das estruturas celulares, fato conhecido de longa data [5], podendo acarretar problemas no que se refere à migração do metal para outras regiões da folha.

Pode-se, no entanto, observar que, em muitos casos, o preparo de amostras não exige inúmeras etapas a fim de adequar uma folha, por exemplo, para análise via LA-ICP-MS. A simples coleta e inserção da folha diretamente na câmara do sistema de laser pode ser uma alternativa viável [6]. No entanto, deve-se atentar para variações na quantidade de material ablada e, conseqüentemente, introduzida no ICP-MS ao longo do tempo. Correções destas variações podem ser facilmente realizadas monitorando-se um padrão interno, como o carbono, por exemplo. Já para amostras de origem animal, a questão do preparo geralmente exige o uso de um micrótomo para obtenção de cortes com alguns milímetros de espessura. Neste caso, deve-se atentar para que a região analisada fornecerá informações referentes a uma pequena região da amostra [7]. Desta forma, observa-se que a análise da distribuição de um dado elemento em um órgão ou tecido depende um tempo relativamente extenso.

O emprego de uma matriz de amostra que se assemelhe àquela do vegetal analisado muitas vezes consiste em um problema que deve ser superado. Comumente, para análise de folhas de plantas, emprega-se um material de referência certificado de folha e realiza-se uma série de experimentos com o objetivo de assegurar que pequenas alterações na composição de matriz não irão

interferir nas quantificações [2]. Alternativamente, pode-se empregar um constituinte majoritário da matriz, como pode ser observado no trabalho desenvolvido por Prohaska *et al.* [8] que empregaram padrões de celulose dopados com Al, Fe, Ca, Ba e Sr para avaliação da distribuição destes elementos em madeira.

Com relação à quantificação, esta não se apresenta como uma tarefa de fácil realização. Existem trabalhos que apenas indicam o número de contagens obtido para uma determinada área do material estudado, explorando uma abordagem qualitativa. Este é o caso do trabalho desenvolvido por Meharg *et al.* [9] que avaliam a presença de arsênio em grãos de arroz. Embora tenha sido possível avaliar a distribuição de arsênio no grão em diferentes pontos, os autores não realizam um controle rigoroso do padrão interno usado para normalizar variações no processo de ablação.

Outros trabalhos que avaliam a distribuição elementar em folhas abordam de maneira mais rigorosa a questão da quantificação. No caso de Wu *et al.* [10] os autores estudam a distribuição de cobre em uma planta tolerante a este elemento após tratamento hidropônico com solução enriquecida no isótopo  $^{65}\text{Cu}$ . Os autores conseguiram observar de maneira bastante evidente a translocação do cobre para as folhas em apenas 30 minutos após o início do tratamento. Aparentemente o *stress* provocado pela adição do cobre também causa alterações na concentração de outros elementos na folha, sendo que tais mudanças irão depender da idade da mesma [10]. Outra questão evidente no trabalho relaciona-se com o fato de que para alguns elementos é difícil obter imagens com grande detalhamento das nervuras das folhas, como foi o caso do enxofre, mas que não impedem a avaliação da distribuição do elemento ao longo das mesmas.

Questões práticas também devem ser levadas em consideração. No que se refere às condições de operação do sistema de laser, deve-se considerar que as amostras das folhas são bastante delicadas. Assim, deve-se avaliar criteriosamente o diâmetro do feixe e intensidade do laser empregado que irá incidir sobre a amostra [11]. Hanć *et al.* [12] comentam sobre esta questão em um

trabalho onde realizam a análise de chumbo em diferentes regiões de uma planta do gênero *Pisum*. Para as amostras em questão, o uso de um laser com diâmetro superior a 100 µm já causava destruição da folhas, fazendo com que os autores passassem a empregar um feixe com diâmetro de 50 µm em suas análises. Evidentemente que o emprego de um feixe de menor diâmetro implica em redução na quantidade de material ablado e, conseqüentemente, introduzida no espectrômetro de massas, podendo acarretar problemas para detecção de um determinado elemento.

## **2.2. Tendências observadas na literatura para a área de proteômica empregando LA-ICP-MS**

Pode-se observar na literatura relacionada à área de proteômica uma recente tendência com relação ao emprego da técnica de LA-ICP-MS em conjunto com outras técnicas de espectrometria de massas que utilizam técnicas de ionização mais suaves como ESI-MS ou MALDI-MS, para possibilitar a obtenção de informações referentes à composição elementar da amostra bem como informações referentes a moléculas orgânicas que apresentam interesse para um estudo específico [13], como foi explorado no trabalho desenvolvido por Sussulini *et al.* [14] onde o objetivo dos autores consistiu em avaliar possíveis biomarcadores para o transtorno afetivo bipolar a partir de amostras de plasma sanguíneo de pacientes diagnosticados com a doença, empregando as técnicas de MALDI-TOF MS/MS e LA-ICP-MS.

Nesse sentido, a hifenação LA-ICP-MS pode ser utilizada como uma valiosa ferramenta em estudos que buscam a quantificação de biomoléculas em um determinado sistema. Um exemplo que explora esta questão pode ser evidenciado no trabalho desenvolvido por Hu *et al.* [15] onde os autores identificam proteínas ligadas a anticorpos marcados com metais via LA-ICP-MS após realizar um imunoensaio. A principal vantagem encontrada neste tipo de abordagem concentra-se no fato de que a técnica de LA-ICP-MS possibilita realizar análises

quantitativas em estudos que avaliam, por exemplo, a expressão de uma dada proteína, empregando volumes diminutos de amostra. A literatura, inclusive, já traz informações sobre a potencialidade da aplicação desta abordagem [16]. Embora ainda seja necessário realizar inúmeros estudos referentes a esta questão, o emprego de um equipamento de ICP-MS apresenta potencial para realizar a quantificação absoluta de biomoléculas, diferente de outras técnicas de ionização para análise de substâncias orgânicas que empregam reagentes específicos como, por exemplo, o SILAC (*Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture*) [17], e que são restritos a quantificação relativa entre dois grupos de amostras.

Por outro lado, o emprego desta abordagem via ICP-MS exigiria a utilização de estratégias de preparo de amostras bem mais complexas. Para moléculas que não apresentam metais ou outros elementos detectáveis por ICP-MS, deve-se desenvolver estratégias que permitam a interação seletiva e reprodutível do reagente derivante (o qual deve conter um metal em sua estrutura) com a molécula alvo, em uma ligação semelhante ao da interação antígeno-anticorpo, possibilitando assim a análise [18]. Nesse ponto, a disponibilidade de reagentes ainda se apresenta bastante restrita, sendo que os estudos ainda são desenvolvidos com reagentes específicos sintetizados em laboratório pelos grupos de pesquisa que trabalham com este tema.

### **3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

#### **3.1. Preparo das soluções, padrões e limpeza dos materiais**

Todos os reagentes descritos neste capítulo foram preparados utilizando reagentes de grau analítico provenientes da Merck (Darmstadt, Alemanha) ou Sigma Aldrich (no caso do sal  $\text{NaSeO}_3$  utilizado para preparo das soluções de irrigação dos girassóis) bem como água deionizada ( $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ), obtida a partir de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, USA).

Para realização das quantificações de selênio e enxofre por ICP-MS empregou-se tubos de polipropileno para reduzir possíveis problemas relacionados com contaminação, sendo as soluções preparadas em capela de fluxo laminar.

Após o uso, todos os materiais eram lavados com água e detergente (Triton<sup>®</sup> X-100) e colocados em banho ácido (ácido nítrico 10% v/v), sendo mantidos nesta solução por, no mínimo, 8 horas. Posteriormente, foram lavados utilizando água deionizada e secos em estufa, à exceção dos materiais volumétricos que eram secos à temperatura ambiente em capela de fluxo laminar.

### **3.2. Plantio dos girassóis**

Para realizar esta etapa do trabalho fez-se necessário realizar um novo plantio de girassóis, de maneira análoga aquele apresentado no segundo capítulo desta tese. Neste caso, o emprego dos girassóis armazenados a -80 °C e utilizados nos estudos apresentados anteriormente não é adequado, visto que o armazenamento das plantas à baixa temperatura pode causar a ruptura das estruturas celulares, resultando numa possível migração dos elementos a serem estudados de uma região da folha para outra.

Assim, realizou-se novamente o cultivo de girassóis da variedade IAC larama fornecidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) em casa de vegetação, com a colaboração do Prof. Dr. Paulo Mazaffera do departamento de fisiologia vegetal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Novamente, o solo empregado para cultivo foi esterilizado por 1 hora para garantir a eliminação de micro-organismos, sendo posteriormente adicionado a potes plásticos de 700 mL.

Para o plantio, as sementes foram inicialmente desinfetadas com solução 1% (v/v) de hipoclorito de sódio comercial. Empregou-se 20 potes que receberam três sementes cada e que foram inseridas a *ca.* 3 cm de profundidade. Nos 7 primeiros dias após o plantio a irrigação foi realizada utilizando somente água

destilada. Após este período, realizou-se o desbaste, mantendo em cada pote apenas uma das plantas [19]. As mesmas foram divididas em 2 grupos sendo que um deles constituiu no grupo controle e foi irrigado apenas com água, enquanto, o segundo, consistia no grupo de plantas tratadas com selênio, recebendo uma dose diária de 7,58 mg de  $\text{SeO}_3^{2-}$  (empregou-se  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  como fonte de selênio).

Diferentes folhas foram coletadas ao longo do período de cultivo com o objetivo de avaliar a distribuição de selênio e enxofre diretamente nestas estruturas, bem como para utilizá-las para a validação da metodologia, utilizando-as como matriz.

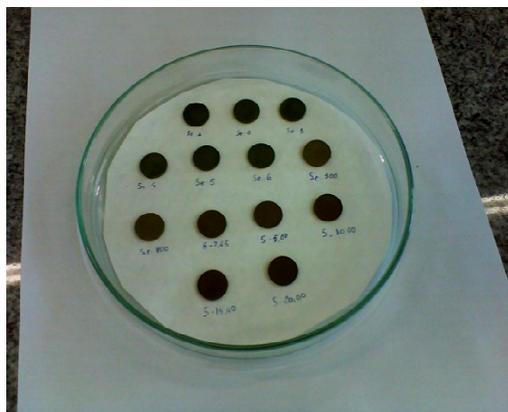
### **3.3. Validação da metodologia empregada**

Considerando que a análise de sólidos (neste caso específico das folhas de uma planta) consiste em uma tarefa complexa devido à composição da matriz da amostra, buscou-se desenvolver e validar um procedimento para permitir a análise quantitativa de selênio e enxofre diretamente nas folhas dos girassóis. O maior problema enfrentado consiste no fato de não existir um material certificado de folhas de girassol para avaliação do procedimento proposto. Buscou-se, então, realizar a validação da metodologia utilizando materiais certificados obtidos a partir de outras espécies vegetais. A seguir, será discutida a estratégia adotada para validação da metodologia para quantificação de enxofre e selênio.

#### **3.3.1. Validação da metodologia para quantificação de enxofre**

Para validação da metodologia para análise de enxofre utilizou-se um material de referencia certificado (CRM 100 – *Minor and trace elements in beech leaves*, produzido pelo *Institute for Reference Materials and Measurements*), um material de referência (1575a *Tomato Leaves*, produzido pelo *National Institute of Science and Technology - NIST*), além das amostras de girassol do grupo controle e tratadas com selênio.

Neste caso, inicialmente, determinou-se a concentração de enxofre empregando LA-ICP-MS no material de referência certificado CRM 100 – *Minor and trace elements in beech leaves*, realizando-se um procedimento de adição de padrão. Para tanto, realizou-se a adição de 5, 10, 15 e 20 mg g<sup>-1</sup> de enxofre, na forma de sulfato, a porções conhecidas do material certificado de referência. Após homogeneização, os materiais foram prensados sob pressão de 7 psi, obtendo-se pastilhas com diferentes concentrações de enxofre, como pode ser observado na Figura 4.1.



**Figura 4.1.** Pastilhas produzidas com o material CRM 100 – *Minor and trace elements in beech leaves* para determinação de enxofre no referido material por meio da técnica de adição de padrão. O material também foi empregado para calibração do sistema de LA-ICP-MS e possibilitar a determinação da concentração de enxofre no material 1575a – *Tomato Leaves* e nas plantas do grupo controle e tratadas com selênio cultivadas neste trabalho.

Na sequência, construiu-se uma curva de calibração com as pastilhas do material de referência CRM 100 – *Minor and trace elements in beech leaves* com concentração variando de 2,6 a 20 mg g<sup>-1</sup>. Produziu-se, então, pastilhas do material de referência 1575a – *Tomato Leaves*. A concentração de enxofre no material 1575a foi então determinada empregando a curva de calibração obtida a partir do material CRM 100.

Por fim, preparou-se pastilhas a partir dos materiais vegetais de folhas de girassol cultivados neste trabalho, pertencentes ao grupo de plantas controle. Novamente, determinou-se a concentração de enxofre calibrando-se o sistema com as pastilhas de material de referência certificado CRM 100 – *Minor and trace elements in beech leaves*.

Em seguida, as pastilhas preparadas a partir das folhas de girassol foram submetidas a um procedimento de decomposição ácida em um forno de micro-ondas (Provecto Analítica, Jundiaí, Brasil) com magnetron de  $2450 \pm 13$  MHz e potência nominal de 1200 W, e decompostas de acordo com as condições apresentadas na Tabela 4.1. Para a decomposição, as pastilhas foram maceradas e colocadas em frascos de politetrafluoretileno na presença de 6,0 mL de ácido nítrico sub-destilado e 0,5 mL de peróxido de hidrogênio. As soluções obtidas após a decomposição foram evaporadas até quase a secura, utilizando um banho de areia (Quimis, Diadema, Brasil) com temperatura ajustada a 80 °C, filtradas e retomadas para 10 mL utilizando ácido nítrico sub-destilado a 1,0% (v/v). A concentração de enxofre foi determinada por ICP-MS (PerkinElmer ELAN DRC-e, Shelton, EUA) empregando-se um sistema padrão para introdução de amostras, que, neste caso, consistia em um nebulizador Meinhard® e uma câmara de nebulização ciclônica. As condições instrumentais empregadas para estas análises seguiram os parâmetros apresentados na Tabela 4.2.

**Tabela 4.1.** Condições empregadas para realizar a decomposição pastilhas de folhas de girassol utilizando radiação micro-onda.

<b>Etapa</b>	<b>Potência (W)</b>	<b>Tempo (min)</b>
1	400	5
2	790	8
3	320	4

Para determinação da concentração de enxofre nas folhas de girassol, realizou-se, previamente à varredura de cada folha, a construção de uma curva analítica (intensidade para a razão  $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+ / ^{12}\text{C}^+$  vs. concentração de selênio), utilizando o material de referência certificado CRM 100 – *Minor and trace elements in beech leaves*.

**Tabela 4.2.** Condições de operação do equipamento de ICP-MS para determinação quantitativa de enxofre e selênio no material utilizado para confecção das pastilhas analisadas por LA-ICP-MS e, posteriormente, submetidas à digestão ácida.

<i>Condições de operação do ICP-MS</i>					
Potência RF (W)	1270				
Fluxo do gás nebulizador – Ar (L min <sup>-1</sup> )	0.92				
Fluxo do gás auxiliar – Ar (L min <sup>-1</sup> )	1.2				
Modo de leitura	Peak hopping				
<i>Dwell time</i> (ms)	50				
Tempo morto do detector (ns)	60				
<i>Sweeps</i>	100				
Tempo de integração (ms)	5000				
Replicatas	3 (10 para enxofre)				
Espécies monitoradas	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$ ; $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$				
<i>Condições de operação da cela dinâmica de reação</i>					
Elemento	Espécie monitorada	Gás de reação	Fluxo do gás (mL min <sup>-1</sup> )	RPq (V)	RPa (V)
Selênio	$^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$	Oxigênio	0,70	0,50	0
Enxofre	$^{48}\text{SO}^+$	Oxigênio	0,70	0,50	0

### 3.3.2. Validação da metodologia para quantificação de selênio

Para calibração do sistema de LA-ICP-MS para quantificação de selênio produziu-se pastilhas com concentração variável de selênio, na forma de selenito (entre 25 e 1200  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), após dopar o material de referência certificado 1575a *Tomato Leaves*.

Avaliou-se, então, a concentração de selênio em outro material de referência certificado, o CRM 281 – *Trace Elements in Rye Grass*, produzido pelo *Institute for Reference Materials and Measurements*, que foi previamente dopado com 800  $\mu\text{g g}^{-1}$  de selênio utilizando selenito de sódio.

Pastilhas também foram preparadas a partir dos materiais vegetais de folhas de girassol cultivados neste trabalho, tanto para o grupo de plantas controle, como para o grupo tratado com selênio, sendo que as pastilhas produzidas a partir de folhas de girassol do grupo controle foram dopadas com ca. 100  $\mu\text{g g}^{-1}$  de selênio. Determinou-se a concentração de selênio destas pastilhas por meio da curva de calibração construída com o material de referência certificado 1575a *Tomato Leaves*.

Neste caso, as pastilhas obtidas a partir dos materiais vegetais das plantas do grupo controle dopadas com selênio e do grupo de plantas tratadas com selênio também foram decompostas usando o mesmo procedimento descrito no item 2.3, e a concentração deste elemento determinada utilizando o ICP-MS operando com sistema de introdução de amostras padrão (nebulizador concêntrico e câmara de nebulização ciclônica) de acordo com as condições instrumentais apresentadas na Tabela 2.4.

Para determinação da concentração de selênio nas folhas de girassol, realizou-se, previamente à varredura de cada folha, a construção de uma curva analítica (intensidade para a razão  $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^{+}/^{12}\text{C}^{+}$  vs. concentração de Se) utilizando o material de referência certificado 1575a – *Tomato Leaves*.

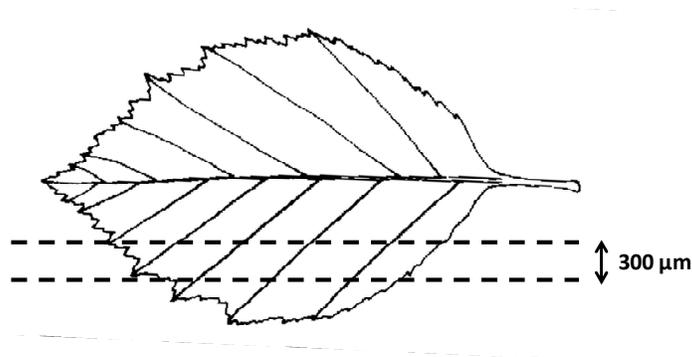
### **3.4. Procedimento para preparo das folhas para análise direta empregando LA-ICP-MS**

O teor de água presente na folha influencia de maneira significativa na quantidade de material ablado ao longo do tempo [6]. Como a análise de uma folha demanda pelo menos 6 horas para ser concluída, tem-se que o fluxo de argônio que atua como gás transportador tende a remover água do material vegetal. Assim, com um material mais seco ao longo do tempo tem-se a introdução de maiores quantidades de amostra para o ICP-MS. Para evitar tais variações ao longo da análise, as folhas de girassol coletadas foram secas em estufa a 40 °C, até massa constante, e fixadas na câmara de ablação do equipamento de laser. Vale ressaltar que a secagem das folhas é um procedimento adotado que preserva todas as células e organelas celulares, sendo comumente utilizado em laboratórios na área de botânica para preservação de amostras.

### **3.5. Condições experimentais utilizadas para análises das folhas via LA-ICP-MS**

Para análise das folhas empregando a hifenação entre o equipamento de laser e o ICP-MS, deve-se atentar para diferentes parâmetros instrumentais, incluindo a velocidade de varredura do laser e velocidade de aquisição dos pontos por parte do ICP-MS. Na prática, para criação das imagens, propôs-se a coleta de dados por meio da varredura das folhas utilizando diferentes linhas (emprego o laser no modo *raster*), como pode ser visto na Figura 4.2.

Para as análises realizadas, a distância entre duas linhas consecutivas foi de 300 µm, o que nos fornece a resolução para uma das coordenadas, no caso da construção de uma imagem bidimensional.



**Figura 4.2.** Diagrama esquemático exemplificando duas linhas consecutivas utilizadas para análise direta das folhas via LA-ICP-MS. No estudo proposto, a distância entre duas linhas consecutivas foi de 300  $\mu\text{m}$ .

A velocidade de varredura empregada neste caso foi de  $70 \mu\text{m s}^{-1}$ , enquanto a taxa de aquisição de pontos por parte do equipamento de ICP-MS foi de 0,468 s para folhas de plantas do grupo controle e 0,402 s para folhas de plantas tratadas com  $\text{SeO}_3^{2-}$ . Tais valores foram ajustados em função das dimensões da folha.

A Tabela 4.3 apresenta os demais parâmetros empregados para a análise das folhas. As condições de operação do equipamento de laser possibilitaram a obtenção de condições energéticas para ablar o material vegetal sem que a folha fosse perfurada. Neste caso, a frequência de operação do laser e o diâmetro do feixe foram operados em seus valores máximos.

Em todas as análises realizadas, monitorou-se simultaneamente os íons  $^{12}\text{C}^+$ , empregando-os, neste caso, como padrão interno, devido à distribuição relativamente homogênea deste elemento em toda a folha, corrigindo, assim, variações decorrentes do processo de ablação. Neste particular, o uso de  $^{12}\text{C}^+$  consiste de uma alternativa bastante interessante visto que o ICP-MS opera com a cela de reação pressurizada prevenindo que uma alta taxa de íons  $^{12}\text{C}^+$  atinja o detector do equipamento, possibilitando o emprego do mesmo como padrão interno.

**Tabela 4.3.** Parâmetros instrumentais ótimos para detecção de selênio e enxofre por meio da hifenação LA-ICP-MS.

<i>Condições de operação do ICP-MS</i>	
Potência aplicada na bobina de radiofrequência (W)	1000
Vazão de gás transportador - Argônio (L min <sup>-1</sup> )	1,1
Vazão de gás auxiliar - Argônio (L min <sup>-1</sup> )	1,8
Modo de leitura	Peak hopping
<i>Dwell time</i> para plantas tratadas com Se (ms)	63
<i>Dwell time</i> para plantas controle (ms)	74
Tempo de integração para cada ponto (ms)	315 (Se) / 370 (controle)
Tempo morto do detector (ns)	60
<i>Sweeps</i>	5

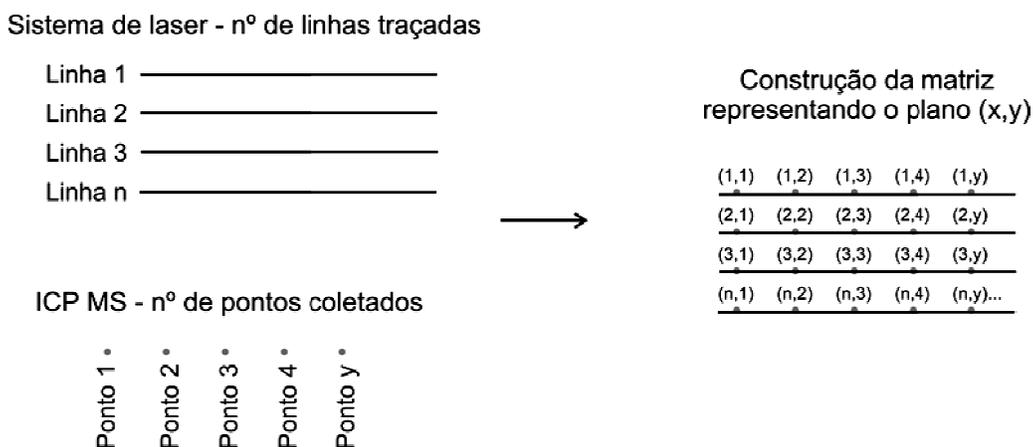
<i>Condições de operação da Cella Dinâmica de Reação</i>					
Elemento	Espécie monitorada	Gás reacional	Vazão de gás (L min <sup>-1</sup> )	RP <sub>q</sub> (V)	RP <sub>a</sub> (V)
Selênio	<sup>80</sup> Se <sup>16</sup> O <sup>+</sup>	Oxigênio	0,70	0,50	0
Enxofre	<sup>32</sup> S <sup>16</sup> O <sup>+</sup>	Oxigênio	0,70	0,50	0
Carbono	<sup>12</sup> C <sup>+</sup>	Oxigênio	0,70	0,50	0

<i>Condições de operação do equipamento de ablação a laser</i>	
Frequência (Hz)	20
Intensidade do laser (%)	80
Energia (mJ); Fluência (J cm <sup>2</sup> )	1,9; 22
Velocidade de varredura (μm s <sup>-1</sup> )	70
Diâmetro do feixe de laser (μm)	110

### 3.6. Obtenção de imagens bidimensionais a partir dos dados coletados

Inicialmente, determinou-se as razões entre  $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+ / ^{12}\text{C}^+$  ou  $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+ / ^{12}\text{C}^+$  correlacionando-as com as concentrações de cada elemento por meio das curvas analíticas de calibração construídas, utilizando-se as pastilhas de materiais de referência certificados dopados com selênio (1575a *Tomato Leaves*) ou enxofre ((CRM 100 – *Minor and trace elements in beech leaves*). Tais dados formaram uma matriz (z) responsável por fornecer a concentração dos elementos distribuído nas folhas.

Posteriormente, para criação das imagens bidimensionais das folhas de girassol empregou-se uma rotina em MATLAB que consistia na criação de um plano com coordenadas (x,y) que é função do número de linhas utilizadas pelo sistema de laser para gerar uma imagem, bem como função do número de pontos coletados pelo ICP-MS, como pode ser observado na ilustração apresentada na Figura 4.3.



**Figura 4.3.** Diagrama esquemático exemplificando a rotina empregada para construção do plano (x,y) que serve para formação das imagens. Neste caso, o número de linhas é determinado de acordo com a resolução desejada, bem como em função do tamanho da folha, enquanto o número de pontos é dado em função da velocidade do laser e do método utilizado pelo ICP-MS, que é função do *dwell time* e número de *sweeps*.

Para cada coordenada gerada irá existir um valor  $z$ . Assim, correlaciona-se a matriz do plano  $(x,y)$  com a matriz de dados  $z$  (intensidade para cada ponto) obtendo-se a imagem com a distribuição de cada elemento na folha.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

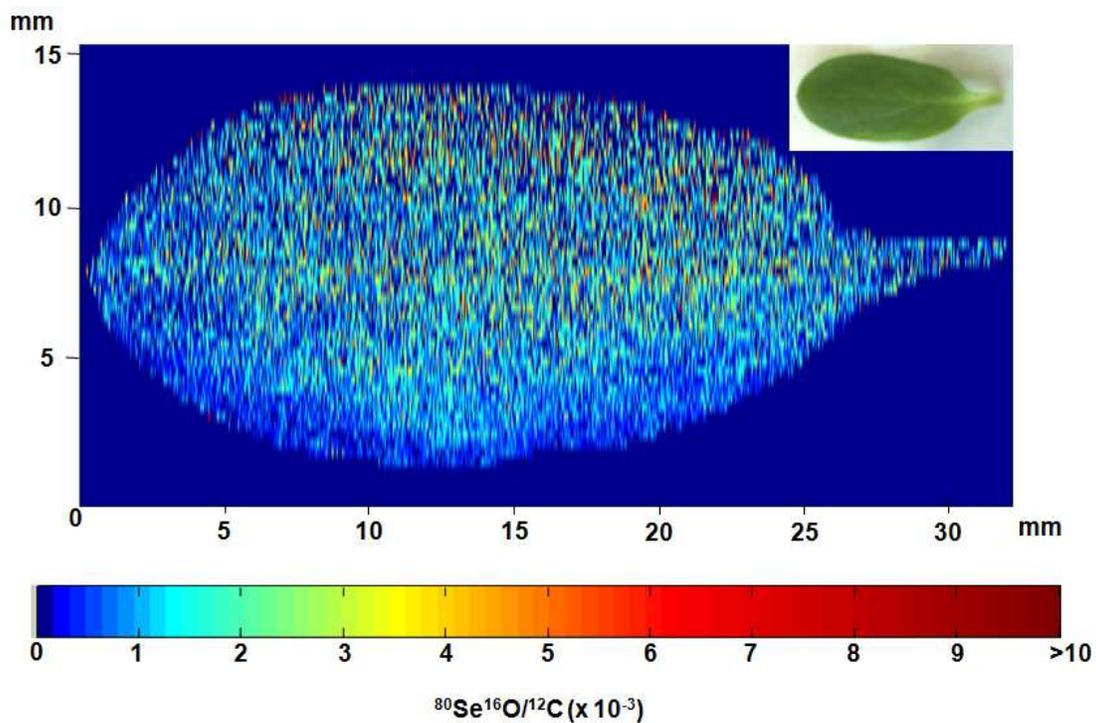
### **4.1. Avaliação da estratégia experimental adotada para monitoramento de enxofre e selênio nas folhas dos girassóis**

Antes de iniciar a validação do método usado para calibração buscou-se avaliar o método empregado no ICP-MS para coleta de dados; a sincronia entre o equipamento de laser e o ICP-MS em termos da velocidade de varredura do laser e a taxa de aquisição de pontos por parte do ICP-MS, bem como avaliar o procedimento criado para tratamento dos dados. Para tanto, realizou-se uma análise qualitativa de cotilédones de girassol (vide Figura 4.4) coletados durante o procedimento de desbaste que foi realizado 7 dias após o plantio, anteriormente ao início da irrigação com selênio, que se deu a partir do oitavo dia de cultivo.

As imagens das Figuras 4.5 e 4.6 apresentam os resultados qualitativos para cotilédones, cujos dados foram coletados e tratados de acordo com as informações apresentadas na Tabela 2.5 e Figura 4.3. Pode-se observar que a resolução de 300  $\mu\text{m}$  entre linhas possibilita boa resolução para formação das imagens e avaliação da distribuição elementar da folha.



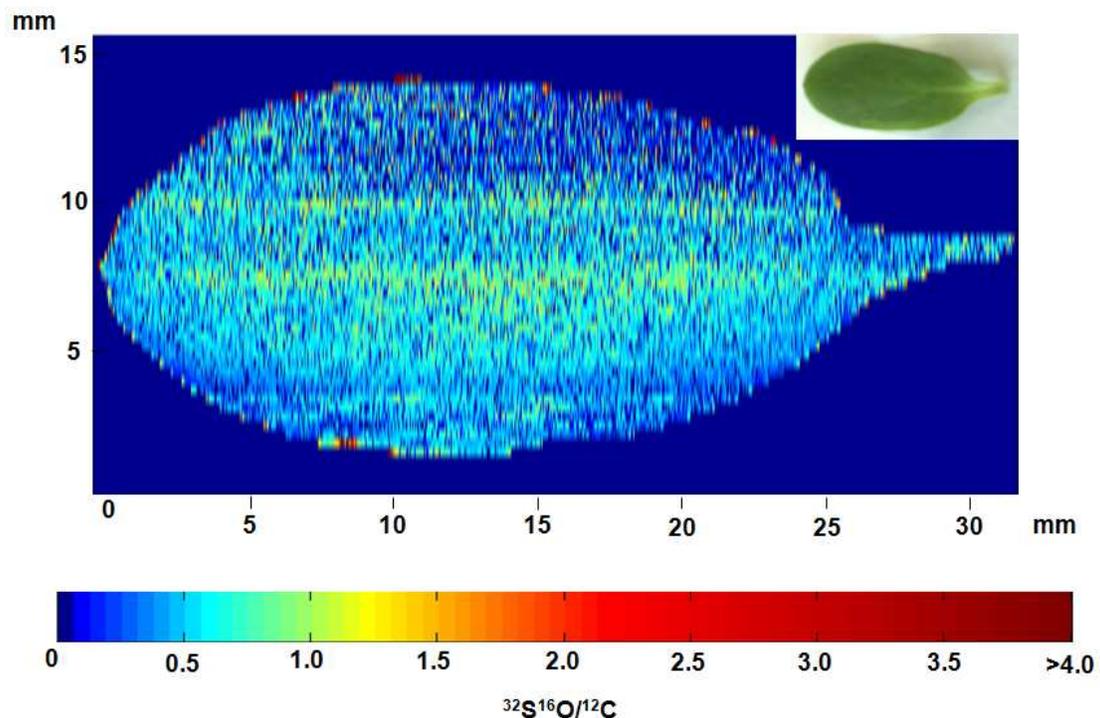
**Figura 4.4.** Imagens dos girassóis no sétimo dia de cultivo. Cada pote apresentava 3 plantas, sendo que apenas uma foi mantida após o procedimento de desbaste. Os cotilédones coletados das plantas removidas foram utilizados para avaliar a metodologia empregada para coleta e tratamento de dados por meio da realização de análises qualitativas.



**Figura 4.5.** Imagem de um cotilédone de girassol exibindo, qualitativamente, a distribuição de selênio no mesmo.

Observa-se na Figura 4.5 que a distribuição de selênio no cotilédone apresenta-se bastante homogênea em todas as suas regiões. Novamente, como se trata de uma análise qualitativa, a intensidade é expressa em função da razão entre o número de contagens para  $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$  e  $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$ . Pode-se, no entanto, observar que a intensidade de íons selênio neste caso apresenta-se bastante reduzida, indicando um baixo teor deste elemento na amostra em questão.

Já para o enxofre é possível observar que este elemento apresentou-se mais concentrado na região central do cotilédone onde se localiza o veio principal da estrutura.

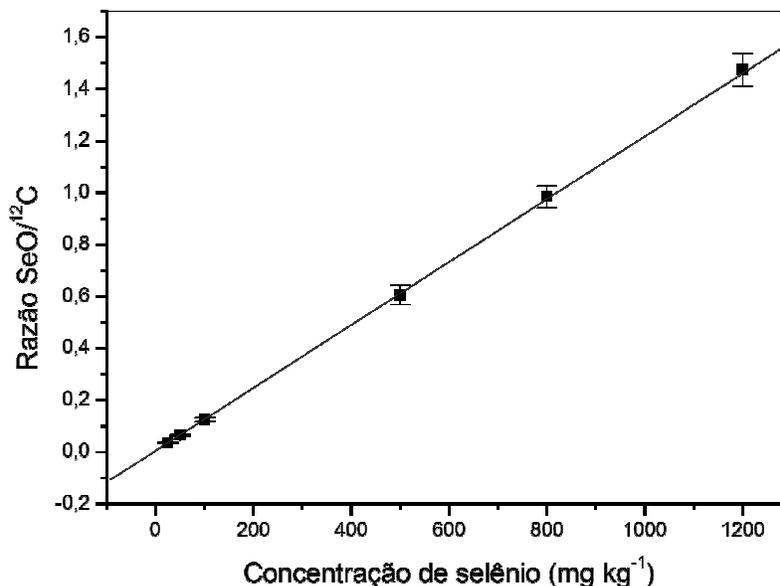


**Figura 4.6.** Imagem de um cotilédone de girassol exibindo, qualitativamente, a distribuição de enxofre no mesmo.

## 4.2. Validação da metodologia analítica empregada para realização das análises quantitativas de selênio e enxofre nas folhas de girassol

Para realização das análises quantitativas buscou-se a validação da metodologia empregada utilizando pastilhas produzidas com materiais de referência certificados.

Para o selênio, empregou-se o material 1575a *Tomato Leaves*, sendo que um exemplo da curva analítica de calibração obtida utilizando as pastilhas preparadas em laboratório que foram dopadas com selênio é apresentado na Figura 4.7. Para esta curva empregou-se pastilhas com concentração de selênio variando entre 25 e 1200 mg kg<sup>-1</sup>.



**Figura 4.7.** Curva de calibração construída utilizando pastilhas produzidas com o material de referência certificado 1575a *Tomato Leaves* com a faixa de concentração compreendida entre 25 e 1200 mg kg<sup>-1</sup>. Neste caso, levou-se em consideração a concentração inicial de selênio no material, conforme indicado na carta de certificação do mesmo ( $0,054 \pm 0,003$  mg kg<sup>-1</sup> de selênio). O coeficiente de correlação linear ( $r$ ) é igual a 0,9999.

Utilizando curvas de calibração construídas com o material 1575a *Tomato Leaves* validou-se o sistema utilizando inicialmente outro material certificado dopado com selênio (CRM 281 – *Trace Elements in Rye Grass*). Neste caso, preparou-se pastilhas dopadas com ca. 800 mg kg<sup>-1</sup> de selênio, na forma de selenito, e determinou-se a concentração deste elemento nas pastilhas empregando a hifenação LA-ICP-MS. Posteriormente as pastilhas foram decompostas empregando decomposição ácida, conforme apresentado no procedimento experimental descrito no item 2.3 e o teor de selênio foi determinado empregando ICP-MS.

De maneira semelhante, o material vegetal de girassol das plantas controle foi dopado com ca. 100 mg kg<sup>-1</sup> de selênio, na forma de selenito, e utilizado para o preparo de pastilhas e posterior análise do teor deste elemento via LA-ICP-MS. Comparou-se os resultados com àqueles obtidos após decomposição ácida das pastilhas seguindo o procedimento descrito no item 2.3.

Por fim, preparou-se pastilhas com o material vegetal dos girassóis tratados com selênio. Neste caso, avaliou-se o teor de selênio nas pastilhas via LA-ICP-MS, decompondo-se, em seguida, as mesmas para análise do teor de selênio via ICP-MS. Os resultados obtidos para as validações mencionadas são descritas na Tabela 4.4.

Por meio dos dados apresentados na Tabela 4.4 observa-se que não há diferença estatística significativa quando se aplica o teste *t* de Student para as diferentes amostras estudadas, considerando um intervalo de confiança de 95%. Assim, observa-se que o emprego do material de referência certificado 1575a *Tomato Leaves* consiste em uma alternativa viável para determinação de selênio nas amostras em questão. Ainda com respeito aos resultados apresentados na Tabela 4.4, observa-se que as estimativas dos desvios padrão obtidas quando se trabalha com o sistema LA-ICP-MS são superiores àquelas encontradas para as determinações realizadas após decomposição ácida do material vegetal e posterior determinação via ICP-MS. Este resultado já era esperado, seguindo a tendência reportada na literatura para análise de outros elementos em matrizes

vegetais via LA-ICP-MS [6], visto que com a análise das pastilhas preparadas em laboratório não se tem homogeneidade em nível molecular como em uma solução.

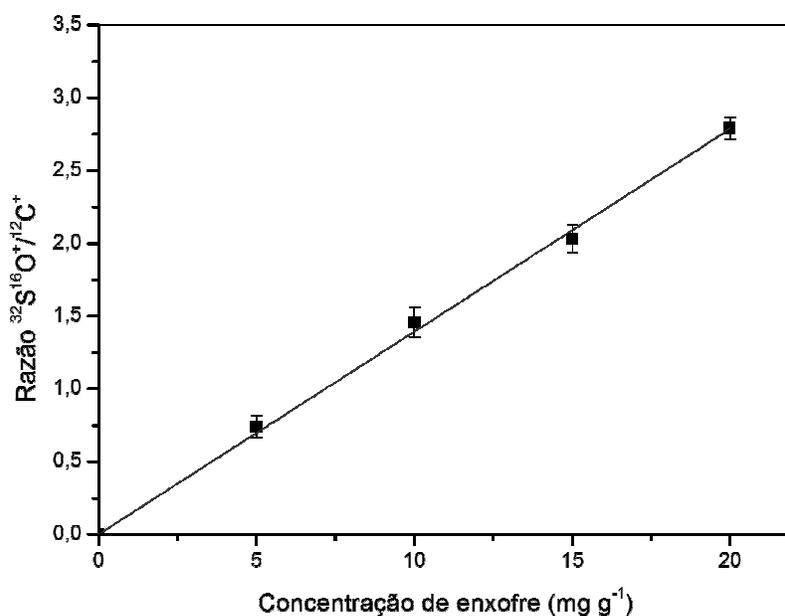
Desta forma, a questão do preparo das pastilhas dopadas com material de referência certificado deve ser tratada com bastante atenção. Para obtenção de curvas analíticas de calibração com perfil semelhante àquele apresentado na Figura 4.7, deve-se buscar homogeneizar ao máximo o material depois de dopá-lo com o elemento de interesse. Após diversos testes, observou-se que um procedimento que fornecia bons resultados consistia em dopar *ca.* 200 mg de material de referência certificado com a massa do elemento em questão (nesse caso selênio) contida em um volume de 500  $\mu$ L e homogeneizar o material durante *ca.* 10 min. Após este período o mesmo era mantido armazenado por 2 dias para, então, proceder à confecção da pastilha. Vale ressaltar que no momento do preparo da pastilha o material era submetido à nova homogeneização, empregando, agora, um almofariz e pistilo de ágata.

**Tabela 4.4.** Resultados obtidos na validação da metodologia para determinação quantitativa de selênio via LA-ICP-MS. Neste caso, empregou-se o material certificado de referência 1575a *Tomato Leaves* para construção da curva analítica de calibração. Os valores apresentados nesta tabela representam a média e a estimativa do desvio padrão para as medidas obtidas (n = 3).

	Conc. Adicionada (mg/kg)	Conc. Digerido (mg/kg)	Conc. LA-ICP-MS (mg/kg)
Pastilhas Material CRM 281	800	865 $\pm$ 16	886 $\pm$ 26
Pastilhas girassol grupo selênio	0	703 $\pm$ 12	707 $\pm$ 36
Pastilhas girassol grupo controle	100	97 $\pm$ 9	121 $\pm$ 15

Para validação da metodologia para análise quantitativa de enxofre, construiu-se curvas de calibração analítica empregando o material de referência

certificado CRM 100 – *Minor and trace elements in beech leaves*. A curva analítica apresentada na Figura 4.8 exibe um perfil típico obtido após a análise via LA-ICP-MS do material de referência certificado dopado com enxofre, com concentração variando entre 5 mg g<sup>-1</sup> e 20 mg g<sup>-1</sup>.



**Figura 4.8.** Curva de calibração construída utilizando pastilhas produzidas com o material de referência certificado CRM 100 – *Minor and trace elements in beech leaves* com a faixa de concentração compreendida entre 5 e 20 mg g<sup>-1</sup>. Neste caso, levou-se em consideração a concentração inicial de enxofre no material, conforme indicado na carta de certificação do mesmo (2,69 ± 0,04 mg g<sup>-1</sup> de enxofre). O coeficiente de correlação linear (r) é igual a 0,9992.

Inicialmente, determinou-se o teor de enxofre no material de referência certificado CRM 100 – *Minor and trace elements in beech leaves* empregando um procedimento de adição de padrão. Determinou-se, também, o teor de enxofre em um material de referência 1575a – *Tomato Leaves* utilizando a curva analítica construída com o material CRM 100. Por fim, o teor de enxofre também foi

determinado em folhas de girassol do grupo de plantas controle. A Tabela 4.5 apresenta os dados obtidos para validação do enxofre.

**Tabela 4.5.** Resultados obtidos na validação da metodologia para determinação quantitativa de enxofre via LA-ICP-MS. Neste caso, empregou-se o material certificado de referência CRM 100 – *Minor and trace elements in beech leaves* para construção da curva analítica de calibração. Os valores apresentados nesta tabela representam a média e a estimativa do desvio padrão para as medidas obtidas (n = 3).

	Valor Certificado (mg g <sup>-1</sup> )	Conc. Digerido (mg g <sup>-1</sup> )	Conc. LA-ICP- MS (mg g <sup>-1</sup> )
Adição de padrão material CRM 100	2,69 ± 0,04	-	2,7 ± 0,1
Pastilhas Material 1575a	0,96*	-	0,99 ± 0,2*
Pastilhas girassol grupo controle	-	7,6 ± 0,2	6,8 ± 0,6

\* (expresso em % - Material de referência para enxofre)

Pode-se observar que, de maneira semelhante ao selênio, a validação possibilitou obtenção de resultados que não podem ser considerados estatisticamente diferentes quando se aplica o teste *t* de Student com nível de confiança de 95%. No caso da análise das pastilhas do material 1575a, este consiste em um material de referência para enxofre. Desta forma, a incerteza na determinação não é apresentada na carta de certificação que acompanha o material.

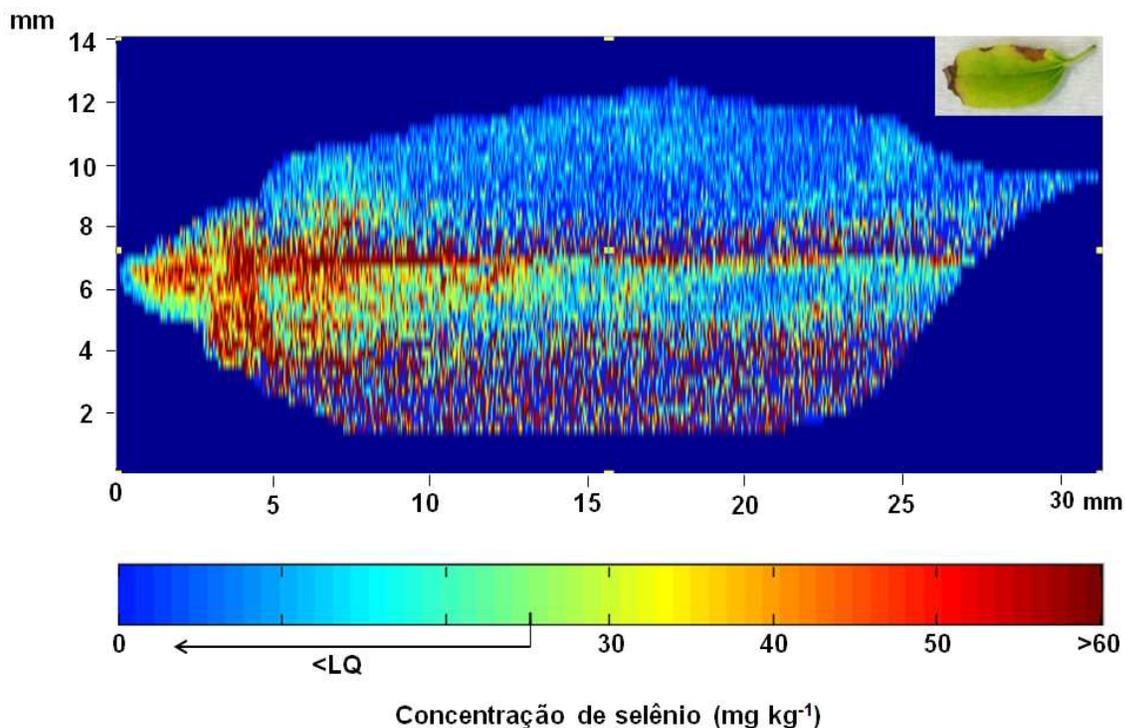
Novamente, como esperado, a homogeneização do material após realizar a adição de padrão consistiu em um desafio no que se refere à adição de enxofre de maneira homogênea nas pastilhas. Assim, é possível observar, neste caso, maiores valores para a estimativa do desvio padrão para as amostras determinadas via LA-ICP-MS.

### **4.3. Análise quantitativa de selênio e enxofre nas folhas dos girassóis**

Após validação da metodologia analítica empregada para calibração, realizou-se a análise quantitativa de selênio e enxofre nas folhas de girassol. As imagens apresentadas nas Figuras 4.9 e 4.10 mostram a distribuição de selênio e enxofre para uma planta tratada com selênio, obtida no 29º dia de cultivo, após a adição de 106 mg de selênio ao solo. Observa-se que, neste caso, a folha analisada apresentava a ponta danificada devido aos danos provocados pelo excesso de selênio adicionado ao substrato. Na imagem da Figura 4.9, observa-se que a planta concentra o selênio principalmente na ponta da folha em níveis muitos elevados, que em algumas regiões superam  $60 \text{ mg kg}^{-1}$ . É importante ressaltar que o primeiro ponto da curva analítica utilizada para calibração do sistema consistia no ponto de  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  de selênio.

Embora os cálculos para os limites de detecção e quantificação indiquem ser possível a quantificação de menores concentrações de selênio, para manter o rigor analítico, considerou-se, para fins quantitativos, valores acima deste ponto. Abaixo de  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  o número de contagens para o equipamento de ICP-MS apresenta-se próximo daquele obtido para o branco analítico (vale ressaltar que foi possível detectar a presença de selênio quando se empregou padrões contendo  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  de selênio). No entanto, neste caso, ligeiras variações no foco do laser durante a varredura poderiam reduzir a sensibilidade devido à ocorrência de variações (diminuição) na quantidade de material ablado e introduzido no ICP-MS, conduzindo a reduções na sensibilidade.

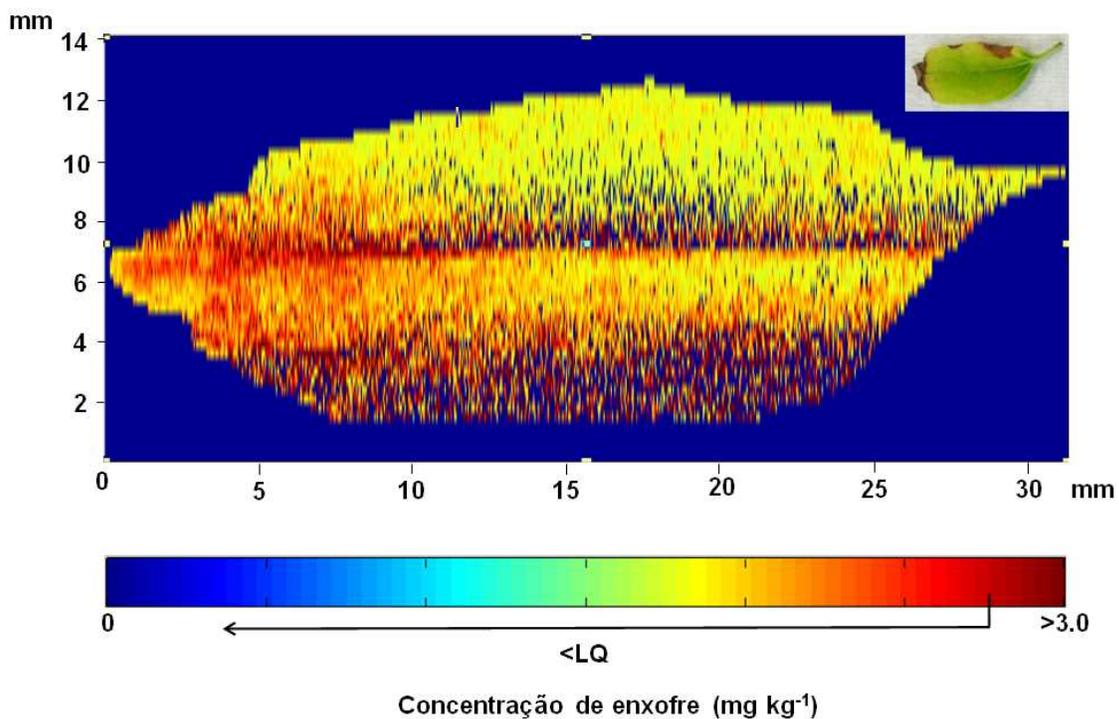
Existem trabalhos focando na quantificação elementar direta em folhas ou tecidos vegetais [2, 6]. No entanto, os mesmos exploram o estudo de macronutrientes ou elementos presentes como constituintes majoritários em um determinado tecido. Ainda nestes trabalhos, os autores mencionam a redução nos detalhes das imagens obtidas conforme a concentração do elemento analisado. Assim, os resultados obtidos neste estudo podem ser considerados satisfatórios, levando em conta que foi possível realizar uma análise quantitativa empregando uma metodologia inédita, com a obtenção de uma imagem via LA-ICP-MS, para um micronutriente essencial para a planta.



**Figura 4.9.** Distribuição de selênio observada em uma folha de girassol coletada ao 29º dia de cultivo após a adição de 106 mg de selênio ao substrato. A curva de calibração foi construída no intervalo de concentração entre 25 e 800  $\text{mg kg}^{-1}$ . Na parte superior direita da figura pode-se observar uma imagem da folha analisada.

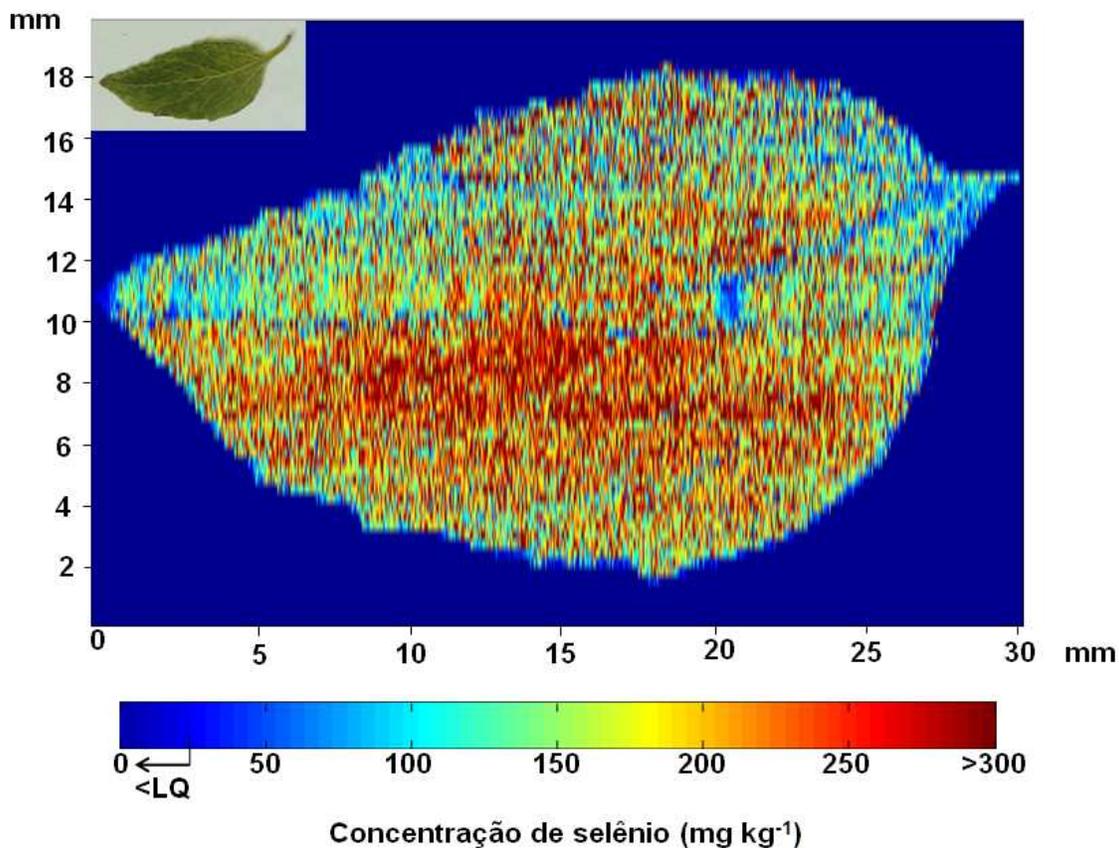
A Figura 4.10 apresenta a distribuição de enxofre para a mesma folha. De maneira semelhante ao selênio, observa-se que o enxofre também se concentra

em níveis elevados na ponta da folha, basicamente na mesma região em que se localiza o excesso de selênio. Neste caso, a quantificação para enxofre é possível apenas a partir de  $2,7 \text{ mg g}^{-1}$  visto que esta é a concentração de enxofre no material de referência certificado CRM 100 – *Minor and trace elements in beech leaves*. Assim, não é possível construir uma curva de calibração para menores concentrações de enxofre. Este fator consiste em uma limitação esperada para a quantificação, uma vez que não se consegue obter um material de referência certificado de matriz vegetal que não apresente enxofre em sua constituição, ou que apresente níveis de enxofre muito abaixo daqueles encontrados em outras plantas.



**Figura 4.10.** Distribuição de enxofre observada em uma folha de girassol coletada ao 29º dia de cultivo após a adição de 106 mg de selênio ao substrato. A curva de calibração foi construída no intervalo de concentração entre  $2,7$  e  $20 \text{ mg g}^{-1}$ . Na parte superior direita da figura pode-se observar uma imagem da folha analisada.

Avaliou-se a distribuição de selênio e enxofre ao longo do tempo, utilizando, agora, uma folha coletada ao 45º dia de cultivo após a adição de 174 mg de selênio no substrato. A Figura 4.11 exibe a distribuição de selênio nesta folha. Pode-se observar que, diferente da folha apresentada na Figura 4.9, neste caso ocorre uma distribuição generalizada de selênio em todas as suas regiões.

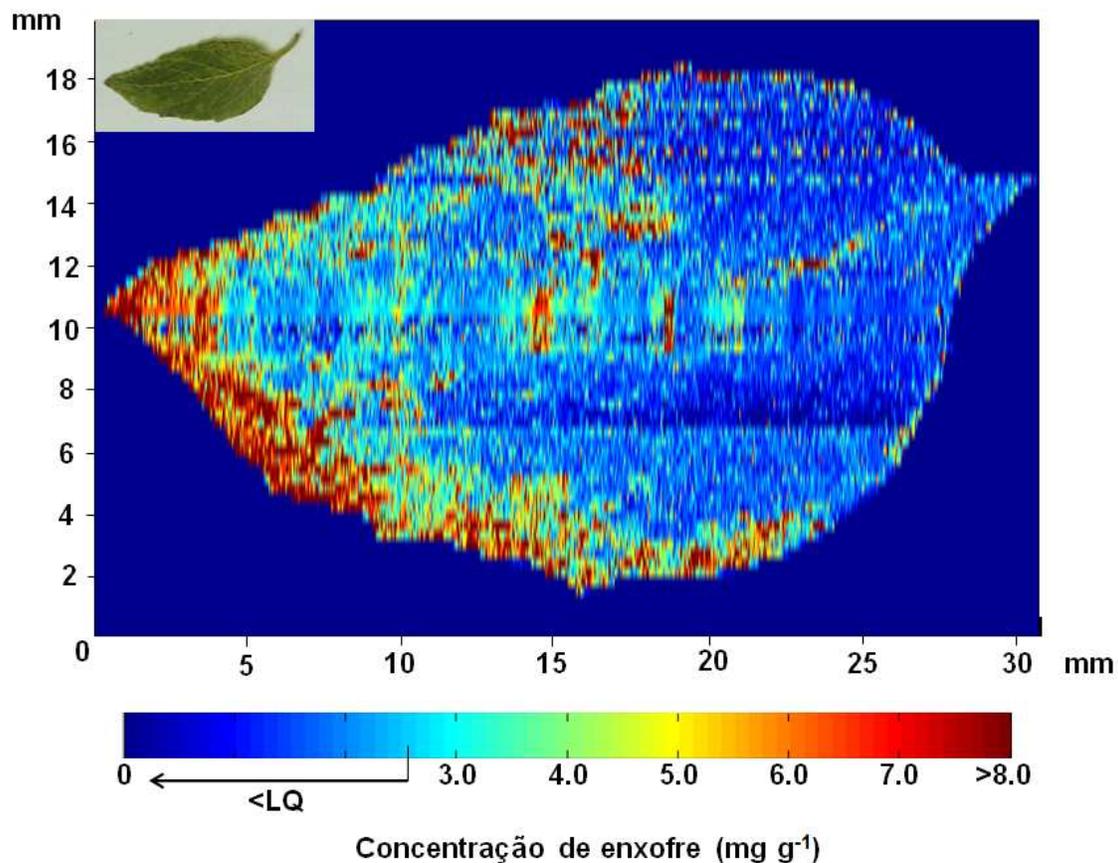


**Figura 4.11.** Distribuição de selênio observada em uma folha de girassol coletada ao 45º dia de cultivo após a adição de 174 mg de selênio ao substrato. A curva de calibração foi construída no intervalo de concentração entre 25 e 1200 mg kg<sup>-1</sup>. Na parte superior esquerda da figura pode-se observar uma imagem da folha analisada.

Observa-se também que o teor de selênio nesta folha atinge, em algumas regiões, valores superiores a 300 mg kg<sup>-1</sup>, superando em ca. 5 vezes os teores máximos observados na folha coletada com 29 dias de cultivo. O resultado

evidência que a adição diária de selênio ao substrato bem como a possibilidade de translocação faz com que os teores de selênio na folha elevem-se de maneira significativa.

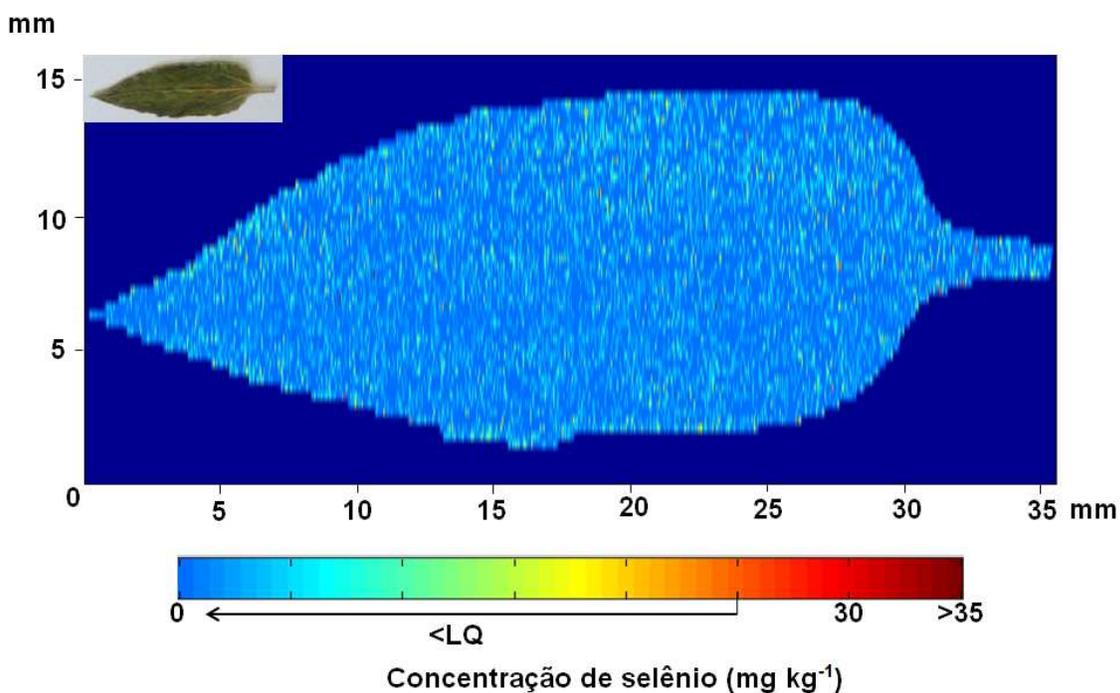
Um aumento nos teores de enxofre encontrados nesta folha também pode ser observado na Figura 4.12. Neste caso, quantificou-se em algumas regiões, valores superiores a  $8,0 \text{ mg g}^{-1}$  deste elemento. No entanto, diferente do selênio, o enxofre concentra-se principalmente nas extremidades da folha. De modo geral, nas demais das regiões, os teores de enxofre apresentam-se semelhantes aqueles observados na folha coletada com 29 dias.



**Figura 4.12.** Distribuição de enxofre observada em uma folha de girassol coletada ao 45º dia de cultivo após a adição de 174 mg de selênio ao substrato. A curva de calibração foi construída no intervalo de concentração entre 2,7 e  $20 \text{ mg g}^{-1}$ . Na parte superior esquerda da figura pode-se observar uma imagem da folha analisada.

Para fins comparativos, avaliou-se, também, folhas de plantas do grupo controle. Neste caso, a folha apresentada foi coletada ao 50º dia de cultivo.

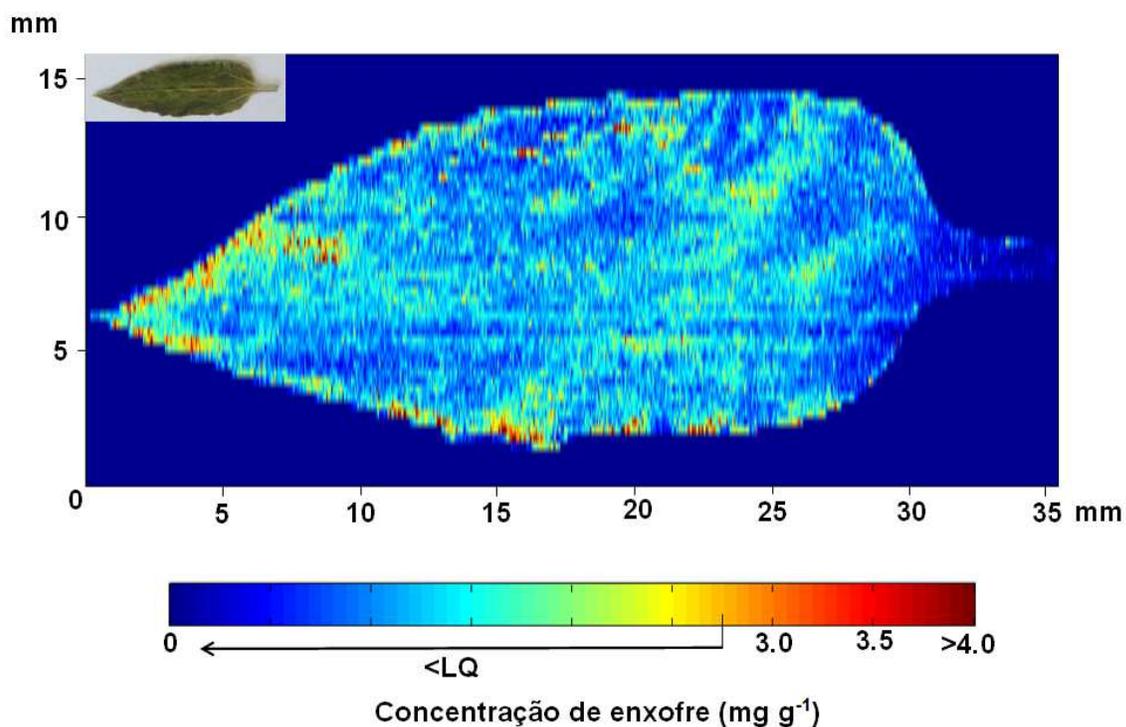
Na Figura 4.13 observa-se a distribuição de selênio nesta folha. Como esperado, os teores deste elemento apresentam-se abaixo do primeiro ponto da curva analítica construída para quantificação ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$ ), confirmando os resultados obtidos anteriormente [19, 20] e apresentados segundo capítulo desta Tese, onde a concentração de selênio nas plantas do grupo controle apresenta-se em níveis adequados para o que se espera de um micronutriente em uma planta.



**Figura 4.13.** Distribuição de selênio observada em uma folha de girassol do grupo controle coletada ao 50º dia de cultivo. A curva de calibração foi construída no intervalo de concentração entre  $25$  e  $800 \text{ mg kg}^{-1}$ . Na parte superior esquerda da figura pode-se observar uma imagem da folha analisada.

Pode-se também observar que o teor de enxofre nas plantas controle apresenta níveis abaixo daqueles encontrados para as plantas tratadas com selênio, como pode ser observado na Figura 4.14.

Neste caso, observa-se que a concentração deste elemento situa-se na maior parte da folha abaixo do primeiro ponto da curva analítica ( $2,7 \text{ mg g}^{-1}$ ) ficando próximo de *ca.*  $1,5 \text{ mg g}^{-1}$  para este elemento. Neste caso, o teor de enxofre obtido é próximo daquele encontrado nos estudos anteriores, apresentados no segundo capítulo desta Tese. Os níveis encontrados também são próximos daqueles reportados em folhas de outras espécies, bem como próximo daquele informado no material de referência certificado CRM 100 – *Minor and trace elements in beech leaves* que foi utilizado para construção da curva analítica.



**Figura 4.14.** Distribuição de enxofre observada em uma folha de girassol do grupo controle coletada ao 50º dia de cultivo. A curva de calibração foi construída no intervalo de concentração entre  $2,7$  e  $20 \text{ mg g}^{-1}$ . Na parte superior esquerda da figura pode-se observar uma imagem da folha analisada.

## 5. CONCLUSÕES PARCIAIS

O trabalho apresentado neste capítulo evidenciou a possibilidade de realizar a análise direta de selênio e enxofre nas folhas de girassol empregando a hifenação LA-ICP-MS. Em função da ausência de um material de referência certificado para girassol, desenvolveu-se um método para quantificação destes elementos empregando materiais de referência certificados obtidos a partir de outras espécies vegetais.

O procedimento para o preparo das pastilhas dopadas com os elementos a serem quantificados foi otimizado a fim de se produzir um material homogêneo com medidas reprodutíveis. Obteve-se desvios padrão relativos que variaram entre 2 e 15%, o que pode ser considerado um valor satisfatório para análise de um sólido.

Referente à quantificação, uma limitação é encontrada quando se avalia amostras com concentrações de enxofre inferiores àquela presente no material de referência certificado ( $2,69 \text{ mg g}^{-1}$ ). Já para o selênio valores muito próximos do branco analítico limitaram a quantificação e possibilitaram a construção de curvas analíticas para padrões de concentração superiores a  $25 \text{ mg kg}^{-1}$ .

No que tange a análise das folhas via LA-ICP-MS, pôde-se confirmar os dados apresentados nos capítulos anteriores onde o selênio é translocado de maneira eficiente para as folhas das plantas tratadas com este elemento. No entanto, o teor encontrado para este elemento variou de acordo com a idade da planta em questão. Enquanto uma planta com 29 dias de cultivo apresentou o selênio concentrado principalmente na ponta da folha e com concentrações variando tipicamente entre  $30$  e  $60 \text{ mg kg}^{-1}$  nesta região, a concentração em outra folha com 45 dias de cultivo apresentou o selênio distribuído por toda a folha, atingindo concentrações superiores a  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  em algumas regiões.

Para o enxofre, observou-se que a captação deste elemento foi maior nas plantas tratadas com selênio, também confirmando os dados apresentados anteriormente. Para plantas mais novas o enxofre também se concentrou na ponta

da folha, assim como o selênio, mantendo a mesma tendência para folhas com mais tempo de cultivo.

A quantificação em plantas do grupo controle apresentou limitações no que se refere aos baixos teores de selênio e também devido aos teores de enxofre próximos ao valor contido no material de referência certificado, ou seja, próximos do limite de quantificação para o método proposto.

Por fim, pôde-se desenvolver uma metodologia para aquisição e tratamento de dados obtidos a partir do sistema LA-ICP-MS permitindo a obtenção de imagens a partir de amostras sólidas. Neste caso, a aplicação de um padrão interno como, por exemplo, o carbono, foi fundamental para normalização do processo de ablação, corrigindo variações do material introduzido no ICP-MS ao longo do tempo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Becker, J.S.; Matusch, A.; Becker, J.S.; Wu, B.; Palm, C.; Becker, A.J.; Salber, D.; Mass spectrometric imaging (MSI) of metals using advanced BrainMet techniques for biomedical research, *Int. J. Mass Spectrom.*, **2011**, 307, 3-15.
- [2] Becker, J. S.; Zoriy, M.; Matusch, A.; Wu, B.; Salber, D.; Palm, C.; Becker, J. S.; *Bioimaging of metals by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS)*, *Mass Spectrom. Rev.*, **2010**, 29, 156-175.
- [3] Moradi, A. B.; Swoboda, S.; Robinson, B.; Prohaska, T.; Kaestner, A.; Oswald, S. E.; Wenzel, W. W.; Schulin, R.; *Mapping of nickel in root cross-sections of the hyperaccumulator plant *Berkheya coddii* using laser ablation ICP-MS*, *Environ. Exp. Bot.*, **2010**, 69, 24-31.
- [4] Budka, D.; Mesjasz-Przybyłowicz, J.; Tylko, G.; Przybyłowicz, W. J.; *Freeze-substitution methods for Ni localization and quantitative analysis in *Berkheya coddii* leaves by means of PIXE*, *Nucl. Instrum. Meth. B*, **2005**, 231, 338-344.
- [5] Chen, T. H. H.; Kartha, K. K.; Constabel, F.; Gusta, L. V.; *Freezing characteristics of cultured *catharanthus roseus* (L). G. don cells treated with dimethylsulfoxide and sorbitol in relation to cryopreservation*, *Plant Physiol.*, **1984**, 75, 720-725.
- [6] Wu, B.; Zoriy, M.; Chen, Y.; Becker, J. S.; *Imaging of nutrient elements in the leaves of *Elsholtzia splendens* by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS)*, *Talanta*, **2009**, 78, 132-137.
- [7] Hsieh, Y.; Jiang, P.; Yang, B.; Sun, T.; Peng, H.; Wang, C.; *Using laser ablation/inductively coupled plasma mass spectrometry to bioimage multiple*

- elements in mouse tumors after hyperthermia*, Anal. Bioanal. Chem., **2011**, 401, 909-915.
- [8] Prohaska, T.; Stadlbauer, C.; Wimmer, R.; Stingeder, G.; Latkoczy, C.; Hoffmann, E.; Stephanowitz, H.; *Investigation of element variability in tree rings of young Norway spruce by laser-ablation-ICPMS*, Sci. Total Environ., **1998**, 219, 29-39.
- [9] Meharg, A. A.; Lombi, E.; Williams, P. N.; Scheckel, K. G.; Feldmann, J.; Raab, A.; Zhu, Y.; Islam, R.; *Speciation and localization of arsenic in white and brown rice grains*, Environ. Sci. Technol., **2008**, 42, 1051-1057.
- [10] Wu, B.; Chem, Y.; Becker, J. S.; *Study of essential element accumulation in the leaves of a Cu-tolerant plant Elsholtzia splendens after Cu treatment by imaging laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS)*, Anal. Chim. Acta, **2009**, 633, 165-172.
- [11] Sekaran N. C.; *Laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry for 2D mapping of trace elements in soft tissues*, Curr. Sci., **2006**, 90, 221-225.
- [12] Hanć, A.; Barałkiewicz, D.; Piechala, A.; Tomaszewska, B.; Wagner, B.; Bulska, E.; *An analysis of long-distance root to leaf transport of lead in Pisum sativum plants by laser ablation-ICP-MS*, Intern. J. Environ. Anal. Chem., **2009**, 89, 651-659.
- [13] Careri, M.; Mangia, A.; *Trends in analytical atomic and molecular mass spectrometry in biology and the life sciences*, Anal. Bioanal. Chem., **2011**, 399, 2585-2595.
- [14] Sussulini, A. Kratzin, H.; Jahn, O.; Banzato, C. E. M.; Arruda, M. A. Z.; Becker, J. S.; "Metallomics studies of human blood serum from treated bipolar disorder patients", Anal. Chem., **2010**, 82, 5859-5864.
- [15] Hu, S.; Zhang, S.; Hu, Z.; Xing, Z.; Zhang, X.; *Detection of Multiple Proteins on One Spot by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and Application to Immuno-Microarray with Element-Tagged Antibodies*, Anal. Chem. **2007**, 79, 923-929.
- [16] Tholey, A.; Schaumlöffel, D.; *Metal labeling for quantitative protein and proteome analysis using inductively-coupled plasma mass spectrometry*, Trends Anal. Chem., **2010**, 29, 399-408.
- [17] Schulze, W. X.; Usadel, B.; *Quantitation in mass-spectrometry-based proteomics*, Annu. Rev. Plant. Boil., **2010**, 61, 491-516.
- [18] Rappel, C.; Schaumlöffel, D.; *Absolute peptide quantification by lutetium labeling and nanohplc-icpms with isotope dilution analysis*, Anal. Chem., **2009**, 81, 385-393.
- [19] da Silva, M. A. O.; de Andrade, S. A. L.; Mazzafera, P.; Arruda, M. A. Z.; *Evaluation of sunflower metabolism from zinc and selenium addition to the culture: A comparative metallomic study*, Int. J. Mass Spectrom., **2010**, 307, 55-60.
- [20] da Silva, M. A. O.; Arruda, M. A. Z.; *Identification of selenium in sunflower leaf proteins using a combination of 2D-PAGE and laser ablation ICP-MS*, Microchim. Acta, **2012**, 176, 131-136.

## CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O estudo proposto nesta Tese permitiu compreender com maior clareza a resposta de uma planta mediante a adição ao substrato de selênio ou zinco, durante a irrigação. Embora as plantas tratadas com zinco não tenham apresentado evidências visuais de estresse causado pela adição do metal, o mesmo não pode ser dito para as plantas tratadas com selênio, pois apresentaram durante o cultivo problemas para o bom desenvolvimento.

Pôde-se observar que para as plantas tratadas com selênio os teores deste elemento nas folhas eram superiores àqueles apresentados e, em algumas situações, foram *ca.* 650 vezes superiores ao das plantas controle ou tratadas com zinco, evidenciando uma estratégia que objetiva a eliminação do selênio por meio da transpiração foliar. Ainda, pôde-se notar um aumento na concentração de enxofre, também nas folhas destas plantas, o que indica uma possível incorporação do selênio na estrutura primária das proteínas produzidas após o início da irrigação. Este resultado também sinaliza uma possível síntese de espécies que visam combater os radicais livres formados devido ao estresse causado pela adição do selênio.

Com relação aos demais elementos determinados, não se observou alterações significativas em suas concentrações que justificassem os problemas apresentados pelas plantas tratadas com selênio ao longo do desenvolvimento das mesmas. O mesmo pode ser dito para as plantas tratadas com zinco.

Foram também conduzidos experimentos com foco na detecção de selênio em *spots* de proteínas de folhas separadas previamente por eletroforese em gel de poliacrilamida. Neste caso, o procedimento para separação teve de ser otimizado para permitir uma separação adequada, na ausência de interferentes, que consistiam, principalmente, em compostos fenólicos e pigmentos que são presentes em grandes quantidades em materiais vegetais.

O emprego da hifenação LA-ICP-MS permitiu detectar selênio em *ca.* 10% dos *spots* analisados, reduzindo a possibilidade de contaminação causada ao

longo do preparo de amostras, quando comparado a um procedimento de decomposição via úmida, visto que as etapas analíticas adotadas para o preparo foram reduzidas de maneira significativa. Neste caso, apenas a secagem do gel foi suficiente para permitir a análise da matriz de poliacrilamida no equipamento de laser.

É interessante mencionar que o baixo número de selenoproteínas identificadas pode ser um reflexo do baixo número de metioninas e cisteínas em algumas proteínas. Neste caso, a hifenação empregada pode não ter detectado o selênio devido à necessidade de se obter limites de detecção muito baixos.

O emprego da hifenação LA-ICP-MS também consistiu em uma alternativa interessante para avaliar a distribuição de selênio e enxofre nas folhas das plantas empregando um procedimento que também minimiza as etapas analíticas ao longo do preparo de amostras. Neste caso, a secagem das folhas a 40 °C para redução do teor de água apresentou-se adequada para a obtenção de imagens bidimensionais das mesmas. Uma dificuldade consistiu na validação de uma metodologia analítica para calibração, uma vez que não existe um material certificado de referência para folhas de girassol. O uso dos materiais certificados de referência 1575a – *Tomato Leaves* e CRM – 100 *Minor and trace elements in beech leaves* para construção das curvas analíticas de calibração para selênio e enxofre, respectivamente, apresentaram boa correlação quando utilizados para determinar amostras de girassol dopadas com estes elementos ou de outros materiais certificados de referência. Pôde-se observar que a concentração de selênio na folha cresce ao longo do tempo de cultivo, sendo que o mesmo tende a se distribuir por toda a estrutura da folha. Para o enxofre, entretanto, observou-se que o mesmo se concentra preferencialmente na ponta da folha.

Como expectativas futuras, pode-se buscar avaliar a existência de estresse oxidativo nas plantas tratadas com selênio e buscar identificar espécies sintetizadas pelos girassóis para minimizar a contaminação por selênio, buscando evidências para um segundo mecanismo secundário que poderia estar ocorrendo devido à contaminação.

O emprego de cromatografia líquida também pode fornecer resultados para elucidar ainda mais tais mecanismos. Neste caso, pode-se buscar desenvolver estudos de especificação visando avaliar possíveis moléculas sintetizadas pelas plantas e que contêm selênio. Estudos já iniciados pelo grupo GEPAM revelam que o perfil cromatográfico para plantas do grupo controle e tratadas com selênio é bastante distinto, e evidenciam um aumento na concentração de selenometionina para estas irrigadas com selênio. Para as plantas tratadas com zinco este estudo também seria válido, e poderia revelar quais moléculas ligam este metal e se a concentração das mesmas eleva-se sob condição de estresse.