



LIDIANE RAQUEL VEROLA MATAVELI

**METALÔMICA COMPARATIVA DE SOJA [*GLYCINE MAX* (L.) MERRILL]
TRANSGÊNICA E NÃO-TRANSGÊNICA UTILIZANDO SISTEMA
MULTIDIMENSIONAL DE SEPARAÇÃO**

**Campinas
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

LIDIANE RAQUEL VEROLA MATAVELI

METALÔMICA COMPARATIVA DE SOJA [*GLYCINE MAX* (L.) MERRILL]
TRANSGÊNICA E NÃO-TRANSGÊNICA UTILIZANDO SISTEMA
MULTIDIMENSIONAL DE SEPARAÇÃO

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCO AURÉLIO ZEZZI ARRUDA

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. LJUBICA TASIC

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

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR LIDIANE RAQUEL VEROLA MATAVELI, E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCO AURÉLIO ZEZZI ARRUDA.

Assinatura do orientador

Campinas

2013

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

M413m Mataveli, Lidiane Raquel Verola (1983-).
Metalômica comparativa de soja [Glycine max (L.)
Merrill] transgênica e não-transgênica utilizando sistema
multidimensional de separação / Lidiane Raquel Verola
Mataveli. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Marco Aurélio Zezzi Arruda.
Coorientador: Ljubica Tasic.

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

1. Soja. 2. Metalômica. 3. HPLC-ICP-MS. I. Arruda,
Marco Aurélio Zezzi. II. Tasic, Ljubica. III. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Comparative metallomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds [Glycine max (L.) merrill] using a multidimensional separation system

Palavras-chave em inglês:

Soybean
Metallomics
HPLC-ICP-MS

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Marco Aurélio Zezzi Arruda [Orientador]
Ana Valéria Colnaghi Simionato Cantú
Lauro Tatsuo Kubota
Pedro de Magalhães Padilha
Fernando Barbosa Júnior

Data de defesa: 24/05/2013

Programa de pós-graduação: Química

*Dedico este trabalho aos amigos
Aos que nasceram familiares,
Aos que se tornaram familiares,
E aos que conheci antes de ontem.
Dedico tanto aos que me deixam louca,
Quanto aos que enlouqueço,
Aos que me criticam em tudo,
E aos poucos que aturam minha chatice.
Aos que conhecem o que penso,
E aos que conhecem o que faço.
Aos que passam o dia todo comigo,
E aos que estão todo tempo em mim.
Aos meus amados.
A vocês principalmente dedico.
Este trabalho é a soma de todos vocês,
E se ele não é melhor,
É por falta de memória,
Mas não por falta de amigos.*

(Adaptado da Tese de Giovana F. Lima)

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando a beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

(Isaac Newton)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) por possibilitar a realização dessa Tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela concessão da bolsa de doutorado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda, por todos os ensinamentos, oportunidades e confiança durante a realização deste doutorado.

Ao Prof. Dr. Fábio César Gozzo, por ter aberto seu laboratório para a realização de alguns experimentos desta Tese.

A Deus, por me permitir chegar até aqui, e sempre guiar meus caminhos.

Aos amigos do Grupo de Espectrometria, Preparo de Amostras e Mecanização (GEPAM), que levarei para a vida toda: Elidiane, Gustavo, Eraldo, Ivanilce, Cícero, Rodrigo, Herbert, Silvana, Aline, Alessandra (s), Ana Cristi, Kelly, Eduardo, Adilson, Fabi, Bruna, Daiane, Sara, Javier e Odilon.

Ao Prof. Dr. Ryzard Lobinski, Dra. Joanna Szpunar e Dra. Sandra Mounicou, pela orientação durante o doutorado sanduíche.

Aos amigos do Laboratoire de Chimie Analytique Bio-inorganique et Environnement (LCABIE), por terem feito da minha estadia longe de casa um período muito agradável e cheio de boas lembranças: Vanessa, Georgia, Pamela, Federica, Julek, Pawel, Laurent, Kasia, Veronica, Marvin, Sandra, Ana e Paty.

Às minhas queridas Glaucia e Naty.

Aos meus primos irmãos, e a todos da minha família.

Aos meus pais e irmão pelo amor, compreensão e apoio incondicional em tudo que faço.

Ao companheiro de todas as horas, Marcelo.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Lidiane Raquel Verola Mataveli

Data de nascimento: 18 de março de 1983

Naturalidade: Poços de Caldas/MG

Email: lmataveli@ial.sp.gov.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2008-2013 - Doutorado em Ciências

Universidade Estadual de Campinas

2005-2007 - Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Alfenas

2001-2004 - Graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado e Licenciatura)

Universidade Federal de Alfenas

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Trabalhos publicados

- a) da Silva, E. G.; Mataveli, L. R. V.; Arruda, M. A. Z.. Speciation analysis of selenium in plankton, Brazil nut and human urine samples by HPLC-ICP-MS. *Talanta*, v. 110, p.53-57, 2013.
- b) Mataveli, L. R. V.; Fioramonte, M.; Gozzo, F. C. ; Arruda, M. A. Z. Improving metallomics information related to transgenic and non-transgenic soybean seeds using 2DHPLC-ICP-MS and ESI-MS/MS. *Metallomics*, v. 4, p. 373, 2012.
- c) SILVA, M. A. O.; Mataveli, L. R. V.; Arruda, M. A. Z.. Liquid chromatography for bioseparations: fundamentals, developments and applications. *Brazilian Journal of Analytical Chemistry*, v. 1, p. 234-245, 2011.
- d) Mataveli, L. R. V.; Antunes, N. J. ; Brigagão, M. R. P. L. ; Magalhães, C. S. ; Wisniewski, C.; Luccas, P. O. . Evaluation of a simple and low cost

potentiometric biosensor for pharmaceutical and in vivo adrenaline determination. Biosen. Bioelectron., v. 26, p. 798-802, 2010.

- e) Mataveli, L. R. V.; Pohl, P.; Mounicou, S.; Arruda, M. A. Z.; Szpunar, J.. A comparative study of element concentrations and binding in transgenic and non-transgenic soybean seeds. Metallomics, v. 2, p. 800-805, 2010.

Capítulos de livros publicados

Arruda, M. A. Z. ; Azevedo, R. A.; Barbosa, H. S.; Mataveli, L. R. V.; Oliveira, S. R.; Arruda, S. C. C.; Gratao, P. L.. Comparative studies involving transgenic and non-transgenic soybean: what is going on?. In: Board, James E.. (Org.). A comprehensive survey of international soybean research - genetics, physiology, agronomy and nitrogen relationships. 1ed., 2013, v. 1, p. 583-.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, SP)

Centro de Contaminantes - Núcleo de Contaminantes Inorgânicos

Pesquisador Científico I

2012-atual

RESUMO

METALÔMICA COMPARATIVA DE SOJA [*GLYCINE MAX* (L.) MERRILL] TRANSGÊNICA E NÃO-TRANSGÊNICA UTILIZANDO SISTEMA MULTIDIMENSIONAL DE SEPARAÇÃO

Autora: Lidiane Raquel Verola Mataveli

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda

Co-orientadora: Prof. Dra. Ljubica Tasic

Este trabalho consistiu em estudos de metalômica comparativa de sementes de soja transgênica (T) e não-transgênica (NT). Para tanto, as sementes de soja T e NT foram comparadas, em um primeiro, momento levando-se em conta: concentração total dos elementos, comportamento dos elementos durante extração utilizando-se fracionamento sequencial, e bioacessibilidade dos elementos após procedimento de digestão gastrointestinal simulada (*in vitro*). As análises preliminares foram feitas utilizando-se ICP-MS com analisador de massas quadrupolar, e as análises posteriores utilizando espectrometria de massas de alta resolução com plasma acoplado indutivamente (HR-ICP-MS). Foram determinados 25 elementos em concentrações variando de ng g^{-1} até %. Foi observado que as sementes de soja T e NT exibem diferenças estatisticamente significantes nas concentrações de Cu, Fe e Sr, sendo os dois primeiros apresentando maiores concentrações na semente T, e, o último, com maior concentração nas sementes de soja NT. Estes resultados também se refletiram nos conteúdos desses elementos em extratos aquosos e resíduos obtidos por meio de fracionamento sequencial. Ainda, os experimentos de bioacessibilidade realizados mostraram que as frações bioacessíveis de Cu, Fe, e outros elementos (Mn, S, Zn) contribuíram em maior porcentagem para a concentração total dos elementos nas sementes de soja T do que para as sementes de soja NT.

Posteriormente, foi dada continuidade aos estudos utilizando cromatografia líquida bidimensional *off line* para as amostras de sementes de soja, sendo a

primeira dimensão constituída de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC,) e a segunda dimensão constituída de cromatografia de troca aniônica (AEX). Na primeira dimensão cromatográfica foram identificadas três frações contendo metais por meio da hifenação SEC-ICP-MS: a primeira correspondendo a massas molares entre 38,1 e 181,1 kDa, a segunda correspondendo a massas molares entre 8,2 e 17,2 kDa, e a terceira fração correspondendo a massas molares entre 0,4 e 3,8 kDa. As três frações identificadas foram separadas, liofilizadas, e separadas novamente utilizando a cromatografia de troca aniônica. Foram detectados metais em todas as frações separadas por SEC: três sub-frações da primeira fração, uma sub-fração na segunda fração e três sub-frações na terceira fração. Os eluatos foram coletados, liofilizados, digeridos e levados ao espectrômetro de massas com fonte de ionização por *electrospray* (ESI-MS) para identificação de proteínas. Foram identificadas 33 e, entre elas, duas proteínas previamente relacionadas a metais foram encontradas: seed lipoxygenase 1 e β -conglycinin.

Após a separação na segunda dimensão cromatográfica, as sub-frações resultantes foram liofilizadas e submetidas a uma terceira dimensão de separação, utilizando a eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional (SDS-PAGE). As bandas obtidas por SDS-PAGE foram recortadas e digeridas a fim de analisar os metais presentes nas mesmas, destacando os resultados obtidos para Fe, onde o mesmo foi quantificado nas bandas da sub-fração onde o pico deste elemento foi encontrado nas análises por AEX-ICP-MS. Ainda, as bandas foram digeridas tripticamente a fim de identificar as proteínas presentes, e, novamente, proteínas associadas a metais foram identificadas: chain A lipoxygenase-3 (Soybean) complex with 13(S)-hydroperoxy- 9(Z),11(E)-octadecadienoic acid; beta-amylase [Glycine max]; seed lipoxygenase-1, lipoxygenase [Glycine max], seed lipoxygenase-2 (PISUM SATIVUM) e beta-conglycinin.

ABSTRACT

COMPARATIVE METALLOMICS OF TRANSGENIC AND NON-TRANSGENIC SOYBEAN SEEDS [*Glycine max* (L.) Merrill] USING A MULTIDIMENSIONAL SEPARATION SYSTEM

Author: Lidiane Raquel Verola Mataveli

Advisor: Dr. Marco Aurelio Zezzi Arruda

Co-advisor: Dr. Ljubica Tasic

This work consisted of comparative metallomics studies of transgenic (T) and non-transgenic (NT) soybean seeds. To that end, T and NT seeds were compared at first taking into account: the total concentration of the elements, the elements behavior during extraction using sequential fractionation, and bioaccessibility of the elements after simulated gastrointestinal digestion procedure (*in vitro*). Preliminary analyzes were done using ICP-MS with quadrupole mass analyzer, and the subsequent analysis using high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry, (HR-ICP-MS). 25 elements were determined at concentrations ranging from 1 ng g⁻¹ up to %. It was observed that T and NT soybean seeds exhibit statistically significant differences in the concentrations of Cu, Fe and Sr, the first two having higher concentrations in the T seeds, and the last with the highest concentration in soybeans NT. These results were also reflected in the contents of these elements in aqueous extracts and residues obtained through sequential fractionation. Also, the contributions of bioaccessible fractions of Cu, Fe and other elements (Mn, S, Zn) to the total content of the elements in T soybean seeds were higher than those found in NT soybean seeds.

Subsequently, studies were continued using bidimensional liquid chromatography, the first dimension consisting of size exclusion chromatography (SEC) and the second dimension of anion exchange chromatography (AEX). In the first chromatographic dimension three fractions containing metals were identified using hyphenation SEC-ICP-MS, the first corresponding to molar masses between

38.1 and 181.1 kDa, the second corresponding to molar masses between 8.2 and 17.2 kDa and the third fraction corresponding to molar masses between 0.4 and 3.8 kDa. The three identified fractions were separated and lyophilized, and again separated using anion exchange chromatography (AEX). Metals were found in all the separated fractions by SEC: three sub-fractions of the first fraction, a sub-fraction in the second fraction and three sub-fractions in the third fraction. These peaks were collected, lyophilized, digested and taken to the mass spectrometer for protein identification. 33 proteins were identified, and, among them, two proteins previously related to metals were found: seed lipoxygenase 1 and β -conglycinin. After chromatographic separation in the second dimension, the resultant sub-fractions were lyophilized and subjected to a third separation dimension using one-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). After the separation, the bands were cut out and digested to examine the metals contained therein, highlighting the results obtained for Fe, which was quantified in the bands of the sub-fraction where the peak of the element is found in the analysis by ICP-AEX - MS. Also, the bands were digested triptically to identify the proteins, and once again proteins associated to metals were identified: 3-lipoxygenase A chain (Soybean) complex with 13 (S)-Hydroperoxy-9 (Z), 11 (E)-octadecadienoic acid, beta-amylase [Glycine max]; seed lipoxygenase-1, lipoxygenase [Glycine max] seed lipoxygenase-2 (Pisum sativum) and beta-conglycinin.

Sumário

Lista de abreviaturas e acrônimos	xiv
Lista de Tabelas	xxvii
Lista de Figuras	xxix
INTRODUÇÃO	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	2
CAPÍTULO 1: Efeito da modificação genética na composição elementar das sementes de soja transgênica e não transgênica	5
1. OBJETIVO	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 Soja Roundup Ready®	7
2.2 A importância nutricional da soja	9
2.3. ICP-MS	15
2.4 Espectrometria de massas de alta resolução com plasma acoplado indutivamente (HR-ICP-MS)	16
2.5 HPLC-ICP-MS como ferramenta para estudo metalômicos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Preparo das soluções e limpeza dos materiais	20

3.2 Amostras	20
3.3 Instrumentação	21
3.4 Reagentes, soluções e materiais	22
3.5 Determinações dos elementos totais	23
3.6 Extração sequencial	25
3.7 Teste de bioacessibilidade	25
3.8 Análise utilizando SEC-HR-ICP-MS	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
4.1 Concentrações totais dos elementos	26
4.2 Análises por fracionamento	30
4.3 Análise dos extratos aquosos por SEC-HR-ICP-MS	35
4.4 Bioacessibilidade dos elementos em sementes de soja	42
5. CONCLUSÃO	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
Capítulo 2: estudos metalômicos da semente de soja transgênica e não transgênica utilizando duas dimensões cromatográficas	49
1. OBJETIVOS	51
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	51
2.1 Metalômica	51
2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	53

2.3 Espectrometria de massas para caracterização de proteínas – ionização empregando <i>electrospray</i> (ESI)	55
3. MATERIAIS E MÉTODOS	56
3.1 Preparo de soluções e limpeza de materiais	56
3.2 Amostras	56
3.3 Instrumentação	57
3.4 Reagentes e soluções	58
3.5 Extração das proteínas das sementes de soja	58
3.6 Coleta das frações	58
3.7 Liofilização	59
3.8 Digestão com tripsina	59
3.9 Identificação das proteínas	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	60
4.1 Estudos usando SEC-ICP-MS	60
4.2 Estudos usando AEX-ICP-MS	63
4.3 Identificação das proteínas	72
5. CONCLUSÕES	79
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

Capítulo 3: Utilização de SDS-PAGE como terceira dimensão de separação, quantificação de metais e identificação das proteínas

nas bandas separadas	83
1. OBJETIVOS	85
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	85
2.1 Considerações sobre a eletroforese em gel	85
2.2 Considerações sobre a coloração dos géis	88
2.3 Decomposição das amostras utilizando mini-frascos	90
3. MATERIAIS E MÉTODOS	90
3.1 Preparo de soluções e limpeza de materiais	90
3.2 Determinação de proteínas totais	91
3.3 Preparo das amostras para obtenção dos géis	92
3.4 Preparo dos géis de poliacrilamida	92
3.5 Procedimentos para revelação dos géis	94
3.6 Digestão das bandas para identificação de proteínas	95
3.7 Procedimento de digestão das bandas dos géis em mini-frascos	96
3.8 Identificação das proteínas	98
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	98
4.1 Quantificação de proteínas pelo método de Bradford	98
4.2 Concentração de proteína a ser aplicada no gel de SDS-PAGE corado com nitrato de prata	99

4.3 Géis obtidos para as diferentes sub-frações	101
4.4 Quantificação de metais nas bandas utilizando ICP-MS	109
4.5 Identificação das proteínas presentes nas bandas	112
5. CONCLUSÕES	117
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
7. CONCLUSÕES FINAIS	119

Lista de abreviaturas e acrônimos

2D-PAGE	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, do inglês, <i>Bidimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
AMM	Massa molar alta
BMM	Massa molar baixa
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.
CRM	Material de Referência Certificado, do inglês, <i>Certified Reference Material</i> .
DTT	Ditiotreitol.
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético.
EPSPS	5-enolpiruvilshiquimato 3-fosfatase sintase, do inglês, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase
ESI	Ionização por electrospray, do inglês, <i>Electrospray Ionization</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> .
GE	Eletroforese em gel, do inglês, <i>Gel Electrophoresis</i> .

GEPAM	Grupo de Espectrometria, Preparo de Amostras e Mecanização.
HIC	Cromatografia de interação hidrofóbica, do inglês, <i>Hydrophobic Interaction Chromatography</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HR-ICP-MS	Espectrômetro de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente de alta resolução, do inglês, <i>High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> .
IAA	Iodacetamida
ICP-MS	Espectrômetro de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente, do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> .
ICP OES	Espectrômetro de Emissão Óptica com fonte de plasma acoplado indutivamente, do inglês, <i>Inductively Coupled Optical Emission Spectrometry</i> .
IEX	Cromatografia de troca iônica, do inglês, <i>Ion Exchange Chromatography</i>
MALDI	Ionização / desorção de matriz auxiliada por laser, do inglês, <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i> .
MM	Massa molar
MMM	Massa molar média
MS	Espectrometria de massas.

MS/MS	Espectrometria de massas sequencial.
<i>m/z</i>	Razão massa/carga.
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida, do inglês, <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
pI	Ponto isoelétrico.
RP	Cromatografia de fase reversa, do inglês, <i>Reversed Phase Chromatography</i>
rpm	Rotação por minuto.
SAX	Cromatografia de troca aniônica forte, do inglês, <i>Strong Anion Exchange Chromatography</i>
SCX	Cromatografia de troca catiônica forte, do inglês, <i>Strong Cation Exchange Chromatography</i>
SDS	Dodecilsulfato de sódio.
SEC	Cromatografia de exclusão por tamanho, do inglês, <i>Size Exclusion Chromatography</i>
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
Tris-HCl	Cloreto de 2-Amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol.
UV	Ultravioleta
WAX	Cromatografia de troca aniônica fraca, do inglês, <i>Weak Anion Exchange Chromatography</i>
WCX	Cromatografia de troca catiônica fraca, do inglês, <i>Weak Cation Exchange Chromatography</i>

Lista de Tabelas

Tabela 1.1	Dados de ingestão média (em mg), porcentagem de absorção no trato gastro intestinal e ingestão diária recomendada para adultos (em mg), e problemas devido à deficiência dos referidos minerais [adaptado de 16]	12
Tabela 1.2	Condições de operação do ICP-MS ELAN DRC-e	21
Tabela 1.3	Condições de operação do HR-ICP-MS para introdução de soluções orgânicas (A) e aquosas (B)	22
Tabela 1.4	Programa de decomposição da amostra em forno microondas	24
Tabela 1.5	Resultados para SRM 1549 e 1567a e para as amostras de semente de soja T e NT por HR-ICP-MS, após digestão (valores médios, n=6± desvio padrão)	28
Tabela 1.6	Concentrações de Ca, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, S, Sr e Zn nas frações orgânica, aquosa e nos resíduos, e balanços de massa para sementes de soja T e NT (valores médios, n=6±desvio padrão).	34
Tabela 1.7	Concentração de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, S e Zn nas frações bioacessível, resíduos e recuperação com relação à concentração total para sementes de soja T e NT (valores médios, n=3±desvio padrão).	43
Tabela 2.1	Parâmetros instrumentais	57
Tabela 2.2	Tempo de retenção para os elementos na separação usando SEC-ICP-MS para sementes de soja T e NT	61
Tabela 2.3	Identificação das proteínas presentes nas sub-frações 1.1, 1.2, 1.3, 2, 3.1, 3.2 e 3.3. Todas as proteínas listadas na tabela foram identificadas como sendo proteínas de soja (<i>Glycine max</i>)	73
Tabela 3.1	Composição dos géis concentrador e separador para um volume final de 100 mL de solução	93
Tabela 3.2	Procedimento para revelação dos géis com o kit de coloração de prata	94
Tabela 3.3	Programa utilizado para digestão das bandas protéicas	97

Tabela 3.4	Condições de operação do ICP-MS	97
Tabela 3.5	Concentração das proteínas ($n=3 \pm$ desvio padrão) nas frações separadas por cromatografia de troca iônica	99
Tabela 3.6	Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os elementos quantificados utilizando ICP-MS	110
Tabela 3.7	Concentração estimada de Fe nas sementes de soja T e NT ($n=3 \pm$ desvio padrão)	111
Tabela 3.8	Concentração estimada de Mg nas sementes de soja T e NT ($n=3 \pm$ desvio padrão)	111
Tabela 3.9	Concentração estimada de Zn nas sementes de soja T e NT ($n=3 \pm$ desvio padrão)	112
Tabela 3.10	Proteínas identificadas nas bandas recortadas no gel de eletroforese	114

Lista de Figuras

Figura 1.1	Cadeia de síntese de aminoácidos aromáticos. A CP4 EPSPS não é afetada pelo glifosato, e os aminoácidos aromáticos são produzidos, enquanto que a EPSPS endógena é inibida pelo glifosato, impedindo a formação dos aminoácidos em questão [adaptado de 5].	10
Figura 1.2	Áreas do sistema digestivo humano consideradas importantes para o desenvolvimento de um teste de bioacessibilidade [adaptado de 17]	15
Figura 1.3	Determinação do conteúdo total de Cu (a), Mg (b), Mn (c) e Zn (d) em amostras de semente de soja NT e T	29
Figura 1.4	Intensidades obtidas (em cps) para Al(a), Ca(b), Cu(c), Fe(d), Li(e), Mg(f), Mn(g), P(h), S(i), Ti(j), V(k) e Zn(l) analisados utilizando extrações orgânicas com hexano (h) e hexano:isopropanol 1:1 (h+ip) em sementes de soja transgênica (T) e não transgênica (NT).	33
Figura 1.5	Curva de calibração obtida empregando coluna Superdex 75 para tampão acetato de amônio 100 mmol L ⁻¹ a 0,7 mL min ⁻¹ .	37
Figura 1.6	Perfil cromatográfico obtido para o Ca em sementes de soja T (a) e NT (b), empregando coluna Superdex 75.	38
Figura 1.7	Perfil cromatográfico obtido para o Cu em sementes de soja T (a) e NT (b), empregando coluna Superdex 75.	39
Figura 1.8	Perfil cromatográfico obtido para o Fe em sementes de soja T (a) e NT (b), empregando coluna Superdex 75.	39
Figura 1.9	Perfil cromatográfico obtido para o Mg em sementes de soja T (a) e NT (b), empregando coluna Superdex 75.	40
Figura 1.10	Perfil cromatográfico obtido para o Mn em sementes de soja T (a) e NT (b), empregando coluna Superdex 75.	40
Figura 1.11	Perfil cromatográfico obtido para o P em sementes de soja T (a) e NT (b), empregando coluna Superdex 75.	41
Figura 1.12	Perfil cromatográfico obtido para os em sementes de soja T (a) e NT (b), empregando coluna Superdex 75.	41
Figura 1.13	Perfil cromatográfico obtido para o Zn em sementes de	42

soja T (a) e NT (b), empregando coluna Superdex 75.

Figura 2.1	Cromatogramas de SEC-ICP-MS de sementes de soja T (a) e NT (b). Perfis de absorção no UV a 280 nm (—) e de resposta para o Cu (—). Evidenciando as 3 frações contendo metais encontradas: F1 = 38,1 a 181,1 kDa; F2 = 8,2 a 17,7 kDa e F3 = 0,4 a 3,8 kDa.	61
Figura 2.2	Cromatogramas de IEX-ICP-MS de sementes de soja T (a) e NT (b). Perfis de absorção no UV a 280 nm (—) e de resposta para o Fe (—). Fração da SEC utilizada para injeção na segunda dimensão : 1.	64
Figura 2.3	Cromatogramas de IEX-ICP-MS de sementes de soja T (a) e NT (b). Perfis de absorção no UV a 280 nm (—) e da resposta para o Mg (—). Fração da SEC utilizada para injeção na segunda dimensão : 1.	65
Figura 2.4	Cromatogramas de IEX-ICP-MS de sementes de soja T (a) e NT (b). Perfis de absorção no UV a 280 nm (—) e da resposta para o Mn (—). Fração da SEC utilizada para injeção na segunda dimensão : 1.	66
Figura 2.5	Cromatogramas de IEX-ICP-MS de sementes de soja T (a) e NT (b). Perfis de absorção no UV a 280 nm (—) e da resposta para o Cu (—). Fração da SEC utilizada para injeção na segunda dimensão : 2.	67
Figura 2.6	Cromatogramas de IEX-ICP-MS de sementes de soja T (a) e NT (b). Perfis de absorção no UV a 280 nm (—) e da resposta para o Co (—). Fração da SEC utilizada para injeção na segunda dimensão : 3.	68
Figura 2.7	Cromatogramas de IEX-ICP-MS de sementes de soja T (a) e NT (b). Perfis de absorção no UV a 280 nm (—) e da resposta para o Cu (—). Fração da SEC utilizada para injeção na segunda dimensão : 3.	69
Figura 2.8	Cromatogramas de IEX-ICP-MS de sementes soja T (a) e NT (b). Perfis de absorção no UV a 280 nm (—) e da resposta para o Mg (—). Fração da SEC utilizada para injeção na segunda dimensão : 3.	70
Figura 2.9	Cromatogramas de IEX-ICP-MS de sementes de soja T (a) e NT (b). Perfis de absorção no UV a 280 nm (—) e da resposta para o Mn (—). Fração da SEC utilizada para injeção na segunda dimensão : 3.	71
Figura 2.10	Cromatogramas de IEX-ICP-MS de sementes de soja T (a) e NT (b). Perfis de absorção no UV a 280 nm (—) e da resposta para o Zn (—). Fração da SEC utilizada para injeção na segunda dimensão : 3.	72
Figura 3.1	Curva analítica obtida utilizando-se ASB como padrão. Concentrações entre 2,5 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.	98
Figura 3.2	Mostra as diferentes concentrações de proteínas aplicadas	100

nos poços do gel de eletroforese SDS-PAGE: a – 5 µg, b - 10 µg, c - 20 µg, d- 30 µg, e – 30 µg, com utilização de Amicon® (3kDa) (solução na parte superior do filtro), f - 30 µg, com utilização de Amicon® (3kDa) (solução na parte inferior do filtro). Coloração – prata.

- Figura 3.3 Gel obtido para sub-fração 1.1. O gel da esquerda corresponde à sementes de soja T e o da direita corresponde à sementes de soja NT. O gráfico representa a densidade óptica mostrada pelas bandas do gel. (—) sementes de soja T, (—) sementes de soja NT. Corante = nitrato de prata, MM = massa molar. 102
- Figura 3.4 Gel obtido para sub-fração 1.2. O gel da esquerda corresponde à sementes de soja T e o da direita corresponde à sementes de soja NT. O gráfico representa a densidade óptica mostrada pelas bandas do gel. (—) sementes de soja T, (—) sementes de soja NT. Corante = nitrato de prata, MM = massa molar. 103
- Figura 3.5 Gel obtido para sub-fração 1.3. O gel da esquerda corresponde à sementes de soja T e o da direita corresponde à sementes de soja NT. O gráfico representa a densidade óptica mostrada pelas bandas do gel. (—) sementes de soja T, (—) sementes de soja NT. Corante = nitrato de prata, MM = massa molar. 104
- Figura 3.6 Gel obtido para sub-fração 2. O gel da esquerda corresponde à sementes de soja T e o da direita corresponde à sementes de soja NT. O gráfico representa a densidade óptica mostrada pelas bandas do gel. (—) sementes de soja T, (—) sementes de soja NT. Corante = nitrato de prata, MM = massa molar. 105
- Figura 3.7 Gel obtido para sub-fração 3.1. O gel da esquerda corresponde à sementes de soja T e o da direita corresponde à sementes de soja NT. O gráfico representa a densidade óptica mostrada pelas bandas do gel. (—) sementes de soja T, (—) sementes de soja NT. Corante = nitrato de prata, MM = massa molar. 106
- Figura 3.8 Gel obtido para sub-fração 3.2. O gel da esquerda corresponde à sementes de soja T e o da direita corresponde à sementes de soja NT. O gráfico representa a densidade óptica mostrada pelas bandas do gel. (—) sementes de soja T, (—) sementes de soja NT. Corante = nitrato de prata, MM = massa molar. 107
- Figura 3.9 Gel obtido para sub-fração 3.3. O gel da esquerda corresponde à sementes de soja T e o da direita corresponde à sementes de soja NT. O gráfico representa a densidade

	óptica mostrada pelas bandas do gel. (—) sementes de soja T, (—) sementes de soja NT. Corante = nitrato de prata, MM = massa molar.	108
Figura 3.10	Em vermelho estão em destaque as bandas recortadas para cada uma das sub-frações mencionadas. Para apresentação dos resultados, as bandas foram numeradas em ordem crescente, da maior para a menor massa molar.	109
Figura 3.11	Em vermelho estão em destaque as bandas recortadas para cada uma das sub-frações mencionadas na figura e levadas ao espectrômetro de massas. Para apresentação dos resultados, as bandas foram numeradas em ordem crescente, da maior para a menor massa molar. Coloração = Comassie Blue.	113

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L) Merrill) é um cultivar de grande interesse para a economia mundial, sendo que o valor total dessa cultura em 2011 excedeu 38,9 bilhões de dólares nos Estados Unidos [1]. Representa uma fonte significativa de ácidos graxos e proteínas para nutrição humana e animal. Além dos aspectos nutricionais, o biodiesel obtido a partir da soja tem sido testado como combustível alternativo, já que cerca de 18 a 21% do peso seco da semente é constituído de óleo na forma de triacilglicerol [2,3].

A infestação das culturas de soja com ervas daninhas pode causar prejuízo no índice de produção e na qualidade do produto. Como o consumo de herbicidas tem um alto impacto nos custos de produção [4], as áreas cultivadas com sementes de soja transgênica tolerantes a herbicidas está crescendo rapidamente. As sementes de soja Roundup Ready[®] representam mais da metade das áreas cultivadas com organismos geneticamente modificados no mundo [5]. As culturas Roundup Ready[®] contêm um gene derivado da *Agrobacterium sp* linhagem CP4, que codifica uma enzima tolerante ao glifosato (cp4 EPSP sintase), o que resulta em culturas tolerantes ao glifosato, possibilitando um controle mais efetivo de ervas daninhas pois permite a aplicação pós emergente de herbicidas [4].

Os efeitos da modificação genética são conhecidos por gerarem mudanças no proteoma em geral [5], mas seus efeitos na composição elementar (metaloma) são desconhecidos.

A metalômica (estudo do metaloma) consiste na totalidade de espécies de metais e metalóides em uma célula ou tecido, bem como identidade das espécies, quantidade e localização dos metais [6]. Decifrar um metaloma trará as seguintes informações: (i) como um elemento (metal ou metalóide) é distribuído nos compartimentos celulares de um dado tipo celular; (ii) seu ambiente de coordenação, ou seja, em qual biomolécula é incorporado ou por qual bioligante é complexado, e (iii) a concentração individual das espécies presentes [7].

Desta forma, esta tese teve como objetivo ampliar as informações sobre o metaloma da semente da soja, e sua consequente alteração após processo de

modificação genética, comparando-o entre sementes de soja transgênica (T) e não-transgênica (NT). Ainda, este trabalho buscou desenvolver metodologias a fim de melhorar os resultados obtidos quanto à análise do metaloma das sementes de soja.

Em um primeiro momento, as sementes de soja T e NT foram comparadas levando-se em conta: concentração total dos elementos, comportamento dos elementos durante extração utilizando-se fracionamento sequencial, e bioacessibilidade dos elementos após procedimento de digestão gastrointestinal simulada (*in vitro*). Em seguida, após extração de proteínas, foram realizadas separações utilizando uma primeira dimensão cromatográfica (cromatografia de exclusão por tamanho – SEC) acoplada com um detector elemento-seletivo (espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente – ICP-MS), onde as frações contendo metais foram identificadas e posteriormente coletadas, para que fossem separados novamente em uma segunda dimensão cromatográfica (cromatografia de troca iônica – IEX). Este procedimento foi realizado a fim de melhorar a separação e conseqüentemente as probabilidades de identificação de proteínas associadas a metais. A posterior utilização de SDS-PAGE como terceira dimensão de separação teve também o objetivo de melhorar a qualidade do procedimento de separação para encontrar as proteínas ligadas a metais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] SoyStats, The American Soybean Association, disponível em: <http://www.soystats.com>, acessado em dezembro/2012.
- [2] M. Saz, M. L. Marina. Perfusion reversed-phase high performance liquid [2] chromatography/mass spectrometry analysis of intact soybean proteins for the characterization of soybean cultivars, *J. Sep. Sci.* 2007, **30**, 431-451.
- [3] 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**, 01-07.
- [4] A. G. Gharib, S. G. Mohseni, M. Mohajer, M. Gharib. Bioavailability of essential trace elements in the presence of phytate, fiber and calcium, *Radiochem. Radioanal. Letters* 2006, **207**, 209-215.
- [5] T. Funke, H. Han, M. L. H. Fried, M. Fischer, E. Schonbrunn. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006, **35**, 13010-13015.
- [6] S. Mounicou, J. Szpunar, R. Lobinski. Metallomics: the concept and methodology. *Chem. Soc. Reviews* 2009, **38**, 1119-1138.

[7] J. Szpunar, Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomic,. *Analyst* 2005, **130**, 442-465.

CAPÍTULO 1

EFEITO DA MODIFICAÇÃO GENÉTICA NA COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DAS SEMENTES DE SOJA TRANSGÊNICA E NÃO- TRANSGÊNICA

1. OBJETIVOS

O objetivo principal deste capítulo foi avaliar os efeitos da modificação genética na composição elementar das sementes de soja T e NT. Para tanto, as diferenças nas concentrações de diversos elementos foram obtidas com relação às suas concentrações totais, bem como o fracionamento por meio de extração sequencial, testes de bioacessibilidade, além da distribuição dos elementos entre diversas massas molares em extratos aquosos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica deste capítulo aborda os aspectos referentes à modificação genética, e às propriedades nutricionais da soja. Em seguida, será descrita a técnica de ICP-MS, e a hifenação HPLC-ICP-MS, que foram utilizadas nesta parte da Tese.

2.1 Soja Roundup Ready[®]

Nos últimos anos muitas variedades de soja têm sido desenvolvidas devido à crescente necessidade do aumento de produtividade, com conseqüente diminuição dos custos, facilidade de manejo e menor efeito residual para as culturas seguintes. Essas características promoveram o rápido crescimento da área cultivada, principalmente com a soja Roundup Ready[®] (RR) no mundo, sendo o Brasil destaque entre os principais produtores, ocupando o segundo lugar no mundo, com um rendimento de US\$ 17,1 bilhões na safra 2010/2011 [1]. Cabe destacar, também, que este foi o primeiro organismo geneticamente modificado liberado para produção e comércio no Brasil [2].

Esta variedade de soja foi desenvolvida nos anos 80 com o objetivo de se disponibilizar um material tolerante à ação do herbicida de amplo espectro de ação, o glifosato (N-fosfometil glicina), que inibe a enzima 5-enolpiruvilshiquimato 3-fosfatase sintase – EPSPS [3, 4], envolvida na biossíntese de aminoácidos

aromáticos (Figura 1.1), provocando atraso no desenvolvimento, desbalanço de aminoácidos e consequente morte nas plantas.

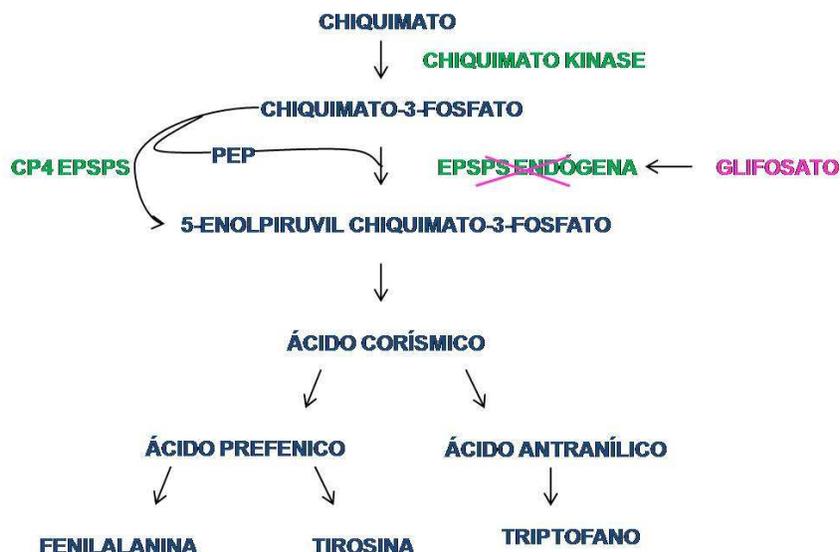


Figura 1.1 – Cadeia de síntese de aminoácidos aromáticos. A CP4 EPSPS não é afetada pelo glifosato, e os aminoácidos aromáticos são produzidos, enquanto que a EPSPS endógena é inibida pelo glifosato, impedindo a formação dos aminoácidos em questão [adaptado da ref. 5].

O gene inserido na planta, responsável pela produção da enzima cp4 EPSPS, que confere a planta a tolerância ao glifosato, é derivado das bactérias de solo *Agrobacterium sp.* cepa CP4. Este gene é inserido na soja utilizando-se a técnica de transformação por aceleração de partículas metálicas recobertas com material genético, denominada biolística ou biobalística. O inserto para transformação contém uma parte do promotor do Vírus do Mosaico da Couve-Flor (CaMV) 35S, seguido do peptídeo de trânsito de cloroplasto da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (CTP EPSPS) de petúnia híbrida, a sequência codificadora CP4 EPSPS e parte da região 3' não traduzida do terminador do gene da nopalina sintase [6].

Dentre as vantagens do uso da soja RR, a diminuição do uso de herbicidas mais tóxicos do que o glifosato em termos de ação e efeito residual, além da facilidade do manejo com esta mudança, estão entre as mais importantes. Como consequência, o agricultor teria, assim, um custo menor por saca de soja devido

ao uso de um só tipo de herbicida, com eficiência maior no controle de plantas invasoras, aumentando a produtividade e diminuindo o efeito residual para o plantio da cultura seguinte.

A introdução de cultivares transgênicos RR gerou grande mudança no mercado mundial de soja, exigindo a construção de um aparato de controle complexo, que fosse capaz de classificar e segregar as produções entre transgênicas e não-transgênicas, já que uma vez geneticamente modificadas, ocorrem alterações no metabolismo e composição da planta [7], que podem gerar efeitos intencionais e efeitos não-intencionais, previsíveis ou não. O perfil protéico pode ser afetado por estas modificações, causando mudanças no proteoma da espécie, o qual constitui a totalidade de proteínas expressas pelo genoma.

Muitos estudos proteômicos utilizando a soja são encontrados na literatura, e envolvem principalmente as duas proteínas de armazenamento mais abundantes nessa cultura, a β -conglucina e a glicina que correspondem a 70-80% das proteínas totais [8]. Especificamente para sementes de soja transgênica e não-transgênica, Brandão *et al.* [9] realizaram experimentos utilizando a mesma variedade desta Tese. Foram avaliadas as diferenças de expressão de diversas proteínas (proteômica comparativa), por meio da análise de imagens de géis de eletroforese bidimensionais (2D PAGE), sendo encontrando um total de 10 proteínas diferencialmente abundantes entre as amostras.

2.2 A importância nutricional da soja

A soja é uma planta leguminosa nativa do leste da Ásia. Muitos pesquisadores têm se empenhado no estudo dessa leguminosa, pois esta possui qualidades nutricionais importantes, como a grande quantidade de proteínas (~40%), além de lipídeos (~20%, principalmente ácidos poliinsaturados) e carboidratos (~35%) [10]. O principal uso da soja está na produção de itens comestíveis, tais com óleo, farinha, formulações infantis, entre outros [11], sendo os produtos derivados da soja fontes importantes, e de baixo custo, de proteínas, minerais, fósforo e vitaminas. Ainda, o valor nutricional da soja não é o único fator responsável por aumentar seu consumo, já que esta desempenha papel

importante na saúde. A ingestão de soja não é apenas recomendada para pessoas com reações alérgicas causadas por leite de origem animal, mas, também, para prevenir doenças cardíacas, obesidade, hipercolesteremia, diabetes, doenças dos rins e osteoporose [12].

Como mencionado acima, a soja é rica em minerais [13], que desempenham papéis importantes para o funcionamento adequado do corpo humano [14]. Muitos minerais são componentes essenciais de enzimas, regulam uma variedade de processos fisiológicos (ex.: manutenção da pressão osmótica, transporte de oxigênio, contração muscular e manutenção da integridade do sistema nervoso central), e são necessários para crescimento e manutenção de tecidos e ossos. São tão importantes que sem eles o organismo não seria capaz de usar os outros constituintes dos alimentos. Podemos destacar entre os principais minerais presentes na soja [15, 16]:

- Ca: é abundante no esqueleto e em alguns tecidos corporais, sendo um nutriente essencial, pois está envolvido na estrutura do sistema muscular, e controla vários processos essenciais, tais como contrações musculares (sistema locomotor, frequência cardíaca), coagulação sanguínea, atividade das células cerebrais e de crescimento. A maior fonte de cálcio é o leite e produtos derivados, seguidos, porém com teores muito menores, por frutas e vegetais, cereais, carnes, peixes e ovos;
- Cu: é componente de inúmeras enzimas oxiredutoras (citocromo oxidase, superóxido dismutase, amino oxidase). No plasma sanguíneo está ligado à ceruloplasmina, que catalisa a oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} , sendo esta reação muito importante, já que a forma oxidada do ferro é transportada pela transferrina para o fígado;
- Fe: está presente, em sua maioria, na hemoglobina (sangue) e mioglobina (tecido muscular). Este metal também está presente em inúmeras enzimas (peroxidase, catalase, hidroxilases e flavinas), portanto é componente essencial da dieta.
- Mg: é constituinte e ativador de inúmeras enzimas, particularmente aquelas associadas à conversão de compostos de fosfato ricos em

energia, e age como estabilizador de membranas plasmáticas, membranas intra-celulares e ácidos nucléicos;

- Mn: está envolvido na formação dos ossos e de enzimas responsáveis pelo metabolismo de aminoácidos, colesterol e carboidratos. Este elemento é o ativador metálico da piruvato carboxilase, e, assim como outros metais divalentes, pode ativar diversas enzimas, como arginase, amino peptidase, alcalino fosfatase, lecitinase ou enolase;
- P: é responsável pela manutenção do pH, estocagem e transferência de energia e síntese de nucleotídeos;
- Zn: é constituinte de diversas enzimas (ex.: álcool desidrogenase, lactato desidrogenase, malato desidrogenase, glutamato desidrogenase, carboxipeptidases A e B, anidrase carbônica), além de ter a capacidade de ativar muitas outras, tais como dipeptidases, alcalino fosfatase, lecitinase, enolase.

Na Tabela 1.1, encontram-se dados sobre ingestão média, ingestão recomendada, porcentagem de absorção, e possíveis problemas causados no organismo pela falta dos minerais mencionados acima. Ressalta-se que os dados da Tabela 1.1 levam em conta somente a concentração total dos minerais.

Tabela 1.1 – Dados de ingestão média (em mg), porcentagem de absorção no trato gastro intestinal e ingestão diária recomendada para adultos (em mg), e problemas devido à deficiência dos referidos minerais [adaptado das referências 14 e 16]

	Ca	Cu	Fe	Mg	Mn	P	Zn
Ingestão diária	960-1220	2,4	14	145-358	5,6-8,0	1760-2730	12-18
Porcentagem média de absorção	10-50	25-60	10-40	20-60	40	> 40	30-70
Ingestão diária recomendada (ª) ou consumo seguro e adequado(b)*	100-1300ª	0,9-1,0ª	8-18ª	280-350ª	1,6 (mulheres) ^b 2,3 (homens) ^b	700-1250ª	8-11ª
Problemas devido à deficiência	Crescimento atrofiado, raquitismo, osteomalácia, osteoporose	Anemia, neutropenia, leucopenia, desmineralização do esqueleto	Anemia, diminuição no transporte de oxigênio e imunidade celular, fraqueza muscular, etc.	No alcoolismo ou doença renal, causa tremores que levam a convulsão	Condrodistrofia, desenvolvimento anormal do osso, dificuldades reprodutivas**	Crescimento atrofiado, raquitismo	Dificuldades na cicatrização, sensibilidade gustativa prejudicada, crescimento e desenvolvimento sexual retardados, nanismo

* Para nutrientes essenciais, onde ainda não há valor de ingestão diária recomendada, são aprovados valores de consumo seguro e adequado.

** Sintomas de deficiência em animais, em humanos ainda existem poucas evidências.

A porcentagem de absorção reportada na Tabela 1.1 tem relação direta com a chamada bioacessibilidade. A identificação e a determinação de espécies individuais de minerais e outros elementos em alimentos é de grande importância. Porém, as diferentes formas químicas dos elementos agem também de maneiras diferentes no curso das reações químicas nos alimentos e podem certamente possuir diferentes disponibilidades biológicas e efeitos [17]. Os testes realizados para verificar a bioacessibilidade dos elementos mimetizam, *in vitro*, a absorção dos elementos de interesse pelo organismo. Neste momento, cabe dizer que definições recentes consideram a bioacessibilidade como a concentração máxima solúvel do elemento-alvo em uma solução gastrointestinal, após centrifugação ou filtração, e a diferenciam da biodisponibilidade, que é considerada a fração dializável do elemento-alvo que pode passar através de uma membrana com tamanho de poro específico em situações de equilíbrio e desequilíbrio [18].

Os métodos utilizados para verificar a bioacessibilidade de um elemento procuram mimetizar os processos mais importantes que ocorrem no trato gastrointestinal, onde são identificadas três áreas distintas, porém relacionadas, do sistema digestivo humano, como mostra a Figura 1.2.

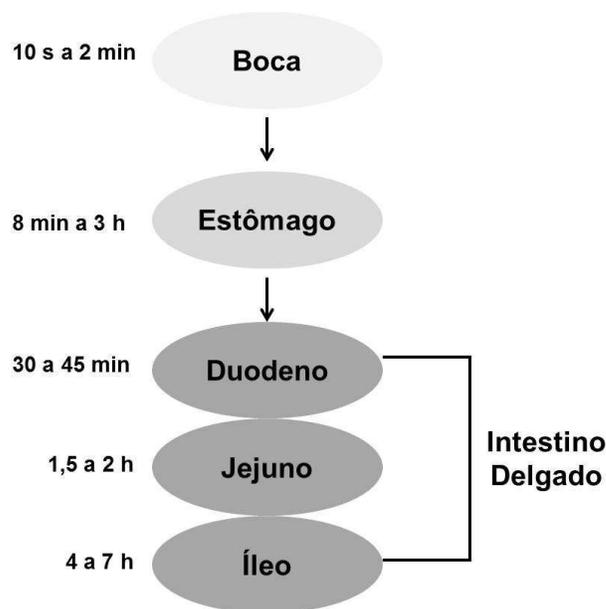


Figura 1.2 – Áreas do sistema digestivo humano consideradas importantes para o desenvolvimento de um teste de bioacessibilidade [adaptado de ref. 17].

Na boca, ocorre o processo de mastigação, permitindo que os pedaços grandes dos alimentos sejam quebrados em fragmentos menores, aumentando a área de superfície. Nos experimentos de bioacessibilidade a simulação do que ocorre na boca é opcional, já que, como pode ser visto na Figura 1.2, o tempo que os alimentos ficam na boca é muito curto [16].

O ambiente ácido do estômago (valores de pH entre 1 e 5) permite a dissolução de óxidos minerais, sulfetos e carbonatos, liberando assim os metais. A presença de pepsina permite a quebra de proteínas, ajudando assim a dissolução dos alimentos. O processo total no estômago pode durar de alguns minutos (tipicamente 8 min) a várias horas (3 h). Nos experimentos de bioacessibilidade, as amostras são submetidas à extração com pepsina em meio ácido por até 3 h [16].

As amostras são sujeitas à digestão no intestino delgado pelos sucos intestinais compostos por enzimas (tripsina, amilase e pancreatina), sais biliares, entre outras substâncias presentes. O intestino delgado é composto de três partes, onde as amostras podem ser mantidas da seguinte maneira: no duodeno entre 30 e 45 min (pH entre 4,0 a 5,5), no jejuno por 1,5 a 2 h (pH entre 5,5 a 7,0) e no íleo por 5 a 7 h (pH entre 7,0 a 7,5). O processo de absorção ocorre principalmente no intestino delgado, onde ocorre a digestão final. Os testes de bioacessibilidade submetem as amostras aos sucos intestinais por até 7 h [16].

A determinação desses elementos químicos nas sementes de soja pode dar acesso às suas qualidades nutricionais. Inúmeros trabalhos foram realizados com o intuito de determinar elementos nutricionalmente importantes utilizando-se espectrometria de absorção atômica [13, 19], espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente [20, 21], e espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente [22]. Abaixo será apresentada a técnica de ICP-MS, utilizada nesta Tese a fim de realizar estudos para determinação dos elementos de interesse, sendo esses dados reportados pela primeira vez na literatura [23] em sementes de soja T e NT, segundo as pesquisas bibliográficas realizadas.

2.3. ICP-MS

Desde os anos 90, a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) tem sido usada para determinação de elementos a baixas concentrações, em favor a outras técnicas de espectrometria atômica. É uma técnica robusta para análise multielementar: em uma única varredura no modo qualitativo de operação é capaz de avaliar a maioria dos elementos da Tabela Periódica, e no modo de operação quantitativo, a precisão e exatidão obtidas são comparáveis às obtidas utilizando-se técnicas monoelementares [24]. Permite alcançar limites de detecção extremamente baixos e fornecer informações isotópicas que possam ser utilizadas para identificação e quantificação de espécies. Além disso, pode ser acoplado com técnicas de separação [25], tais como HPLC, facilmente realizada uma vez que a vazão do sistema cromatográfico é semelhante à vazão de nebulizadores comuns para ICP-MS, como os nebulizadores concêntricos e de fluxo cruzado.

A fonte de excitação desta técnica é um plasma acoplado indutivamente formado por argônio usado para formar íons que são transferidos para uma região de alto vácuo através de uma interface contendo orifícios diminutos. Os íons são focalizados usando lentes iônicas e direcionados para o espectrômetro de massas visando a separação em função da razão m/z [26]. O analisador de razão m/z geralmente utilizado no ICP-MS é um quadrupolo, ideal para análises quantitativas.

Os elementos detectados por ICP-MS incluem aqueles que compõem complexos de coordenação com proteínas maiores e metalotioneínas, assim como selenoproteínas e metais/semimetais ligados a carboidratos. São encontrados vários exemplos na literatura onde o ICP-MS é empregado na detecção e quantificação de íons metálicos ligados a biomoléculas. As metalotioneínas são proteínas ricas em cisteína e possuem uma sequência característica com posições altamente conservadas de resíduos deste aminoácido. Por meio dos átomos de enxofre destes resíduos, as metalotioneínas são capazes de ligar metais como Cd, Zn ou Cu. O ICP-MS foi usado por Huang *et al.* [27] para verificar a indução

das metalotioneínas em carpas comuns (*Cyprinus carpio* L.) quando co-expostas a Hg, Cd e Pb. Os resultados comprovaram que a síntese de metalotioneínas nos órgãos estudados era claramente metal-específica.

Ainda, a identificação e a determinação de espécies minerais e outros elementos importantes em alimentos é de grande importância, seja devido aos valores nutricionais ou toxicidade dos mesmos. Wuilloud *et al.* [28] utilizaram SEC-ICP-MS para estudar a distribuição de Cu, Zn, Ni e Mg em diferentes frações de massa molar em castanhas comestíveis. Foi verificado que estes elementos foram encontrados em maior quantidade nas frações de alta massa molar, considerando a faixa de exclusão da coluna de SEC usada pelos autores, o que indica a possibilidade de que estas espécies estejam ligadas a proteínas. Vale dizer aqui que a maioria das aplicações para identificação e quantificação de metaloproteínas foram desenvolvidas usando ICP-MS acoplado à cromatografia líquida de alta eficiência utilizando exclusão por tamanho (SEC-ICP-MS) como ponto inicial da pesquisa.

Para amostras de farinha de soja, Koplik *et al.* [20] usaram SEC-ICP-MS para verificar a distribuição de P, S, Se e vários metais nas diferentes frações de massa molar. Foi verificado que grande parte do Co, Ni, Cu, Zn e Mo estão ligados a moléculas de baixa massa molar (2-5 kDa), enquanto uma parte do Fe foi encontrada na fração de massa molar média (10-30 kDa). O P foi encontrado, predominantemente, na fração de alta massa molar (180 kDa).

2.4 Espectrometria de massas de alta resolução com plasma acoplado indutivamente (HR-ICP-MS)

O ICP-MS se tornou uma das técnicas para determinação de analitos inorgânicos de maior sucesso, devido ao seu alto poder de detecção e verdadeira capacidade multi elementar. Essas vantagens não impedem porém a ocorrência de interferências espectrais e não-espectrais [29] que podem influenciar nas figuras de mérito analíticas.

As interferências espectrais em ICP-MS podem ser isobáricas ou moleculares, que são geradas pela própria matriz da amostra e/ou pelos gases do

plasma e seus constituintes. Estas podem perturbar ou mesmo obscurecer o verdadeiro sinal analítico, e assim a exatidão da determinação, bem como os limites de detecção dos elementos investigados, podem ser prejudicados [30].

O problema causado por interferências espectrais pode ser superado utilizando-se um ICP-MS equipado com cela de colisão/reação ou, ainda, empregando-se um ICP-MS de alta resolução, equipado com analisador de massa de setor magnético [29].

Os instrumentos equipados com celas de reação e/ou colisão são capazes de remover as interferências, reduzindo a magnitude das sobreposições espectrais e, portanto, melhorar os limites de detecção. Entretanto, são limitados por algumas interferências específicas ou são aplicáveis somente a matrizes ou elementos selecionados, e isto reduz a capacidade multielementar do instrumento [31].

É reconhecido que o método geral para superar limitações geradas por interferências espectrais é a aplicação de alta resolução de massa. Os instrumentos que usam o setor magnético para separação dos íons foram introduzidos no mercado em 1989, sendo que os primeiros instrumentos eram restritos a aplicações onde alta resolução de massa era um pré-requisito, devido à complexidade do instrumento, e, portanto, ao preço. A operação de um espectrômetro em resolução de massa mais alta é uma das melhores estratégias para contornar os problemas causados por interferências, uma vez que permite a separação do isótopo de interesse e das espécies interferentes [30].

Os equipamentos de HR-ICP-MS utilizam um sistema de fendas que gera a alta resolução, sendo os instrumentos comerciais capazes de uma resolução de geralmente 10000. O analisador de setor magnético consiste de um tubo de vôo curvo, localizado entre os polos de um magneto permanente, ou, na prática, de um eletromagneto com força de campo variável. Os íons que são gerados no ICP são acelerados até 10 keV após passar da região de interface (cones) por um alto potencial de extração. Após a aceleração, os íons carregados positivamente no plasma (agora com energia cinética uniforme) são focalizados por meio de uma sequência de lentes de íons antes de passar através de uma fenda estreita de largura ajustável. Após passar pela fenda, os íons são injetados de maneira

perpendicular ao campo magnético e atravessam o campo em diferentes trajetórias circulares de acordo com suas razões m/z . Uma segunda fenda (fenda coletora) posicionada na saída do magneto resulta na seleção de uma massa específica. A diminuição da largura de uma, ou ambas as fendas já mencionadas permitem o aumento da resolução de massa do equipamento [30].

Neste capítulo, a maioria das análises foram realizadas utilizando um HR-ICP-MS.

2.5 HPLC-ICP-MS como ferramenta para estudos metalômicos

Quando se trabalha com metaloproteínas e proteínas metal-ligantes há necessidade de técnicas de alto poder de resolução e detecção após a separação. A escolha da técnica hifenada depende do objetivo da pesquisa, sendo particularmente importante o componente de separação de um sistema acoplado. A hifenação de HPLC ao ICP-MS pode ser facilmente realizada, uma vez que a vazão cromatográfica é semelhante à vazão de nebulizadores comuns para ICP-MS. Entretanto, os eluentes utilizados em HPLC devem ser tolerados pelo plasma e pelo sistema de entrada do espectrômetro de massas. Isso implica em evitar altas concentrações de solventes orgânicos e sais [32]. O teor de sal da fase móvel deve ser mínimo (< 2%).

A cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) é especialmente indicada para a separação de espécies de estabilidade limitada, frequentemente encontradas em matrizes ricas em proteínas. As principais vantagens da SEC são simplicidade de aplicação, compatibilidade da composição da fase móvel com demandas específicas de certas amostras biológicas e possibilidade de estimativa de massa molar das espécies. [22].

A SEC separa macromoléculas de acordo com seu volume hidrodinâmico, determinado pelo raio de Stokes. Resulta na exclusão parcial de analitos que se difundem em poros de tamanho definido, de acordo com seus tamanhos moleculares [33]. Quando uma fase móvel passa pela coluna, partículas com pequeno volume hidrodinâmico percorrem um caminho maior, pois se equilibram nos poros mais frequentemente do que as de maior volume hidrodinâmico, o que

resulta na separação. O volume de eluição é determinado pelo tamanho da macromolécula, que é função da massa molar (MM). Pode-se, portanto, usar este volume para determinar a massa molar aproximada de um composto desconhecido. Para que isso seja feito, deve-se conhecer a relação entre a MM e volume de eluição, que é obtida empiricamente injetando padrões de MM conhecida e medindo seus volumes de eluição [34]. Existem muitas aplicações para SEC, sendo que esta técnica é única no sentido de que se pode usar uma grande gama de fases móveis e também eluir as moléculas no seu estado nativo, possibilitando experimentação posterior. É utilizada na separação de proteínas, inclusive de soja [35]. Naquele caso, a SEC foi usada para separar as proteínas de armazenamento, em um passo anterior à SDS-PAGE. O método é considerado de baixa resolução, pois não discerne moléculas de volumes hidrodinâmicos parecidos [36]. Entretanto, para amostras relativamente puras, a resolução da SEC pode ser suficiente para promover a separação das proteínas de impurezas de baixa massa molar antes da detecção.

Apesar de ser considerada de baixa resolução, este tipo de separação se mostra muito útil para o estudo da distribuição de elementos em diferentes frações de massa molar. O acoplamento SEC-ICP-MS, mesmo apresentando algumas limitações, tem sido aceito como técnica hifenada útil em estudos de especiação para estimar a associação de elementos a compostos presentes na amostra. Esses estudos são considerados o ponto inicial para uma avaliação mais profunda da natureza das espécies encontradas e estudos subsequentes [28].

A SEC é geralmente aplicada como primeiro método de separação das frações contendo metalobiomoléculas de interesse, seguida por outra etapa de separação com detecção elemento específica, espécie específica, ou, até mesmo, identificação por espectrometria de massas. Este constitui um sistema de cromatografia líquida multidimensional, uma ferramenta eficiente e um procedimento alternativo para os métodos clássicos baseados em HPLC unidimensional [37].

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparo das soluções e limpeza dos materiais

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

Antes do uso, todos os frascos plásticos, vidrarias e demais materiais de laboratório foram lavados e colocados em banho de ácido HNO_3 10% v/v (Merck, Darmstadt, Alemanha) por no mínimo 12 horas. Posteriormente, foram lavados utilizando água deionizada e secos em estufa, exceto materiais volumétricos, secos à temperatura ambiente.

3.2 Amostras

As sementes de soja T utilizadas neste trabalho são as denominadas Roundup Ready[®], obtida pelo processo de modificação baseado na inserção do gene cp4 EPSPS da cepa cp4 de *Agrobacterium sp.*, que proporcionou a expressão da proteína cp4 EPSPS (EC 2.5.1.19), conferindo à soja tolerância ao glifosato. As sementes de soja NT não sofreram nenhum processo de modificação genética. As amostras foram cedidas pela empresa Monsanto para a Profa. Dra. Sui Mui Tsai, professora do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, que por sua vez forneceu as amostras para o laboratório do Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda. Aproximadamente 50 sementes de soja de cada variedade (T e NT) foram maceradas e utilizadas nas análises realizadas.

Por este trabalho incluir organismos geneticamente modificados, o número de registro do Certificado de Qualidade em Biossegurança é informado: 240/2007, publicado em 24 de julho de 2007.

3.3 Instrumentação

Para estudos preliminares (realizados no Brasil), um ICP-MS quadrupolar (modelo ELAN[®] DRC-e, PerkinElmer, Shelton, Estados Unidos) foi utilizado para quantificação de elementos totais nas amostras.

As condições de operação do ICP-MS estão resumidas na Tabela 1.2. Essas condições foram verificadas diariamente usando padrão aquoso multi elementar (PerkinElmer, Shelton, Estados Unidos) contendo Mg, Al, Cr, Mn, Cu, Rh, Cd, In, Ce, Pb, Th, U e Ba (na concentração de 1 µg L⁻¹ para cada elemento, exceto para Ba cuja concentração era igual a 10 µg L⁻¹).

Tabela 1.2 – Condições de operação do ICP-MS ELAN DRC-e

ICP-MS	
Condições do plasma	
Potência de radiofrequência	1200 W
Vazão do gás nebulizador	0,91 L min ⁻¹
Vazão do gás do plasma	15 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	1,2 L min ⁻¹
Nebulizador	Meinhard
Câmara de nebulização	Ciclônica
Parâmetros de aquisição de dados	
Modo Quantitativo	
Isótopos monitorados	²⁴ Mg, ⁵⁵ Mn, ⁶² Cu, ⁶⁶ Zn

Para análises posteriores (realizadas em Pau, França), foi usado o equipamento Element XR HR-ICP-MS (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha), bem como dois sistemas de introdução de amostras diferentes. Para soluções aquosas, foi usado um nebulizador concêntrico MicroMist (Glass Expansion, Austrália) com uma câmara spray duplo passo. Foram usados, também, um injetor de quartzo padrão de 1,75 mm e cones de amostragem (diâmetro do orifício de 1,10 mm) e skimmer (diâmetro do orifício de 0,8 mm) de Pt, bem como auto-amostrador CETAC (Omaha, NE) ASX-520.

Para as amostras orgânicas, foi utilizado um micro nebulizador de consumo total modificado CETAC DS-5, e uma câmara spray de baixo volume morto (8 mL). Foi usado um injetor de quartzo de 1,0-mm ID para matrizes orgânicas e cones de amostragem (diâmetro do orifício de 1,10 mm) e skimmer

(diâmetro do orifício de 0,8 mm) de Pt. Foram introduzidas amostras e padrões em modo de micro injeção em fluxo (μ FI) utilizando tetrahidrofurano (THF) como carreador. Para análises em μ FI, foram usados sistema HPLC Dionex (Amsterdam, Holanda), constituído de uma bomba UltiMate 300, um auto amostrador UltiMate 3000 e uma válvula μ FI.

As condições de operação relevantes do equipamento estão descritas na Tabela 1.3, a seguir.

Tabela 1.3 - Condições de operação do HR-ICP-MS para introdução de soluções orgânicas (A) e aquosas (B)

	A	B
HR-ICP-MS		
Posição da tocha, mm	+2,20 (X), +1,10 (Y), -3,50 (Z)	
Potência de RF, W	1200	1500
Vazão do gás do plasma, L min ⁻¹	16,00	16,00
Vazão do gás auxiliar, L min ⁻¹	1,00	0,90
Vazão do gás nebulizador, L min ⁻¹	1,10	0,65
Vazão da amostra, μ L min ⁻¹	300	15
Parâmetros para aquisição de dados		
Isótopos monitorados	⁷ Li, ²⁴ Mg, ²⁷ Al, ³¹ P, ³² S, ⁴⁴ Ca, ⁵² Cr, ⁵⁵ Mn, ⁵⁶ Fe, ⁵⁹ Co, ⁶⁰ Ni, ⁶³ Cu, ⁶⁶ Zn, ⁷⁵ As, ⁷⁸ Se, ⁸⁸ Sr, ⁹⁵ Mo, ¹¹¹ Cd, ¹¹⁵ In, ¹¹⁸ Sn, ¹²¹ Sn, ¹²⁵ Te, ¹³⁷ Ba, ²⁰² Hg, ²⁰⁸ Pb, ²⁰⁹ Bi	
Janela de massa, %	125	
Janela de integração, %	60	
Número de amostras por pico	20	
Modo de detecção	Triplo	
Modo de escaneamento	EScan	
Tipo de integração	Média	
Resolução	4000 (média)	

3.4 Reagentes, soluções e materiais

THF, n-hexano, iso-propanol e metanol CHROMASOLV LC-MS, pastilhas de NaOH, reagentes usados para digestão gastrointestinal, e padrões para calibração da coluna de exclusão por tamanho foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Clorofórmio CHROMASOLV foi adquirido da Riedel-de-Häen (Seelze, Alemanha). HNO₃ (69-70%) e H₂O₂ (30%, m/m) foram obtidos da J. T. Baker

(Deventer, Holanda). Uma solução padrão multi-elementar SPEX CertiPrep (Matuchen, NJ, EUA) Claritas PPT ($10 \mu\text{g g}^{-1}$ de Au, Hf, Ir, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb e Te), uma solução padrão multi elementar TraceCERT da Sigma-Aldrich ($10 \mu\text{g g}^{-1}$ de Be, Cd, Co e Mn, $20 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cr, Cu, e Ni, $40 \mu\text{g g}^{-1}$ de Al, As, Ba, Pb e V, e $100 \mu\text{g g}^{-1}$ de B, Fe, Se, Tl e Zn) e soluções padrão monoelementares SCP Science (Clark Graham, QC, Canadá) PlasmaCAL ($1000 \mu\text{g g}^{-1}$ de Ag, Bi, Ca, Hg, K, Li, Mg, Mo, P, S, Si, Sr e Ti) foram usadas para preparar soluções padrão multi elementares em 5,0% (m/v) HNO_3 para calibração externa (0, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 e 1000 ng g^{-1}) e adições padrão. Uma solução padrão de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ SPEX CertiPrep Claritas PPT (Ba, B, Co, Fe, Ga, In, Li, Lu, Na, Rh, Sc, Tl, U, Y e K) foi usada para fazer a verificação de desempenho do instrumento para soluções aquosas.

Uma solução multi elementar oleosa SCP Science Conostan S-21 contendo $100 \mu\text{g g}^{-1}$ de Ag, Al, B, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Si, Sn, Ti, V e Zn, e padrões oleosos Conostan mono elementares ($1000 \mu\text{g g}^{-1}$) de As, Bi, Li, S, Co, Hg, Sb foram usados para preparar as soluções padrão de trabalho de 10, 20, 50, 100, 200 e 500 ng g^{-1} em hexano, hexano/iso-propanol (1:1) e clorofórmio/ metanol (1:1). Uma solução para a verificação do desempenho do equipamento contendo 1 ng g^{-1} de Ba, B, Co, Fe, Ga, In, Li, Lu, Na, Rh, Sc, Tl, U, Y e K em THF foi preparada diluindo-se os padrões mono elementares dos elementos utilizados.

Os materiais certificados (MRCs) de leite em pó sem gordura (MRC 1549) e farinha de trigo (MRC 1567a) foram adquiridos do National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD).

3.5 Determinações dos elementos totais

Para as análises preliminares, as sementes de soja previamente maceradas, foram secas até massa constante. A 0,25 g de amostra seca, foram adicionados 6 mL de HNO_3 concentrado sub-boiling e 0,75 mL de H_2O_2 30% (m/m). Foi utilizado um tempo de pré-reação de 30 min.

Para os procedimentos de decomposição, foi utilizado um forno micro-ondas DGT100 Plus (Provecto Analítica, Jundiaí, Brasil) equipado com sensor de temperatura e magnetron de 2450 ± 13 MHz com potência nominal de 1200 W. O programa usado para decomposição das amostras está descrito na Tabela 1.4.

Tabela 1.4 – Programa de decomposição da amostra em forno micro-ondas

Etapa	Tempo (min)	Potência (W)
1	5	400
2	1	0
3	5	790
4	3	0

Após decomposição, os tubos de Teflon foram colocados em banho de areia (Quimis, Diadema, São Paulo) a temperatura de ca. 60°C para evaporar o excesso de ácido nítrico. Após filtração em papel de filtro de $45\ \mu\text{m}$, os volumes finais foram ajustados para 10 mL utilizando-se água deionizada.

Para análises em Pau, França, amostras foram secas a $60\ ^{\circ}\text{C}$ até massa constante. Então, 0,2 g de amostra foram digeridas usando tubos EasyPrep (volume mínimo de utilização = 7 mL) usando 6,3 mL de HNO_3 Suprapur (Merck) concentrado e 0,75 mL de H_2O_2 30% (m/m). Os tubos foram fechados e levados à decomposição a $160\ ^{\circ}\text{C}$ por 25 min em um sistema de decomposição micro-ondas CEM (Matthews, NC, EUA) MARS. No caso dos materiais certificados, 0,2 g de amostra foram digeridos em tubos de polipropileno (PP) de 50 mL com 1,2 mL de HNO_3 concentrado e 0,3 mL de H_2O_2 30% (m/m) a $80\ ^{\circ}\text{C}$ por 3 h usando um bloco de aquecimento SPC Science DigiPrep MS com controle de tempo e temperatura. As soluções resultantes foram resfriadas, diluídas para 25 mL (MRCs) ou 50 mL (sementes de soja) com água deionizada, e a concentração total de elementos foi determinada por HR-ICP-MS.

Seis replicatas independentes foram feitas, e os respectivos brancos foram considerados nos resultados finais.

3.6 Extração sequencial

Em uma primeira etapa, realizada para separar a fração insolúvel em água, 0,1 g de amostras de sementes de soja foram sonicadas em um banho ultrassônico Branson (Danbury, CT, EUA) com 2 mL de uma mistura hexano/iso-propanol (1:1 v/v) por 30 min. Este procedimento foi repetido por 3x; sendo os sobrenadantes reunidos e analisados por HR-ICP-MS utilizando soluções padrão preparadas com a mistura de hexano/iso-propanol para calibração. Em uma segunda etapa, os resíduos foram secos em um sistema concentrador de amostras DB-3 (Bibby Scientific, Staffordshire, UK) para remover solventes orgânicos, e, em seguida, sonicados com 2,5 mL de água deionizada por 2 min usando uma sonda ultrassônica Vibracell 75115, Bioblock Scientific (Illkirch, França) a 20% de sua potência máxima (potência nominal 500 W) em modo pulsado (pulsos de 1s intercalados com intervalos de 1s). Os sobrenadantes foram obtidos usando-se um centrífuga Universal 16, Hettich (Tuttlingen, Alemanha) a 3000 rpm por 10 min, sendo este procedimento repetido por 2x, os sobrenadantes foram agrupados e analisados por HR-ICP-MS. Finalmente, os resíduos resultantes da extração foram digeridos utilizando 1,2 mL de HNO₃ concentrado e 0,3 mL de H₂O₂ 30% (m/m) a 80 °C por 3h, usando tubos de 50 mL de PP em um bloco aquecedor SCP ScienceDigiPrep MS. As soluções finais foram diluídas em água deionizada para 15 mL e analisadas em HR-ICP-MS.

Foram feitas seis replicatas independentes, e os respectivos brancos foram considerados nos resultados finais.

3.7 Teste de bioacessibilidade

O protocolo utilizado foi descrito anteriormente por Mounicou *et al.* [38]. Em resumo, para extração gástrica, 5 mL de solução gástrica (50 mg de pepsina + 5 mL de NaCl 150 mmol L⁻¹, pH 2.5) foram adicionados a 0,3 g de amostras de sementes de soja e incubados a 37 °C por 4 h. Para simular a extração intestinal, o valor de pH da amostra foi ajustado para 7,4 com solução

concentrada de NaOH, e, então, 10 mL de uma solução intestinal, contendo soluções de 3,0% (m/v) de pancreatina, 1,0% (m/v) de amilase e 1,5 g L⁻¹ de sais biliares, foi adicionada e incubada a 37 °C por 4 h. Os sobrenadantes foram centrifugados em uma centrífuga Universal 16 a 3000 rpm por 15 min, e, então, analisados utilizando HR-ICP-MS. Adicionalmente, os resíduos foram digeridos para que se pudesse realizar um balanço de massa.

Três replicatas independentes foram feitas, e os respectivos brancos foram considerados nos resultados finais.

3.8 Análise utilizando SEC-HR-ICP-MS

As separações cromatográficas foram realizadas utilizando sistema HPLC Agilent 1100 (Wilmington, Alemanha), composto de uma bomba HPLC, um degaseificador, um auto amostrador e um detector UV, e uma coluna de exclusão por tamanho (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) Superdex 75 HR 10/30 (10 × 300 mm × 5 µm), com região ótima de fracionamento entre 3-70 kDa. Um volume de 100 µL do extrato aquoso foi injetado na coluna SEC e a corrida cromatográfica isocrática foi feita utilizando-se tampão acetato de amônio 100 mmol L⁻¹ (pH 7,4) como eluente, à uma vazão de 0,7 mL min⁻¹. O eluente da coluna era diretamente conectado ao HR-ICP-MS.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Concentrações totais dos elementos

Nas amostras digeridas para realização dos estudos iniciais, os seguintes elementos foram quantificados: Cu, Mg, Mn e Zn, utilizando-se ICP-MS (Elan DRC-e). Os resultados são mostrados na Figura 1.3.

A análise estatística dos dados utilizando teste *t* demonstrou que há uma diferença estatística significativa (*p*=0,05) nas concentrações de Cu nas sementes

de soja NT e T, sendo que nas sementes T foi encontrada concentração aproximadamente 42% maior do que na NT. Na Tabela 1.5 são mostrados os resultados para as análises posteriores.

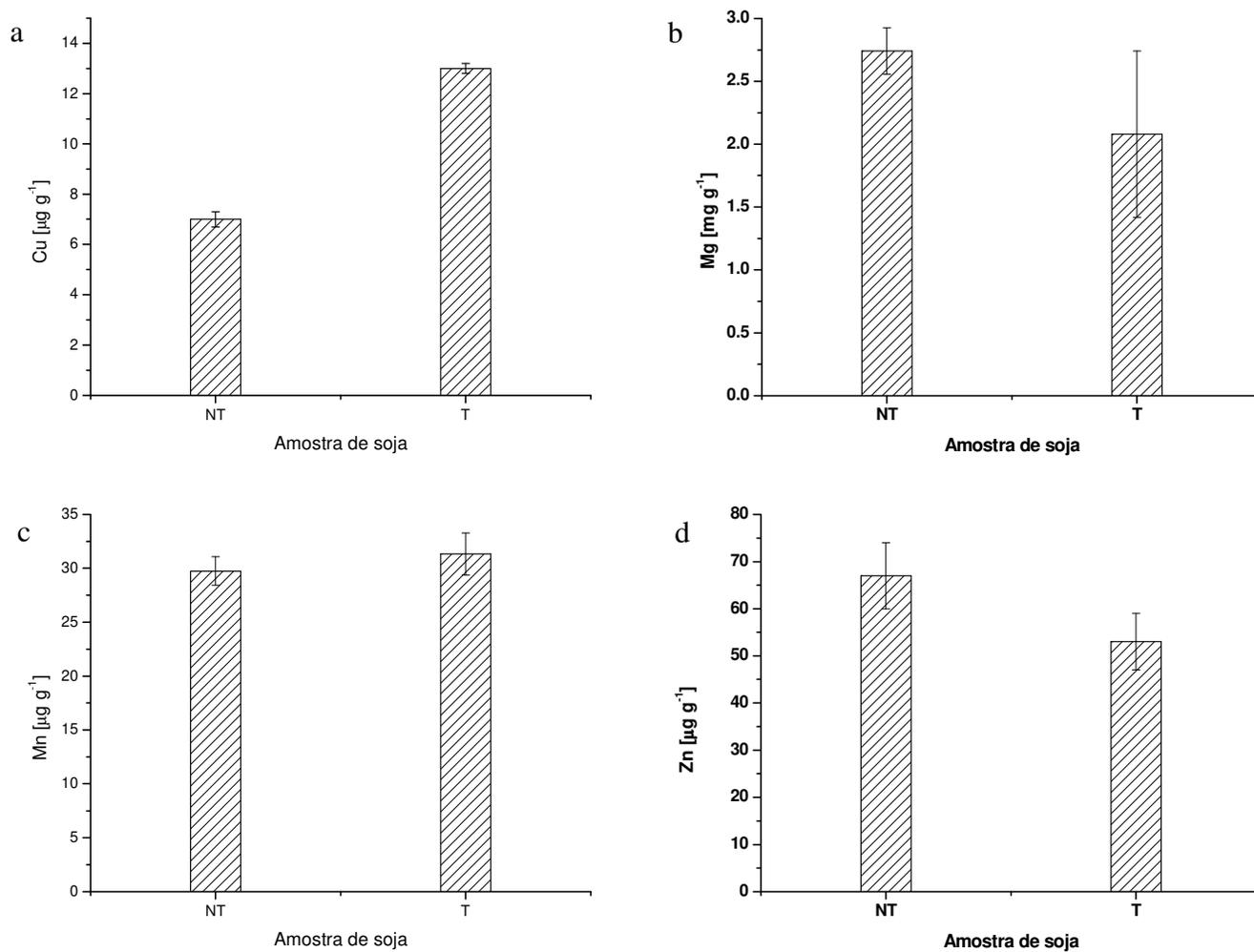


Figura 1.3 – Determinação do conteúdo total de Cu (a), Mg (b), Mn (c) e Zn (d) em amostras de semente de soja NT e T.

Tabela 1.5 – Resultados para MRC 1549 e 1567a e para as amostras de semente de soja T e NT por HR-ICP-MS, após decomposição (valores médios, n=6± desvio padrão)

	MRC 1549, $\mu\text{g g}^{-1}$		MRC 1567a, $\mu\text{g g}^{-1}$		Sementes de soja, $\mu\text{g g}^{-1}$	
	Valor encontrado	Valor certificado	Valor encontrado	Valor certificado	T	NT
Al	1,9 ± 0,2	2	-	-	<0,24 ^a	<0,24 ^a
As	<0,0009 ^a	<0,0029	-	-	<0,0009 ^a	<0,0009 ^a
Ba	-	-	-	-	0,104 ± 0,004	<0,002 ^b
Bi	-	-	-	-	<0,001 ^a	<0,001 ^a
Ca	1,4 ± 0,1 ^c	1,3 ^c	0,02 ± 0,005	0,0191 ± 0,0004	998 ± 92	924 ± 96
Cd	<0,0006 ^b	<0,0007	-	-	<0,0006 ^b	<0,0006 ^b
Co	-	-	-	-	0,046 ± 0,002	0,028 ± 0,001
Cr	<0,15 ^a	0,0023 ± 0,0004	-	-	<0,15 ^a	<0,15 ^a
Cu	0,61 ± 0,02	0,7	1,8 ± 0,3	2,1 ± 0,2	10 ± 1	6 ± 1
Fe	1,8 ± 0,1	1,78	12 ± 1	14 ± 1	81 ± 2	66 ± 3
Hg	<0,0015 ^a	<0,0008	-	-	<0,0015 ^a	<0,0015 ^a
Li	-	-	-	-	<0,006 ^a	<0,006 ^a
Mg	0,13 ± 0,01 ^c	0,12 ^c	0,04 ± 0,01 ^c	0,040 ± 0,002 ^c	3979 ± 407	3693 ± 474
Mn	0,24 ± 0,01	0,26	9 ± 1	9 ± 1	28 ± 1	25 ± 2
Mo	0,34 ± 0,02	0,34	-	-	0,32 ± 0,02	0,35 ± 0,05
Ni	-	-	-	-	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1
P	1,13 ± 0,05 ^c	1,06 ^c	0,13 ± 0,01	0,134 ± 0,003 ^c	6589 ± 308	6366 ± 595
Pb	0,019 ± 0,003	0,0181 ± ,0010	-	-	0,006 ± 0,004	0,009 ± 0,003
S	0,33 ± 0,02 ^c	0,35 ^c	-	-	3083 ± 135	2801 ± 200
Sb	<0,0003 ^a	<0,006	-	-	0,002 ± 0,001	0,002 ± 0,001
Se	0,011 ± 0,01	0,119 ± 0,007	-	-	0,11 ± 0,04	<0,02 ^b
Sn	<0,031 ^a	<0,0016	-	-	<0,031 ^a	<0,031 ^a
Sr	-	-	-	-	20 ± 3	30 ± 4
Te	-	-	-	-	<0,0003 ^a	<0,0003 ^a
Zn	45 ± 2	46,1	-	-	39 ± 5	38 ± 5

^aLimite de detecção; ^b limite de quantificação; ^cConcentração expressa em %

Os limites de detecção (LD) instrumental dos elementos estudados utilizando-se HR-ICP-MS foram obtidos de acordo com o critério 3δ ($3 \times$ desvio padrão de 10 medidas do branco dividido pela inclinação da curva). Estes LDs podem ser divididos em 3 grupos: de 0,0003 a 0,001 $\mu\text{g L}^{-1}$ (As, Ba, Bi, Cd, Co, Hg, Li, Mo, Pb, Sb, Sr e Te); de 0,02 a 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Al, Cr, Cu, Mn, Ni, S, Se, Sn e Zn) e maiores que 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Ca, Fe, Mg e P). Precisão, expressa como desvio padrão relativo de 3 medidas das soluções padrão multi-elementares variaram de 1,1 (P, Cr) a 21% (Mo).

A exatidão das análises utilizando HR-ICP-MS foi verificada analisando-se dois materiais de referência: NIST MRC 1549 (leite em pó desnatado) e NIST MRC 1567a (farinha de trigo). Os resultados das análises são mostrados na Tabela 1.5. As recuperações dos elementos medidos variaram 84-113%, indicando uma boa concordância entre os valores certificados e os valores determinados. A precisão das análises de 3 digeridos para cada um dos materiais certificados variaram entre 0,4 e 10%.

As concentrações totais dos elementos nas sementes de soja transgênica e não-transgênica obtidas após decomposição assistida por micro-ondas são dadas na Tabela 1.5. De acordo com teste-*t* ($p=0,05$, $n=6$), foram encontradas diferenças significativas entre amostras de semente de soja T e NT para Co, Cu, Fe e Sr. Concentrações de Co, Cu e Fe em sementes de soja T foram maiores em 39, 40 e 20%, respectivamente, do que as concentrações correspondentes a esses elementos em sementes de soja NT. Para Sr, uma maior concentração foi encontrada em sementes de soja NT, e a diferença entre as concentrações foi de 34%.

Diferenças nas concentrações de Cu e Fe entre sementes de soja T e NT já haviam sido estabelecidas por Sussulini *et al.* [39] quando spots proteicos recortados de géis eletroforéticos 2D foram analisados utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS).

É importante ressaltar que concentrações elementares em sementes de soja são dependentes de vários fatores que podem afetar o desenvolvimento da planta, tais como composição do solo e da água de irrigação da planta [40]. Como a maioria desses fatores foram controlados durante o crescimento das

plantas utilizadas nesse estudo, há a possibilidade de que as diferenças encontradas nas concentrações de Co, Cu, Fe e Sr possam estar relacionadas à modificação genética.

4.2 Análises por fracionamento

Foi realizado um procedimento de extração com solvente em duas etapas no intuito de entender como Co, Cu, Fe, Sr e outros elementos (Ca, Mg, Mn, Ni, S, Zn) medidos em ambas as amostras de semente de soja estariam distribuídos entre espécies hidrofóbicas (utilizando extração assistida por ultrassom com uma mistura de hexano/iso-propanol ou hexano) e solúveis em água (usando extração assistida por ultrassom com água). Os resíduos restantes foram digeridos para obter informações sobre balanço de massa.

Em um primeiro momento, foram realizados testes para verificar o melhor solvente orgânico para extração de espécies hidrofóbicas. Os resultados para intensidades obtidas no HR-ICP-MS são mostrados na Figura 1.4.

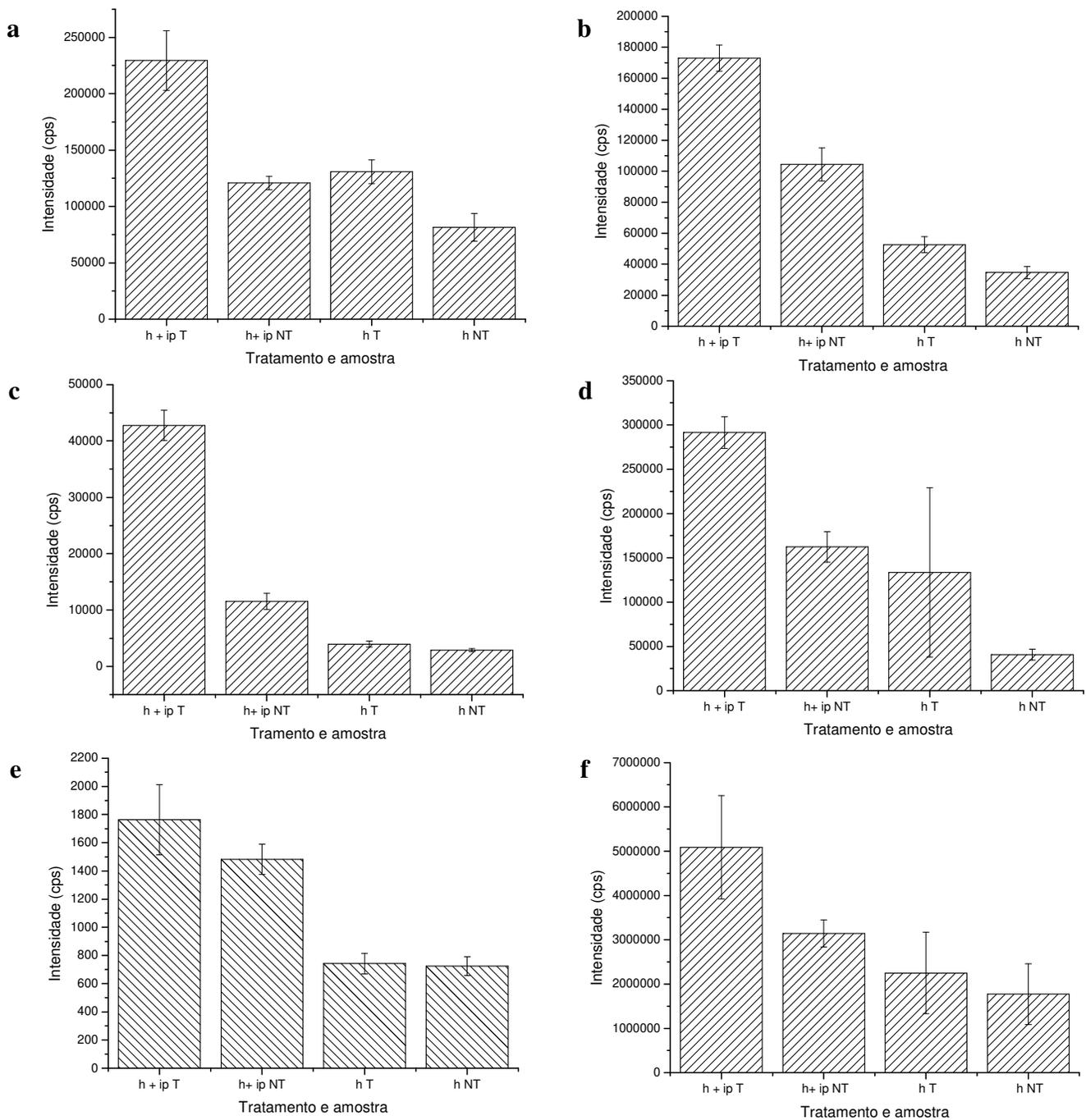


Figura 1.4 – Intensidades obtidas (em cps) para Al(a), Ca(b), Cu(c), Fe(d), Li(e), Mg(f), Mn(g), P(h), S(i), Ti(j), V(k) e Zn(l) analisados utilizando-se extrações orgânicas com hexano (h) e hexano:isopropanol 1:1 (h+ip) em sementes de soja transgênica (T) e não transgênica (NT).

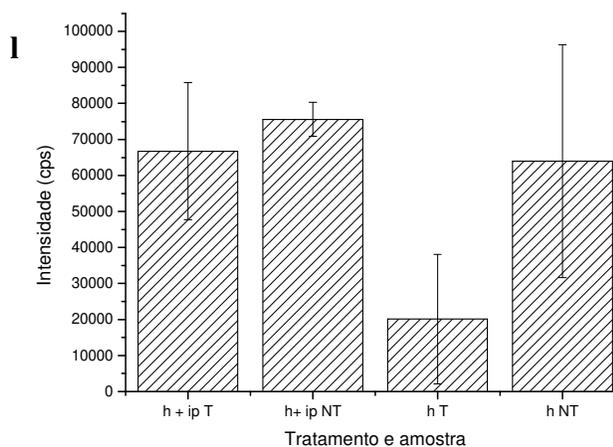
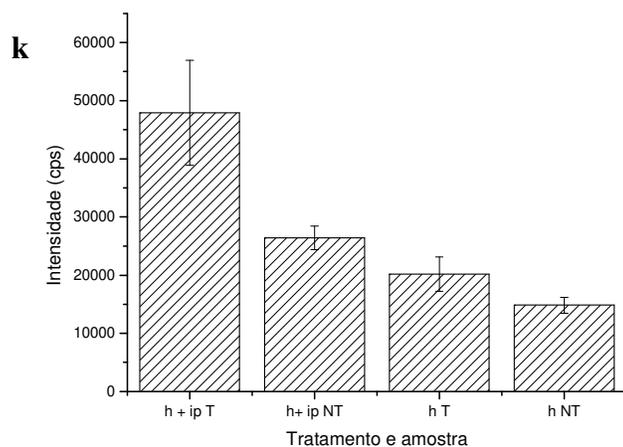
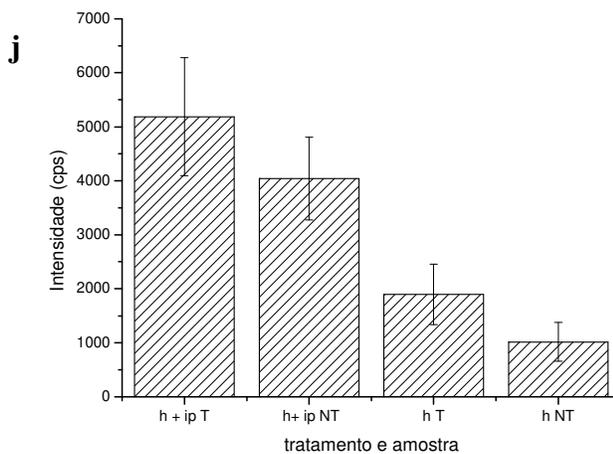
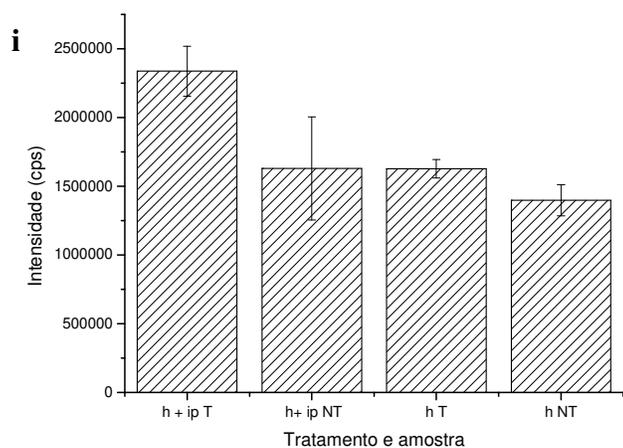
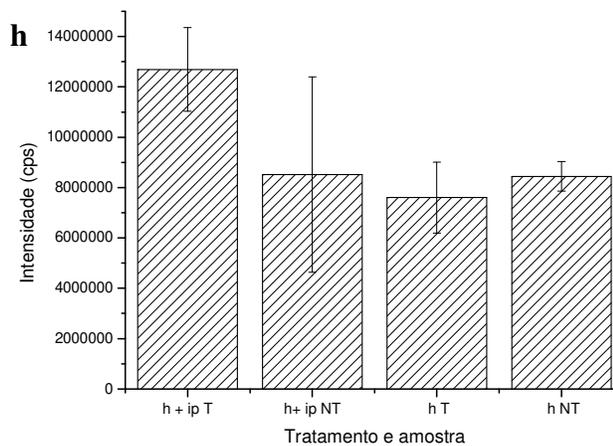
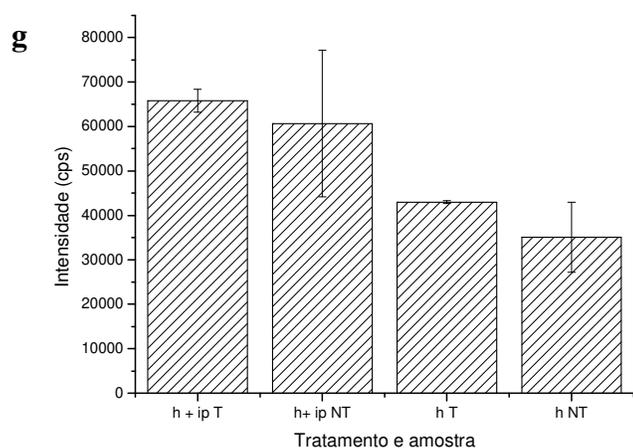


Figura 1.4 (continuação) – Intensidades obtidas (em cps) para Al(a), Ca(b), Cu(c), Fe(d), Li(e), Mg(f), Mn(g), P(h), S(i), Ti(j), V(k) e Zn(l) analisados utilizando extrações orgânicas com hexano (h) e hexano:isopropanol 1:1 (h+ip) em sementes de soja transgênica (T) e não transgênica (NT).

Como pode ser observado, a mistura hexano:iso-propanol (h+ip) foi a que apresentou maior intensidade para os elementos analisados. Vale ressaltar que a mistura metanol:clorofórmio (1:1) também foi testada, porém, foram obtidos grandes desvios padrão para as análises.

Os resultados das análises de fracionamento para extração orgânica com hexano estão mostrados na Tabela 1.6.

Pode ser observado que a soma das concentrações dos elementos em cada uma das frações e nos resíduos digeridos estão de acordo com as concentrações totais previamente determinadas. Ainda, as recuperações dos elementos variaram de 87% para Mn e Ca em sementes de soja T até 138% para Sr em sementes de soja NT.

Apenas o P pôde ser quantificado na fração orgânica (~6% em relação à concentração total em ambas as amostras), provavelmente devido à presença de fosfolípidos. Os resultados do fracionamento de P foram excluídos da Tabela 1.6, uma vez que foram encontrados problemas na porcentagem de recuperação deste elemento, que podem ter sido causados por algum concomitante não identificado presente na amostra.

A fração aquosa, onde as principais moléculas são proteínas [34], contribuiu para a concentração total de elementos com valores entre 36 (Ca) e 104% (Zn) em sementes de soja T. Para sementes de soja NT, elementos solúveis em água contribuíram com valores entre 35 (Ca) e 100% (Zn) para a concentração total dos elementos. No caso do Sr, apenas 5% da concentração total desse elemento foi encontrada na fração aquosa, para ambas as amostras. Grande parte da concentração de Sr está associada aos resíduos.

Estes resultados são consistentes com dados obtidos por Koplik *et al.* [20], que também encontraram altos valores de extração para diferentes elementos, *i.e.*, de 37% para Ca até 82% para Mo, para farinha de soja, cuja extração foi realizada com tampão Tris-HCl.

Tabela 1.6 – Concentrações de Ca, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, S, Sr e Zn nas frações orgânica, aquosa e nos resíduos, e balanços de massa para sementes de soja T e NT (valores médios, n=6±desvio padrão).

Elemento	Concentração, $\mu\text{g g}^{-1}$						Balanço de massa, %	
	Fração orgânica		Fração aquosa		Resíduo		T	NT
	T	NT	T	NT	T	NT		
Ca	<23 ^a	<23 ^a	358 ± 32	325 ± 31	500 ± 67	485 ± 45	85 ± 2	88 ± 10
Co	<0,1 ^a	<0,1 ^a	0,038 ± 0,003	0,023 ± 0,002	0,01 ± 0,001	0,006 ± 0,001	98 ± 7	104 ± 10
Cu	<3,4 ^a	<3,4 ^a	6 ± 1	3,1 ± 0,4	2,4 ± 0,4	1,8 ± 0,2	88 ± 14	83 ± 7
Fe	<46 ^a	<46 ^a	41 ± 4	29 ± 6	33 ± 7	27 ± 8	92 ± 8	80 ± 7
Mg	<0,4 ^a	<0,4 ^a	2873 ± 220	2564 ± 232	1058 ± 192	1144 ± 306	105 ± 1	99 ± 17
Mn	<0,4 ^a	<0,4 ^a	15 ± 1	12 ± 1	8 ± 1	10 ± 1	87 ± 12	87 ± 1
Ni	<2,3 ^a	<2,3 ^a	0,40 ± 0,03	0,27 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	91 ± 6	94 ± 7
S	<2,4 ^a	<2,3 ^a	2742 ± 352	2429 ± 204	778 ± 245	855 ± 115	121 ± 8	114 ± 2
Sr	<0,9 ^a	<0,9 ^a	2,4 ± 0,3	1,5 ± 0,3	17 ± 2	24 ± 1	90 ± 10	90 ± 2
Zn	<4,0 ^a	<4,0 ^a	40 ± 2	38 ± 3	7 ± 1	9,1 ± 0,4	122 ± 9	122 ± 10

^aLimites de quantificação.

Considerando as concentrações de Co, Cu e Fe determinadas em extratos aquosos e de Sr determinada no resíduo, foi encontrada uma diferença estatisticamente significante entre sementes de soja T e NT, assim como nas concentrações totais desses elementos. As concentrações de Co, Cu e Fe em extratos aquosos de sementes de soja T foram 55, 48 e 21% maiores quando comparadas com as concentrações encontradas nos extratos aquosos de sementes de soja NT. No caso do Sr, sua concentração no resíduo de semente de soja T foi 34% menor quando comparada à concentração desse elemento no resíduo de sementes soja NT.

Para os experimentos envolvendo SEC, foram considerados somente Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P, S e Zn, que possuem concentrações nos extratos aquosos maiores que $2 \mu\text{g g}^{-1}$.

4.3 Análise dos extratos aquosos por SEC-HR-ICP-MS

As faixas de massa correspondentes aos sinais encontrados foram calculadas utilizando-se a curva de calibração mostrada na Figura 1.5, obtida à partir dos seguintes padrões protéicos: albumina bovina (66,0 kDa), albumina de ovo de galinha (44,3 kDa), superóxido dismutase Mn (40,0 kDa), superóxido dismutase Cu-Zn (32,5 kDa), mioglobina (16,7 kDa) e metalotioneína 1 (MT1, 7kDa).

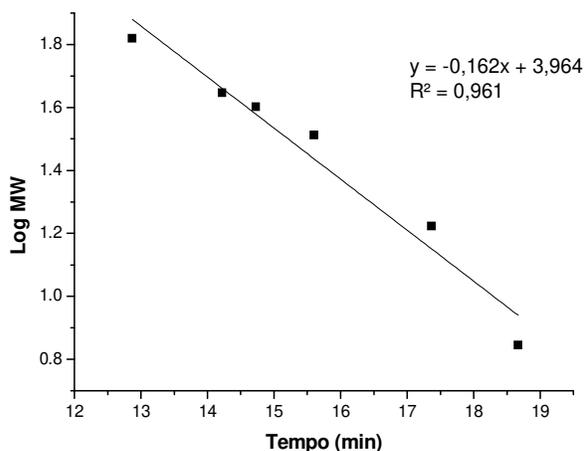


Figura 1.5 – Curva de calibração obtida empregando coluna Superdex 75 para tampão acetato de amônio 100 mmol L^{-1} a $0,7 \text{ mL min}^{-1}$.

A utilização de tampão acetato de amônio (100 mmol L^{-1}) se justifica por sua volatilidade, o que minimiza a deposição de sais no nebulizador e nos cones dos equipamentos de ICP-MS. Ainda, as maiores concentrações de metais foram encontradas nas menores faixas de massa. Por este motivo, optou-se pela utilização da coluna Superdex 75 (faixa de exclusão de 3 a 70 kDa), e não Superdex 200 (faixa de exclusão de 10 a 600 kDa).

A distribuição por massa molar (MM) de Cu e Fe, entre outros elementos (Ca, Mg, Mn, P, S e Zn) em extratos aquosos foi examinada por meio de separações com SEC, seguidas de detecções UV e elemento específicas (HR-ICP-MS). Os cromatogramas correspondentes a cada um dos elementos nas amostras são apresentados nas figuras a seguir.

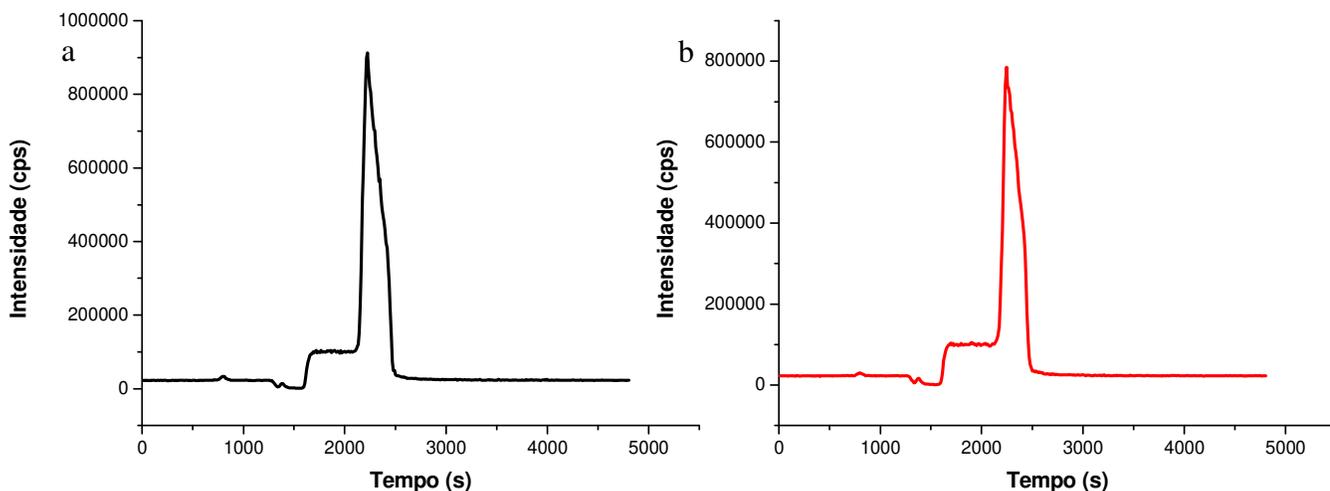


Figura 1.6 – Perfil cromatográfico obtido para o Ca em sementes de soja T (a) e NT (b), empregando coluna Superdex 75.

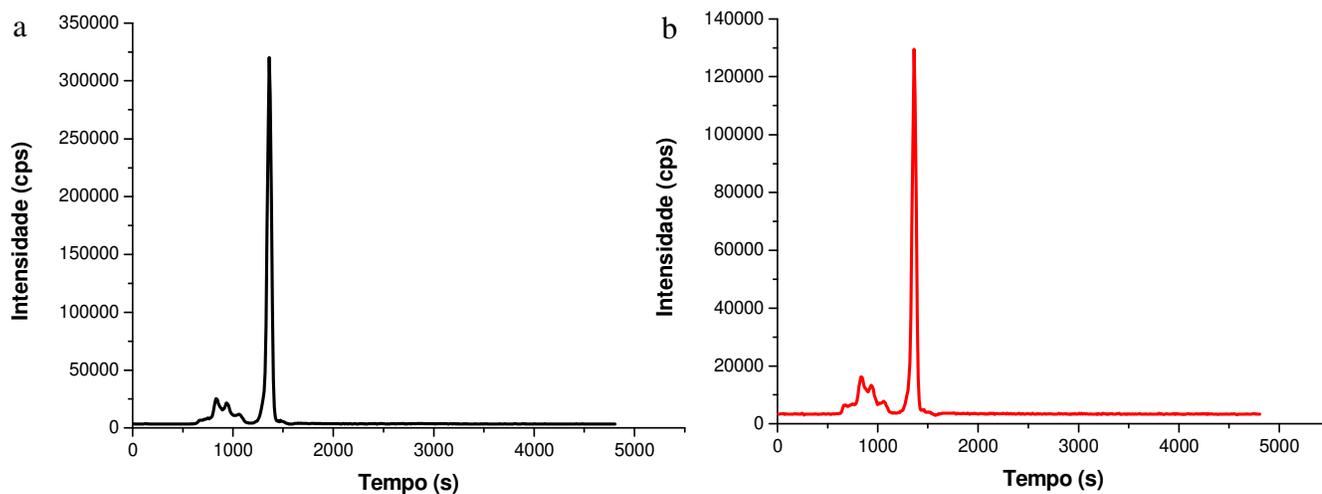


Figura 1.7 – Perfil cromatográfico obtido para o Cu em sementes de soja T (a) e NT (b), empregando coluna Superdex 75.

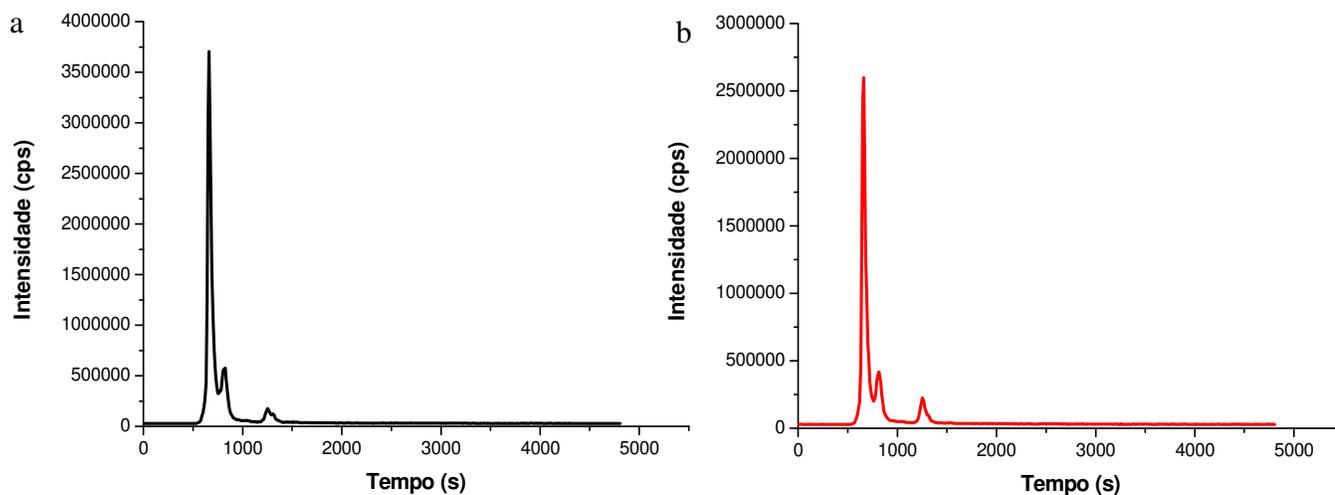


Figura 1.8 – Perfil cromatográfico obtido para o Fe em sementes de soja T (a) e NT (b), empregando coluna Superdex 75.

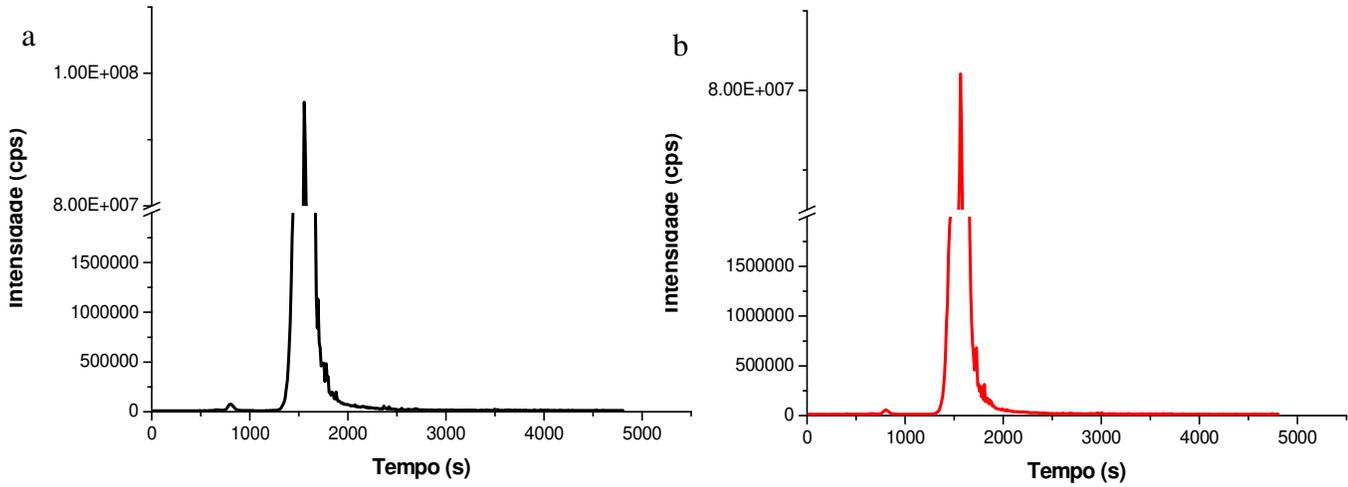


Figura 1.9 – Perfil cromatográfico obtido para o Mg em sementes de soja T (a) e NT (b), empregando coluna Superdex 75.

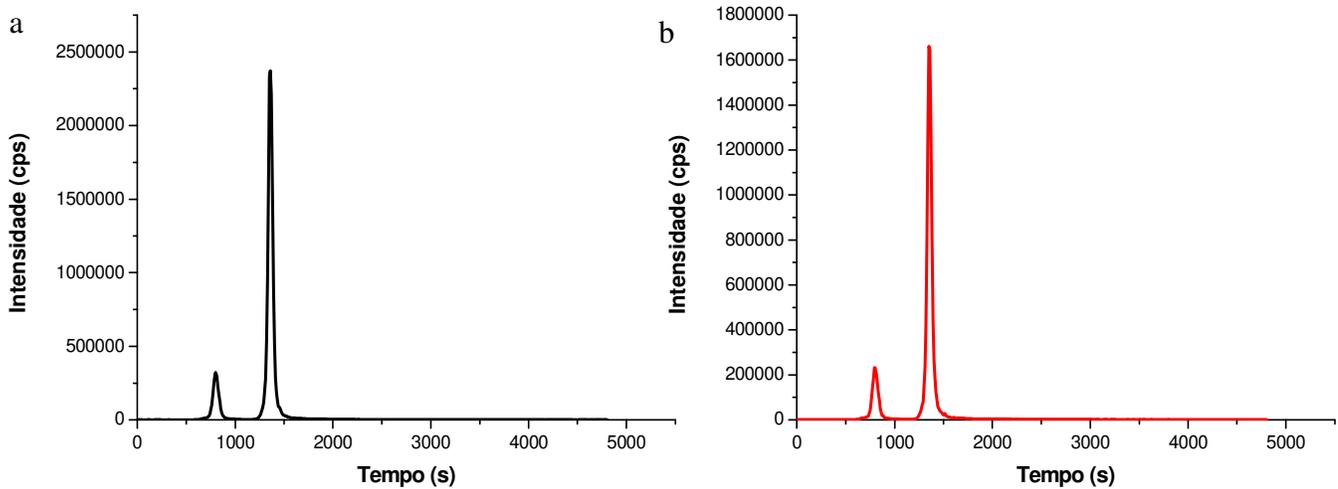


Figura 1.10 – Perfil cromatográfico obtido para o Mn em sementes de soja T (a) e NT (b), empregando coluna Superdex 75.

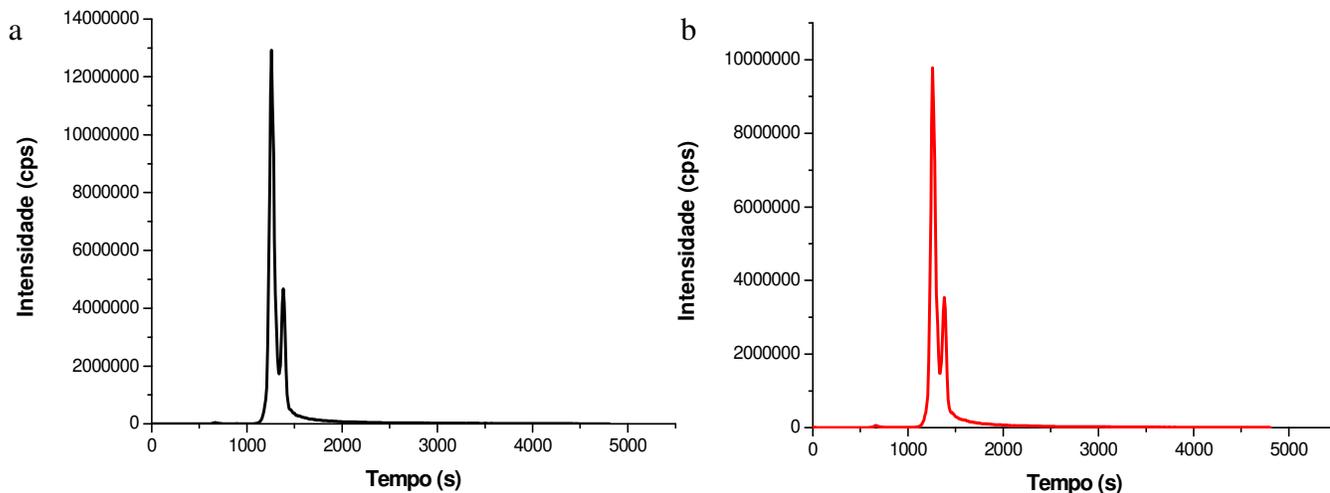


Figura 1.11 – Perfil cromatográfico obtido para o P em sementes de soja T (a) e NT (b), empregando coluna Superdex 75.

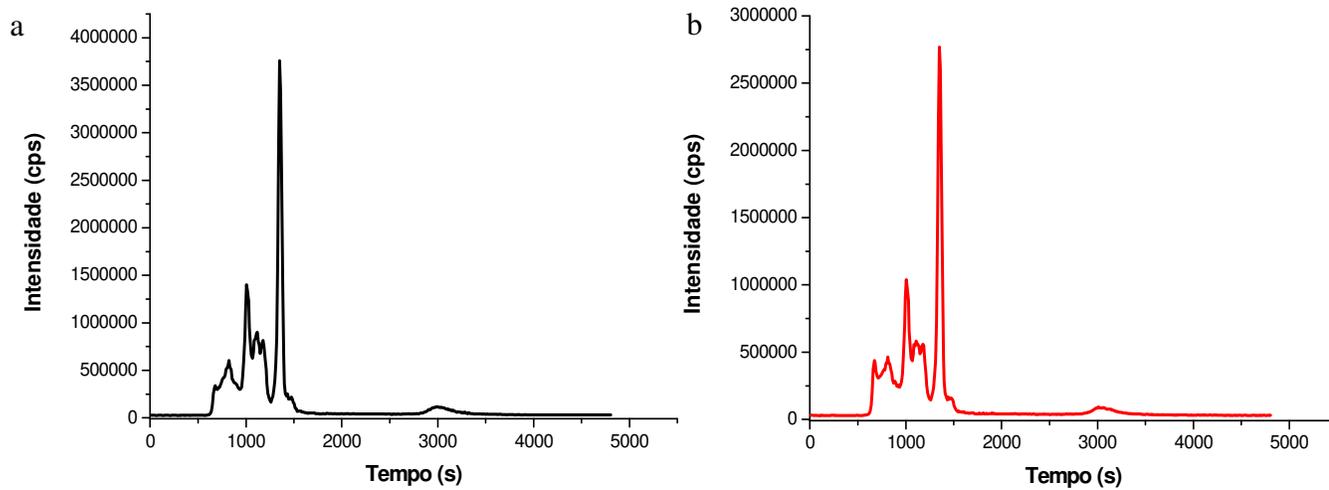


Figura 1.12 – Perfil cromatográfico obtido para o S em sementes de soja T (a) e NT (b), empregando coluna Superdex 75.

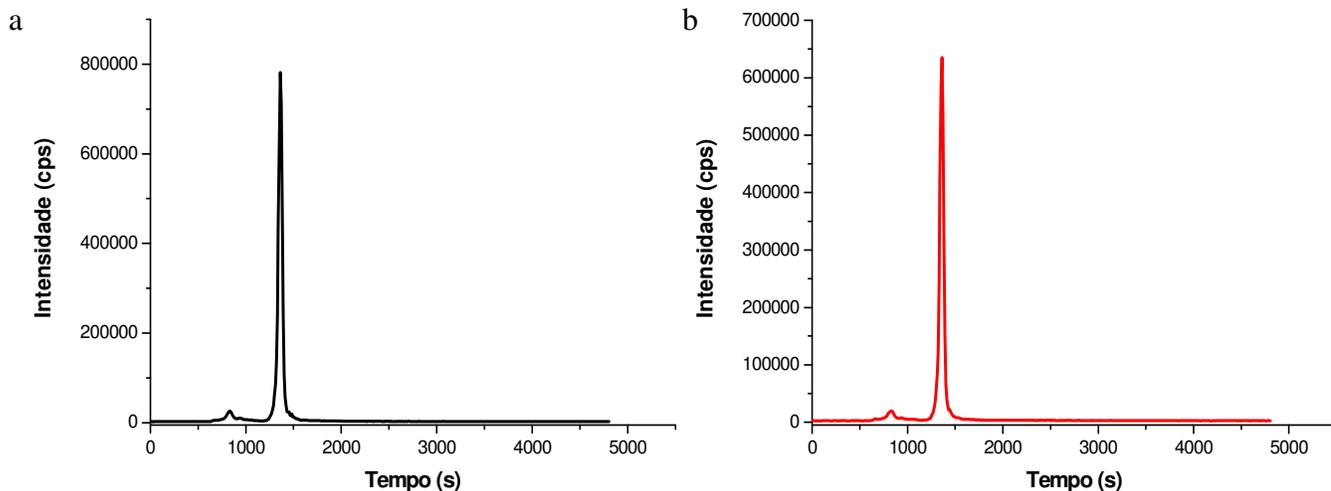


Figura 1.13 – Perfil cromatográfico obtido para o Zn em sementes de soja T (a) e NT (b), empregando coluna Superdex 75.

Os ápices dos maiores sinais para Cu, Mn, S e Zn foram encontrados entre 22,5 e 23,0 min, o que corresponde a espécies de baixa massa molar (~2 kDa) e abaixo do limite inferior de calibração da coluna.

O Cu e o Zn foram encontrados, em sua maioria, ligados a compostos que correspondem a uma baixa massa molar (BMM, abaixo de 5 kDa). Baixas quantidades de Cu e Zn estão também presentes em faixas de massa molar alta (AMM, acima de 40 kDa) e média (MMM, entre 40 e 5 kDa). Estudos prévios, utilizando farinha de soja [20, 21] mostraram um comportamento de eluição similar para o Cu e o Zn em extratos aquosos. Ainda, os estudos envolvendo a estabilidade das frações de Cu em SEC [41] mostraram que os compostos presentes na fração de maior massa molar podem ligar Cu via grupos tiol, e, em comparação com as outras frações, esta apresenta menor estabilidade. Esses argumentos podem explicar a grande porcentagem de Cu encontrada na fração de menor massa molar, e, ainda, a mudança nas proporções dos sinais para Cu em sementes de soja T e NT quando a extração é feita sem a sonda ultrassônica, onde foram encontrados 3 sinais, com o perfil cromatográfico semelhante ao encontrado por Fingerová e Koplik [42].

Segundo Koplik *et al.* [20], as informações sobre especiação de

elementos com baixa solubilidade obtidas por métodos cromatográficos são limitadas. Este é o caso do Ca, onde mais de 50% da concentração total se encontra no resíduo. Ainda, elementos alcalinos (como Mg e Ca) são retardados na coluna, não por efeitos de exclusão por tamanho, mas por efeitos como adsorção e troca iônica [20], o que pode fazer com que esses elementos sejam eluídos em um único sinal. Este efeito pode ser demonstrado nesta Tese, onde tanto o Ca (Figura 1.6) quanto o Mg (Figura 1.9) apresentaram um único sinal com ápice na fração de BMM.

Não foram encontradas espécies de Mn na faixa AMM nos extratos aquosos de sementes de soja T e NT, como previamente reportado na literatura [43], entretanto, já se sabe que a distribuição de Mn entre as frações BMM, MMM, e AMM é alterada com o envelhecimento dos extratos, e que espécies relacionadas à AMM são relativamente instáveis [44].

No caso do Fe, os maiores sinais encontrados nos extratos aquosos foram eluídos antes de 13 min, correspondendo a uma massa de 160 kDa (acima do limite superior de exclusão da coluna). Esta massa pode corresponder a algumas metaloproteínas específicas ou quelantes não-específicos de massa molar maior que 100 kDa, que são capazes de formar complexos muito estáveis com Fe em soja [20, 45].

Para o S, ao contrário dos resultados obtidos por Schoppenthau *et al.* [21] na análise de farinha de soja, apresentou o maior sinal sendo co-eluído com os maiores sinais de Cu e Zn em aproximadamente 2,1 kDa. Utilizando a mesma coluna que esta Tese, Koplik *et al.* [20] também encontraram inúmeros sinais de S, sendo que o maior sinal foi registrado na massa de 6,2 kDa. A diferença entre os dois resultados pode ser explicada pelo processo de aplicação de ultrassom pelo qual a amostra foi submetida nesse trabalho, pois como já apontado por Magalhães *et al.* [46], este processo leva a uma maior quantidade de proteínas extraídas, porém pode acarretar mudanças nas ligações metal (ou S nesse caso) – proteína.

O perfil de eluição do P gerou dois sinais cromatográficos na fração de MMM. As análises de trabalhos anteriores [20] mostraram que o ácido fítico é

um composto predominante de P, responsável pelo maior sinal desse elemento no cromatograma, enquanto que o orto-fosfato prevalece nos sinais de menor massa molar. A comparação dos perfis de eluição de Fe e P mostram que os compostos de P (provavelmente incluindo ácido fítico) não estão envolvidos na ligação do Fe [42].

Por fim, os cromatogramas das sementes de soja T e NT não mostraram diferenças significativas quanto à forma e número de sinais, porém, as maiores áreas de sinal (3 e 2x maiores) foram encontradas nas sementes de soja T, principalmente para o Cu e o Fe. Este fato pode significar que o Cu e o Fe estão ligados a compostos mais expressos em sementes de soja T, corroborando com os resultados de Brandão *et al.* [9], que encontraram 10 proteínas com diferença de expressão entre sementes de soja T e NT.

4.4 Bioacessibilidade dos elementos em sementes de soja

Um procedimento de digestão gastrointestinal foi aplicado, e os resultados obtidos para Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, S e Zn para amostras de sementes de soja T e NT estão mostrados na Tabela 1.7.

Tabela 1.7 – Concentração de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, S e Zn nas frações bioacessível, resíduos e recuperação com relação à concentração total para sementes de soja T e NT (valores médios, n=3±desvio padrão).

Elemento	Concentração, $\mu\text{g g}^{-1}$				Recuperação, %	
	Fração bioacessível		Resíduo		T	NT
	T	NT	T	NT		
Ca	824 ± 114	817 ± 72	160 ± 17	193 ± 8	105 ± 13	117 ± 13
Cu	3,5 ± 0,1	1,85 ± 0,02	4,8 ± 0,6	3,4 ± 0,2	80 ± 8	85 ± 9
Fe	21 ± 2	6,0 ± 0,3	53 ± 4	59 ± 9	101 ± 6	100 ± 7
Mg	1690 ± 248	1318 ± 78	492 ± 53	511 ± 20	91 ± 12	75 ± 8
Mn	12,2 ± 0,1	10,5 ± 0,3	7,7 ± 0,9	7,8 ± 0,3	71 ± 9	73 ± 10
S	1322 ± 56	1961 ± 76	958 ± 64	1476 ± 68	73 ± 9	107 ± 10
Zn	22,1 ± 0,1	19,6 ± 0,4	16 ± 1	23 ± 1	92 ± 2	107 ± 8

Em referência às concentrações totais, as contribuições dos elementos para as frações bioacessíveis variaram de 95% (Ca) a 9,2% (Fe) em sementes de soja NT, e de 88% (Ca) a 35% (Cu) para sementes de soja T.

Exceto para Ca e Mg, as porcentagens de extração obtidas para digestão gastrointestinal foram menores se comparadas com as obtidas nos extratos de água. Uma das razões para isto pode ser a presença de fibras e fitatos nas sementes de soja [12], tipicamente 7 e 2% (m/v), respectivamente, que são conhecidos por formar complexos insolúveis com proteínas carregadas positivamente e vários cátions em pH intestinal. Como consequência, a absorção destes elementos após digestão gastrointestinal pode diminuir.

Como já descrito em outro trabalho [47], a absorção de Fe em soja é relativamente baixa. Mesmo após a remoção de fitatos, o que causa um leve aumento na absorção de Fe, as próprias proteínas da soja são consideradas inibitórias à absorção de Fe, provavelmente devido à presença de alguns peptídeos ligantes desse metal [48].

A análise estatística dos dados utilizando teste *t* demonstrou que as concentrações das frações bioacessíveis de Cu, Fe, Mn, S e Zn possuem diferença estatística significativa ($p=0,05$) entre as sementes de soja T e NT. No caso de Cu, Mn, Mg e Zn, as frações bioacessíveis podem estar relacionadas a espécies de baixa massa molar (BMM), tais como ácidos orgânicos (ascórbico, succínico, málico). Tais espécies já foram identificadas como sendo responsáveis pelo aumento da bioacessibilidade de metais em soja e produtos derivados da soja [12].

5. CONCLUSÕES

As sementes de soja T e NT mostram diferenças nas concentrações totais de Cu, Fe e Sr, que também puderam ser observadas nas concentrações destes elementos nos extratos aquosos e resíduos.

Os perfis de distribuição dos elementos nos extratos aquosos não apresentaram diferenças, porém, foram observadas maiores áreas dos sinais de cromatografia de exclusão por tamanho para sementes de soja T,

principalmente para o Cu e o Fe.

As frações bioacessíveis de Cu, Fe, Mn, S e Zn mostraram diferenças estatísticas entre as duas amostras, sendo as sementes de soja T possuem frações apresentando maiores concentrações destes elementos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Embrapa, 4 http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=294&cod_pai=16, acessado em dezembro/2012.
- [2] F. C. A. Brod; A. C. M. Arisi. Quantification of Roundup Ready™ soybean in Brazilian soy-derived foods by real-time PCR, *Int. J. Food Sci. Tech.* 2008, **43**, 1027-1032.
- [3] T. Funk, H. Han, M. L. H. Fried, M. Fischer, E. Schonbrunn. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops, *PNAS* 2006, **35**, 13010-13015.
- [4] S. Lerat, R. H. Gulden, M. M. Hart, J. F. Powell, L. S. England, K. P. Pauls, C. J. Swanton, J. N. Klironomos, J. T. Trevors. Quantification and persistence of recombinant DNA of roundup ready corn and soybean in rotation, *J. Agric. Food Chem.* 2007, **55**, 10226-10231.
- [5] L. R. M. Toni; H. Santana; D. A. M. Zaia. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais, *Quím. Nova* 2006, **29**, 829-833.
- [6] P. Windels, I. Taverniers, A. Depicker, E. Van Bockstaele, M. De Loose. Characterisation of the Roundup Ready insert, *Eur. Food Res. Technol.* 2001, **213**, 107-112.
- [7] S. S. Natarajan, C. Xu, H. Bae, B. A. Bailey, P. Cregan, T. J. Caperna, W. M. Garrett, D. Luthria. Proteomic and genetic analysis of glycinin subunits of sixteen soybean genotypes, *Plant Physiol. Biochem.* 2007, **45**, 436-444.
- [8] S. S. Natarajan, C. Xu, H. Bae, T. J. Caperna, W. M. Garrett. Characterization of storage proteins in wild (*Glycine soja*) and cultivated (*Glycine max*) soybean seeds using proteomic analysis, *J. Agric. Food Chem.* 2006, **54**, 3114-3120.
- [9] A. R. Brandão, H. S. Barbosa, M. A. Z. Arruda. Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds, *J. Proteom.* 2010, **73**, 1433-1440.
- [10] J. M. Saz, M. L. Marina. High performance liquid chromatography and capillary electrophoresis in the analysis of soybean proteins and peptides in foodstuffs, *J. Sep. Sci.* 2007, **30**, 431-451.
- [11] Y. Yip, K. Chan, P. Cheung, K. Poon, W. Sham. Analysis of non-fat soybean powder for the mass fractions of three elements: Copper and zinc by isotope dilution ICP-MS and calcium by ICP-AES., *Food Chem.* 2009, **112**, 1065-1071.
- [12] M. A. Garcia, M. Torre, M. L. Marina, F. Laborda. Composition and characterization of soybean and related products, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1997, **37**, 361-391.
- [13] L. T. P. Yamada, M. F. P. Barcelos, R. V. de Souza, A. L. de Lima. Composição química e conteúdo de ferro solúvel em soja [*Glycine max* (L.) Merrill]., *Ciênc. Agrotec.* 2003, **27**, 406-413.

- [14] Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Subcommittee on Interpretation and Uses of Dietary Reference Intakes, DRI Dietary Reference Intakes. Application in Dietary Assessment, National Academy Press, Washington DC, 2000.
- [15] H. –D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, Food Chemistry, 4 ed., 2008, Springer, Alemanha, 988 p.
- [16] M. Biziuk, J. Kuczynska, Mineral components in food – analytical implications, in: P. Szefer, J. O. Nriagu (editors), Mineral components in food, 2006, CRC Press, Estados Unidos da América, 466 p.
- [17] J. R. Dean, Bioavailability, bioaccessibility and mobility of environmental contaminants. 2007, John Wiley & Sons LTDA, Inglaterra, 283 p.
- [18] R. B. Khouzam, P. Pohl, R. Lobinski. Bioaccessibility of essential elements from white cheese, bread, fruit and vegetables, Talanta 2011, **86**, 425-428.
- [19] M. C. Garcia, M. L. Marina, F. Laborda, M. Torre. Chemical characterization of commercial soybean products, Food Chem. 1998, **62**, 325-331.
- [20] R. Koplík, H. Pavelková, O. Mestek, F. Kvasnička, M. Suchánek. Fractionation of phosphorus and trace elements species in soybean flour and common white bean seeds by size exclusion chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry, J. Chromatogr. B 2002, **770**, 261-273.
- [21] J. Schöppenthau, J. Nölte, L. Dunemann. High-performance liquid chromatography coupled with array inductively coupled plasma optical emission spectrometry for the separation and simultaneous detection of metal and non-metal species in soybean flour, Analyst 1996, **121**, 845-852.
- [22] R. Koplík, M. Borková, O. Mestek, J. Komínková, M. Suchánek. Application of size exclusion chromatography - inductively coupled plasma mass spectrometry for fractionation of element species in seeds of legumes, J. Chromatogr. B 2002, **775**, 179-187.
- [23] L. R. V. Mataveli, P. Pohl, S. Mounicou, J. Szpunar. A comparative study of elements concentration and binding in transgenic and non-transgenic soybeans seeds, Metallomics 2010, **2**, 800-805.
- [24] A. P. Oliveira. Determinação de Cu, Zn e Se em soro humano por ICP-MS, Rev. Analytica 2006, **25**, 76-83.
- [25] A. Sanz-Mendel, M. Montes-Bayón, M. L. F. Sánchez, M. L. F. Trace element speciation by ICP- a large bio molecules and its potential for proteomics, Anal. Bioanal. Chem. 2003, **377**, 236-247.
- [26] J. A. C. Broekaert, Analytical atomic spectrometry with flames and plasmas. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 1a edição (2002), Weinheim, Alemanha, 375 p.
- [27] H. H. Huang, Q. Zhang, J. Chen, Z. X. Zhuang, X. R. Wang, F. S. C. Lee. Bioaccumulation of metals and induction of metallo- thioneins in selected tissues of common carp (*Cyprinus carpio L.*) co-exposed to cadmium, mercury and lead, Appl. Organomet. Chem. 2007, **21**, 101-107.
- [28] R. G. Wuilloud, S. S. Kannamkumarath, J. Caruso. Speciation of nickel, copper, zinc, and manganese in different edible nuts: a comparative study of molecular size distribution by SEC-UV-ICP-MS, Anal. Bioanal. Chem. 2004, **379**, 495-503.

- [29] S. J. Hill, Inductively coupled plasma spectrometry and its applications. Blackwell Publishing Ltd, 2a edição (2007), Oxford, Reino Unido, 427 p.
- [30] S. M. Nelms, ICP mass spectrometry handbook. Blackwell Publishing Ltd, 2a edição (2005), Oxford, Reino Unido, 498 p.
- [31] N. Herwig, K. Stephan, U. Panne, W. Pritzkow, J. Vogl. Multielement screening in milk and feed by SF-ICP-MS, Food Chem. 2011, **124**, 1223-1230.
- [32] A. Prange, D. Schaumlöffel. Hyphenated techniques for the characterization and quantification of metallothionein isoforms, Anal. Bioanal. Chem. 2002, **373**, 441- 453.
- [33] K. Wagner, K. Racaityte, K. K. Unger, T. Miliotis, L. E. Edholm, R. Bischoff, G. Marko-Varga. Protein mapping by two-dimensional high performance liquid chromatography, J. Chromatogr. A 2000, **893**, 293-305.
- [34] U. D. Neue, HPLC columns: theory, technology and practice. Wiley-VCH Inc., 1a edição (1997), Nova Iorque, Estados Unidos, 393 p.
- [35] K. D. Cole, S. L. Cousin. Size exclusion chromatography of soybean proteins and isoflavones, J. Agric. Food Chem. 1994, **42**, 2713-2720.
- [36] E. R. S. Kunji, M. Harding, P. J. G. Butler, P. Akamine. Determination of the molecular mass and dimensions of membrane proteins by size exclusion chromatography, Methods 2008, **46**, 62-73.
- [37] A. J. dos Santos Neto, Cromatografia líquida multidimensional e espectrometria de massas em tandem para análise direta de fármacos em fluidos biológicos: da escala convencional à miniaturizada, Tese de doutorado 2007, USP, 217 p.
- [38] S. Mounicou, J. Szpunar, R. Lobinski, D. Andrey, C. J. Blake. Bioavailability of cadmium and lead in cocoa: comparison of extraction procedures prior to size-exclusion fast-flow liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection (SEC-ICP-MS), J. Anal. At. Spectrom. 2002, **17**, 880-886.
- [39] A. Sussulini, G. H. M. F. Souza, M. N. Eberlin, M. A. Z. Arruda. Comparative metallomics for transgenic and non-transgenic soybeans, J. Anal. At. Spectrom. 2007, **22**, 1501-1506.
- [40] J. Naozuka, P. V. Oliveira. Cu, Fe, Mn and Zn distribution in protein fractions of brazil-nut, cupuassu seed and coconut pulp by solid-liquid extraction and electrothermal atomic absorption spectrometry, J. Braz. Chem. Soc. 2007, **18**, 1547-1553.
- [41] H. Reinecke, L. Dunemann. Does the supplementation of metal ions modify the intrinsic distribution of element species in food extracts?, Fresenius J. Anal. Chem. 1990, **338**, 630-634.
- [42] H. Fingerová, R. Koplík. Study of minerals and trace element species in soybean flour, Fresenius J. Anal. Chem. 1999, **363**, 545-549.
- [43] S. Yoshida. Distribution of molecular weight and chemical form of manganese compounds in soybean, Agric. Biol. Chem. 1988, **52**, 2149-2153.
- [44] A. Sussulini, J. S. Garcia, M. F. Mesko, D. P. Moraes, E. M. M. Flores, C. A. Perez, M. A. Z. Arruda. Evaluation of soybean seed protein extraction focusing metalloprotein analysis, Microchim. Acta 2007, **158**, 173-180.
- [45] S. Yoshida. Distribution of the molecular weight and chemical form of intrinsic iron compounds in soybeans, Agric. Biol. Chem. 1989, **53**, 1071-1075.

- [46] C. S de Magalhães, M. A. Z. Arruda. Sample preparation for metalloproteins analysis: A case study using horse chestnuts, *Talanta* 2007, **71**, 1958-1963.
- [47] A. S. Sandberg. Bioavailability of minerals in legumes, *Br. J. Nutr.* 2002, **88**, S281-S285.
- [48] S. Ambe. Moessbauer study of iron in soybean hulls and cotyledons, *J. Agric. Food. Chem.* 1994, **42**, 262-273.

CAPÍTULO 2

ESTUDOS METALÔMICOS DA SEMENTE DE SOJA TRANSGÊNICA E NÃO TRANSGÊNICA UTILIZANDO DUAS DIMENSÕES CROMATOGRÁFICAS

1. OBJETIVOS

Este capítulo tem como objetivo principal ampliar as informações sobre o metaloma de sementes de soja com o emprego de separações cromatográficas, comparando-o entre as sementes de soja T e NT.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica deste capítulo aborda conceitos básicos da metalômica, a cromatografia líquida de alta eficiência, bem como os dois mecanismos de separação utilizados: a cromatografia de exclusão por tamanho e cromatografia de troca aniônica. Além disso, a espectrometria de massas empregada na identificação de proteínas também é abordada.

2.1 Metalômica

A metalômica, como definida na introdução geral desta Tese, consiste na totalidade de espécies de metal e metaloides em uma célula ou tecido, sua identidade, quantidade e localização [1]. É um campo de pesquisa que deve estar em simbiose com a genômica e a proteômica, uma vez que a síntese e função metabólica de genes e proteínas não ocorre sem a presença de íons metálicos ou metaloenzimas.

Decifrar um metaloma trará as seguintes informações: (i) como um elemento está distribuído nos compartimentos celulares de um dado tipo celular; (ii) seu ambiente de coordenação, ou seja, em qual biomolécula é incorporado ou por qual bioligante é complexado, e (iii) a concentração individual das espécies presentes [1].

A maioria dos metais a baixas concentrações presentes em fluidos biológicos e órgãos estão ligados a várias proteínas, que são chamadas metaloproteínas. Uma metaloproteína é definida como uma proteína cuja função é conferida por um metal (a proteína deve se ligar a um íon metálico para

desempenhar sua função). Essa função pode ser atividade catalítica, implicação na reação de transferência de elétrons de íons metálicos redox ativos ou estabilização da estrutura terciária ou quaternária da proteína [2]. As metaloproteínas são chamadas metaloenzimas quando funcionam como catalisadores biológicos que regulam reações biológicas e funções fisiológicas em células e órgãos [3]. Existem proteínas, como as metalotioneínas, que são expressas como mecanismo de defesa de um organismo contra o estresse causado por metais potencialmente tóxicos. As bases moleculares de muitos processos bioquímicos metal-dependentes continuam não descritas, e os mecanismos pelos quais o metal é percebido, armazenado ou incorporado como cofator em uma célula também são pouco conhecidos [4].

Um trabalho envolvendo metalômica comparativa de sementes de soja T e NT foi realizado por Sussulini *et al.* [5]. As proteínas das sementes de soja foram separadas usando 2D-PAGE (eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida), digeridas tripticamente, identificadas por MALDI-Q-TOF/MS e mapeadas usando espectrometria de raios-X com radiação síncrotron. Foram encontrados os seguintes íons metálicos: Ca(II), Cu(II), Fe(II), Mn(II), Ni(II) e Zn(II). O perfil quantitativo dos íons foi adquirido usando a espectrometria de absorção atômica, e foram encontradas mudanças no teor de metais das sementes de soja T e NT.

A determinação do metaloma de um organismo envolve técnicas de separação associadas a técnicas como a espectrometria de massas (MS), que constituem as principais etapas da proteômica em geral: separação e subsequente identificação das proteínas [6]. A 2D-PAGE é uma técnica de separação bastante empregada para estudos metalômicos, pois possibilita alta resolução e seletividade, podendo ser aplicada a várias amostras [7]. Na primeira dimensão, as proteínas são separadas de acordo com seus pontos isoelétricos em um gel com gradiente de pH. Na segunda dimensão, um complexo carregado negativamente é formado após a adição de dodecil sulfato de sódio (SDS), e a migração através do campo elétrico é regida pela massa molar das proteínas [6, 8]. Para atingir uma maior faixa dinâmica de análise e aumentar a produtividade

analítica, várias separações cromatográficas têm sido propostas como técnica alternativa ou complementar à 2D-PAGE.

Além da 2D-PAGE, a separação por HPLC também pode ser empregada para esse fim. Assim, a seguir será discutida uma das técnicas de separação utilizadas neste trabalho, a HPLC.

2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A HPLC é uma técnica analítica usada para separar uma mistura [9], sendo as separações realizadas baseadas nas diferentes interações proteína-superfície e proteína-fase móvel. Vários modos cromatográficos podem ser empregados visando separação de proteínas, tais como troca-iônica (IEX), interação hidrofóbica (HIC), fase reversa (RP) e exclusão por tamanho (SEC).

Nesta Tese, após a utilização da SEC, mostrada no capítulo anterior, um novo fracionamento usando mecanismo de separação independente foi feito para gerar resultados mais detalhados e atingir um grau de pureza das espécies de metal suficiente para sua identificação com espectrometria de massas [4]. Aqui, a cromatografia de troca iônica foi utilizada como segunda dimensão de separação.

A cromatografia de troca iônica é um método eficiente para purificação de várias biomoléculas que podem ser separadas com base na diferença de cargas [10], como é o caso das proteínas. O mecanismo de retenção envolve atração eletrostática entre os analitos e os grupos funcionais da fase estacionária, com cargas opostas [11, 12].

Em solução, proteínas e outras biomoléculas são ionizadas, e a extensão dessa ionização depende do pH. Para uma dada proteína, o pH no qual a carga total da proteína é zero é conhecido como ponto isoelétrico. Então, sob condições definidas de fase móvel, uma mistura de biopolímeros pode ser separada usando a troca-iônica [11, 13]. As moléculas não retidas (*i. e.*, moléculas neutras, sem carga, ou moléculas com mesma carga da fase estacionária) são removidas por meio de procedimentos de lavagem, e as biomoléculas ligadas são recuperadas

por eluição com um tampão de maior força iônica ou por alteração das condições de pH [14].

Os trocadores iônicos são compostos de um suporte sólido com estrutura porosa onde estão ligados grupos químicos ionizáveis. Uma grande variedade de grupos tem sido descrita, e estes são classificados em duas categorias [15]:

- 1) Trocadores aniônicos, que possuem grupos positivamente carregados ligados no suporte, e irão atrair analitos negativamente carregados, ou
- 2) Trocadores catiônicos, que possuem grupos negativamente carregados imobilizados no suporte, e irão atrair analitos positivamente carregados.

Cada uma dessas categorias pode ser dividida em dois sub-tipos: trocadores fortes (troca catiônica [SCX] e aniônica [SAX]), e fracos (trocadores catiônicos [WCX] e aniônicos [WAX]), dependendo do grupo funcional ligado. A diferenciação entre grupos iônicos fortes e fracos é feita com base no intervalo de valores de pH sobre o qual os grupos apresentam cargas elétricas. Grupos fortes, tipicamente contendo grupos de ácido sulfônico (trocadores catiônicos) ou grupos de amina quaternária (trocadores aniônicos), estão ionizados em todos os valores de pH de trabalho da coluna, enquanto os grupos fracos podem ser carregados ou não, dependendo do valor do pH [16].

Para proteínas, em valores de pH abaixo do ponto isoelétrico a carga total da proteína é positiva, e a proteína deve se ligar a um trocador de cátions. Em valores de pH maiores que o ponto isoelétrico, a carga total é negativa, e a proteína deve se ligar a um trocador aniônico [16].

Existem diversas vantagens no uso da troca iônica, que incluem [14]: alto poder de resolução, rapidez das separações, altas recuperações (em geral), componentes da fase móvel geralmente são não desnaturantes e frequentemente compatíveis com posteriores separações cromatográficas, pode servir como processo de concentração para recuperar proteínas de soluções diluídas. Ainda, pode ser uma modalidade cromatográfica altamente seletiva, sendo capaz de separar, por exemplo, proteínas que diferem em um único grupo carregado.

As desvantagens são poucas, mas incluem: a concentração das soluções após a corrida cromatográfica pode resultar em altas concentrações de sal; a

instrumentação cromatográfica deve ser resistente à corrosão induzida por sais. Ainda, há uma alta concentração de sais no tampão de eluição, que pode levar a um processo de adsorção da proteína na fase estacionária, resultando em perdas, e também incompatibilidade com técnicas de espectrometria de massas orgânica [14, 17].

As aplicações desse mecanismo de separação são inúmeras, desde separações em escala analítica em laboratório, até colunas de escala preparativa em nível industrial [18]. É uma técnica amplamente usada em bioseparações, já que peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos e biopolímeros relacionados possuem domínios químicos ionizáveis, o que os torna suscetíveis ao aumento ou à diminuição de carga, como função de mudanças no valor de pH e na força iônica. Ainda, pode ser usada para separação de biomoléculas grandes, com massas molares maiores que 60 kDa [11, 12, 19].

2.3 Espectrometria de massas para caracterização de proteínas – ionização empregando *electrospray* (ESI)

Atualmente, a espectrometria de massas associada à bioinformática tornou-se essencial em estudos envolvendo proteínas, devido não apenas à sua sensibilidade, mas, também, ao conteúdo total de informações que pode ser obtido [20].

Uma técnica muito usada para transferência das proteínas para a fase gasosa é a ionização por *electrospray* (ESI, do inglês *electrospray ionization*), que permite a formação de íons na fase gasosa por meio de um processo brando de ionização, possibilitando a análise de compostos não-voláteis e termolábeis. Conseqüentemente, o uso da ESI na espectrometria de massas facilitou muito a análise de biomoléculas grandes, bem como drogas e seus metabólitos [21].

Como o nome sugere, a base dessa técnica está no uso de um forte campo elétrico para criar um excesso de carga na ponta de um capilar contendo o analito em solução. Quando um potencial positivo é aplicado, os íons positivos tendem a se afastar para a região menos positiva, ou seja, para o contra eletrodo. Conforme

a densidade de carga aumenta na gota, o campo elétrico formado entre o capilar e o contra eletrodo aumenta provocando uma deformação na gota que está presa à ponta do capilar. A gota ganha forma e permanece presa ao capilar até o momento em que a densidade de carga na superfície da gota e o aumento da repulsão entre os íons vence a tensão superficial, ocorrendo a liberação de pequenas gotas com alta densidade de carga. Os íons em fase gasosa são então transportados por diferentes estágios de vácuo, até chegarem ao detector para serem analisados [22, 23].

Hoje a técnica de *electrospray* é a mais usada para análises de amostras na forma líquida. Por ionizar amostras diretamente na forma líquida, é compatível com técnicas de separação cromatográficas usadas em química analítica [24].

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparo de soluções e limpeza de materiais

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

Antes do uso, todos os frascos plásticos, vidrarias e demais materiais de laboratório foram lavados e colocados em banho de ácido nítrico 10% v/v (Merck, Darmstadt, Alemanha) por no mínimo 12 h. Posteriormente, foram lavados utilizando água deionizada e secos em estufa, exceto materiais volumétricos, secos à temperatura ambiente.

3.2 Amostras

As sementes de soja T e NT foram as mesmas utilizadas no Capítulo 1. Maiores detalhes, vide o item 3.2 daquele capítulo. Para cada separação foram utilizadas aproximadamente 3 sementes de soja.

3.3 Instrumentação

Todas as análises cromatográficas foram realizadas usando um cromatógrafo PerkinElmer Series 200 (PerkinElmer, Shelton, EUA), equipado com uma bomba quaternária, degaseificador, auto-amostrador, forno para coluna e detector de arranjo de diodos. O cromatógrafo foi acoplado com um ICP-MS quadrupolo (modelo ELAN[®] DRC-e, PerkinElmer, Shelton, Estados Unidos), e detecção simultânea UV (280 nm) e ICP-MS foi realizada. Parâmetros instrumentais estão descritos na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Parâmetros instrumentais

Condições de separação cromatográfica	
1ª dimensão cromatográfica (SEC)	
Coluna	Superdex 75 10/300 GL
Dimensões da coluna	10x300 mm, tamanho médio de partícula 13 µm
Fase móvel	Tampão acetato de amônio 100 mmol L ⁻¹ , pH 7,2
Vazão	0,5 mL min ⁻¹
Tempo de corrida	72 min
Volume de injeção	60 µL
2ª dimensão cromatográfica (AEX)	
Fase móvel	PRP X 500
Dimensões da coluna	4,6 x 150mm, tamanho de partícula 7 µm
Fase móvel	A TRIS 10 mmol L ⁻¹ B TRIS 10 mmol L ⁻¹ + acetato de amônio 0,5 mol L ⁻¹
Vazão	1,0 mL min ⁻¹
Tempo de corrida	22 min
Volume de injeção	100 µL
Condições de operação ICP-MS	
Potência de radiofrequência	1200 W
Vazão do gás nebulizador	0,94 L min ⁻¹
Vazão do gás do plasma	15 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	1,2 L min ⁻¹
Nebulizador	Meinhard
Câmara de nebulização	Ciclônica
Isótopos monitorados	²⁴ Mg, ⁵⁴ Fe, ⁵⁵ Mn, ⁵⁷ Fe, ⁵⁹ Co, ⁶² Cu, ⁶⁶ Zn

As condições de operação do ICP-MS, resumidas na Tabela 2.1, foram

verificadas diariamente usando padrão aquoso multi elementar (PerkinElmer, Shelton, Estados Unidos) contendo Mg, Al, Cr, Mn, Cu, Rh, Cd, In, Ce, Pb, Th, U e Ba (na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada elemento, exceto para Ba cuja concentração era igual a $10 \mu\text{g L}^{-1}$).

3.4 Reagentes e soluções

Uma solução padrão multielementar para ICP número VI (Merck) foi usada para preparo das curvas de calibração. Acetato de amônio, acetonitrila e éter de petróleo foram adquiridos da empresa J. T. Baker (Phillipsburg, EUA). TRIS foi adquirido da Amershan Biosciences (Uppsala, Suécia). Os reagentes empregados para digestão das proteínas (iodacetamida, ditioneitol, bicarbonato de amônio e ácido fórmico) foram obtidos da Amershan Biosciences e Mallinkrodt (Saint Louis, EUA). A tripsina, grau espectrometria de massas, foi adquirida da Promega (Madison EUA).

3.5 Extração das proteínas das sementes de soja

Para a extração das proteínas para a primeira dimensão cromatográfica, 0,3g de sementes de soja foram congeladas usando nitrogênio líquido, maceradas com almofariz e pistilo. Os lipídios foram removidos usando éter de petróleo, em um procedimento que se repetiu por 3 vezes, com um tempo de 15min cada uma [5]. Depois, as proteínas foram extraídas com 3 mL de tampão acetato de amônio 100 mmol L^{-1} (pH 7,2). As amostras foram agitadas por efeito vortex por 15 min, e o material insolúvel foi removido por centrifugação durante 5 min a $5000 g$ usando uma ultra-centrífuga Bio-Spin-R (BioAgency, São Paulo, Brasil).

3.6 Coleta das frações

Os eluatos das colunas de SEC e AEX foram coletados por dez e duas injeções, respectivamente, usando um coletor de frações Gilson Inc (Middletown,

EUA) em intervalos de tempo que representam a eluição das frações contendo metal previamente identificadas com o emprego do ICP-MS.

O efluente da coluna de HILIC foi coletado por duas injeções em intervalos de 5 min até o fim da corrida para posterior quantificação dos metais no modo *off-line*.

3.7 Liofilização

Na primeira dimensão cromatográfica, 3 frações contendo metais foram identificadas. Foram realizadas 10 separações, e o conjunto dessas frações foi congelado em nitrogênio líquido e liofilizadas usando liofilizador Labconco (Kansas City, EUA).

Após a segunda dimensão cromatográfica utilizando troca aniônica, as frações previamente identificadas contendo metal foram liofilizadas após duas injeções antes de passarem por um procedimento de digestão triptica para identificação das proteínas em cada fração.

3.8 Digestão com tripsina

As frações liofilizadas foram ressolubilizadas em bicarbonato de amônio 50 mmol L⁻¹. Em um primeiro momento, foi adicionado ditioneitol às amostras para promover a redução das proteínas. Após 30 min a 60 °C foi adicionada iodacetamida às amostras para promover a alquilação das proteínas. Após 30 min a temperatura ambiente, a tripsina foi adicionada, e o procedimento de digestão foi realizado por 16 h a 37 °C. A reação foi interrompida utilizando-se 1% (v/v) de ácido fórmico.

3.9 Identificação das proteínas

Os espectros foram obtidos em um equipamento Q-Tof Ultima (Waters Co., Milford, EUA). Uma alíquota dos peptídeos foi inicialmente separada

usando um equipamento de nanoUPLC (Waters Co.) equipado com coluna C18 (75µm x 100 mm) acoplado ao espectrômetro de massas, o qual possui uma fonte de nano *electrospray* com uma vazão de 0,6 µL min⁻¹. Os peptídeos foram eluídos em um gradiente de 2-90% de acetonitrila em ácido fórmico 0,1% (v/v).

A ferramenta de busca MASCOT versão 2.3 foi usada para processar os dados gerados no espectrômetro de massas. As buscas foram feitas nos bancos de dados NCBI e SwissProt, que contêm proteínas gerais, utilizando os seguintes parâmetros: digestão com tripsina, carbamidometilação como modificação fixa, oxidação em metionina como modificação variável, e erro em massa de 0,1 Da.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Estudos usando SEC-ICP-MS

Moléculas solúveis das sementes de soja, extraídas usando tampão acetato de amônio 100 mmol L⁻¹, foram separadas por SEC. Detecção simultânea *on-line* UV a 280 nm e ICP-MS foi realizada a fim de obter informações sobre a distribuição de Co, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn de acordo com massa molar nos extratos. Resultados para eluição dos extratos sob influência de tampão acetato de amônio 100 mmol L⁻¹ (pH 7,2) são mostrados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Tempo de retenção para os elementos na separação usando SEC-ICP-MS para sementes de soja T e NT

Elemento	Tempo de retenção (min)	
	T	NT
Co	15,5	17,7
	21,7	23,7
	32,5	32,1
Cu	16,1	17,0
	24,7	25,3
	31,1	32,0
Fe	16,6	17,1
	28,5	29,5
Mg	19,9	19,7
	35,8	37,0
Mn	19,9	19,7
	35,8	38,0
Zn	20,4	20,1
	33,6	32,1

Analisando os tempos de retenção na Tabela 2.2, é possível perceber que existem 3 frações principais de metais, exemplificadas na Figura 2.1 utilizando sinais para Cu. A primeira corresponde a massas molares de 38,1 a 181,1 kDa (15-21 min), a segunda de 8,2 a 17,7 kDa (24-27 min) e a terceira de 0,4 a 3,8 kDa (30-39 min). Pode-se presumir que uma porção substancial dos elementos está associada a proteínas e peptídeos.

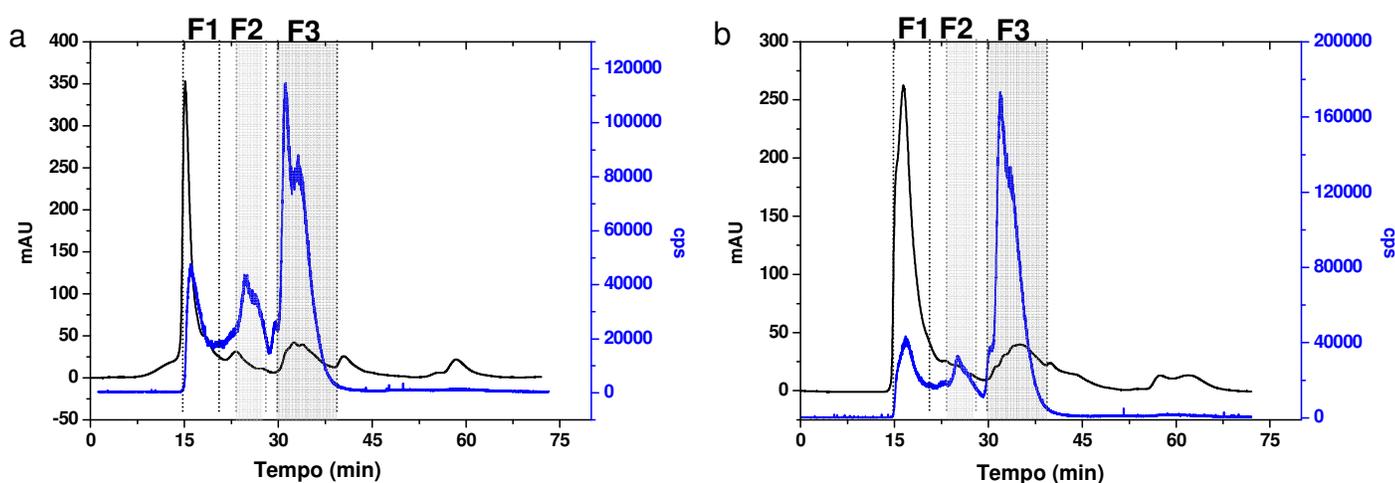


Figura 2.1 - Cromatogramas de SEC-ICP-MS de sementes de soja T (a) e NT (b). Perfis de absorção no UV a 280 nm (—) e de resposta para o Cu (—), evidenciando as 3 frações contendo metais encontradas: F1 = 38,1 a 181,1 kDa; F2 = 8,2 a 17,7 kDa e F3 = 0,4 a 3,8 kDa.

Os compostos separados estritamente com base na exclusão molecular deveriam ser eluídos entre 18,7 e 30,9 min. Alguns componentes dos extratos foram eluídos fora deste intervalo, como resultado das interações com a matriz de gel da coluna, que gera mecanismos secundários de separação, como troca iônica. Portanto, a estimativa de massa molar das frações deve ser julgada com cuidado. Deve-se também destacar que não se pode assumir que os sinais dos elementos nos cromatogramas representam espécies químicas individuais em termos de estrutura química.

Três sinais para o Co foram encontrados nos cromatogramas, o sinal mais abundante encontrado na região de baixa massa molar (< 3 kDa).

A fração mais abundante de Cu foi eluída na faixa de baixa massa molar, o mesmo acontecendo com Mg.

O Fe foi encontrado ligado à fração de alta massa molar, e tem baixa solubilidade, como já foi demonstrado em trabalho publicado utilizando os dados obtidos no capítulo anterior desta Tese [25], onde aproximadamente 50% do Fe foi extraído usando solução aquosa. A massa molar do principal composto de Fe solúvel é menor que 100 kDa, e este composto possui ligação muito estável com este elemento. Algumas metaloproteínas específicas, como a lipoxigenase, ou quelantes não-específicos de Fe também contribuem para a presença de Fe na soja [26].

As porções de Mn ligados a compostos estáveis são encontrados em duas frações, com massas entre 54,0 e 0,6 kDa. Relatos de baixa estabilidade de compostos de Mn em soja são encontrados na literatura [27], onde se diz que Mn é liberado da espécie solúvel original provavelmente como cátions inorgânicos Mn^{2+} e Mn^{3+} , que pode ser absorvido no suporte de gel da coluna SEC.

Compostos estáveis de Zn em sementes de soja T e NT são distribuídos em duas frações. A fração mais abundante de Zn é encontrada na região de baixa massa molar.

4.2 Estudos usando AEX-ICP-MS

Após a identificação das frações de metais usando a SEC, e suas coletas, como descrito na seção de materiais e métodos, investigações posteriores foram feitas usando cromatografia de troca iônica. Os resultados estão mostrados nas figuras a seguir.

Na fração 1, que corresponde a massas molares variando entre 181,1 e 38,1 kDa, 3 metais apresentaram sinais após separação com AEX, como pode ser observado nas Figuras 2.2, 2.3 e 2.4: dois sinais de Mg, um de Fe e um para Mn. Assim, foram coletadas 3 sub-frações para posterior digestão e identificação das proteínas: sub-fração 1.1 (coletada de 1 a 3 min de corrida); sub-fração 1.2 (coletada de 4 a 7,5 min de corrida); sub-fração 1.3 (coletada de 10 a 13 min de corrida).

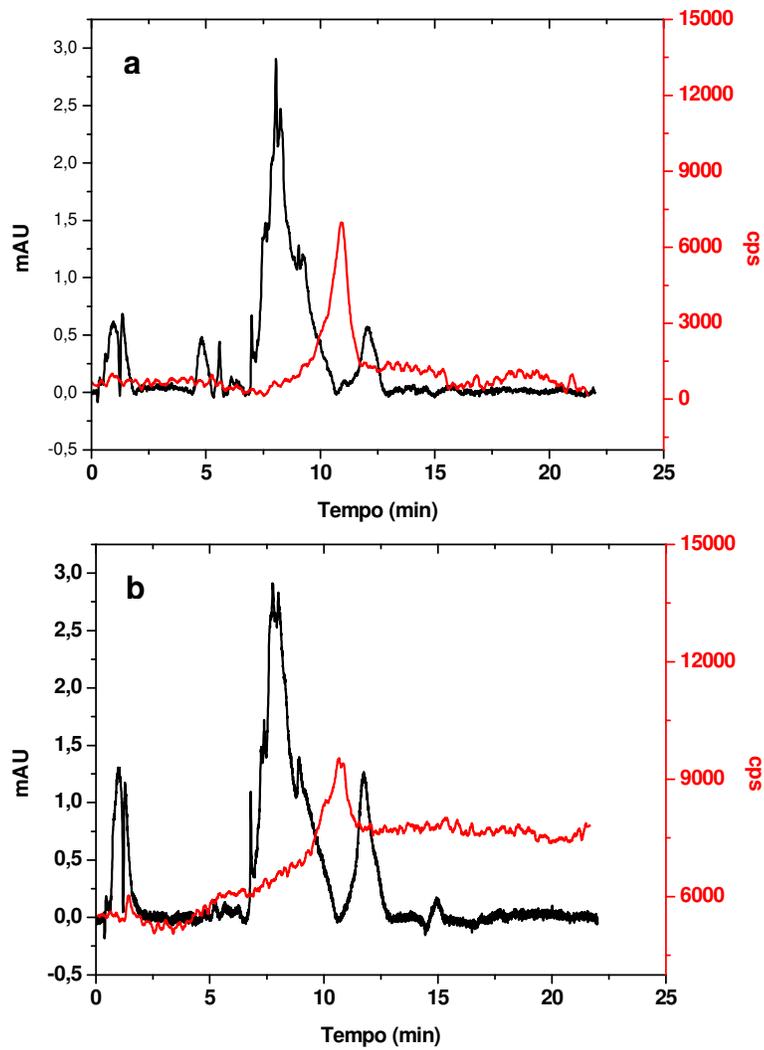


Figura 2.2 - Cromatogramas de IEX-ICP-MS de sementes de soja T (a) e NT (b). Perfis de absorção no UV a 280 nm (—) e de resposta para o Fe (—). Fração da SEC utilizada para injeção na segunda dimensão : 1.

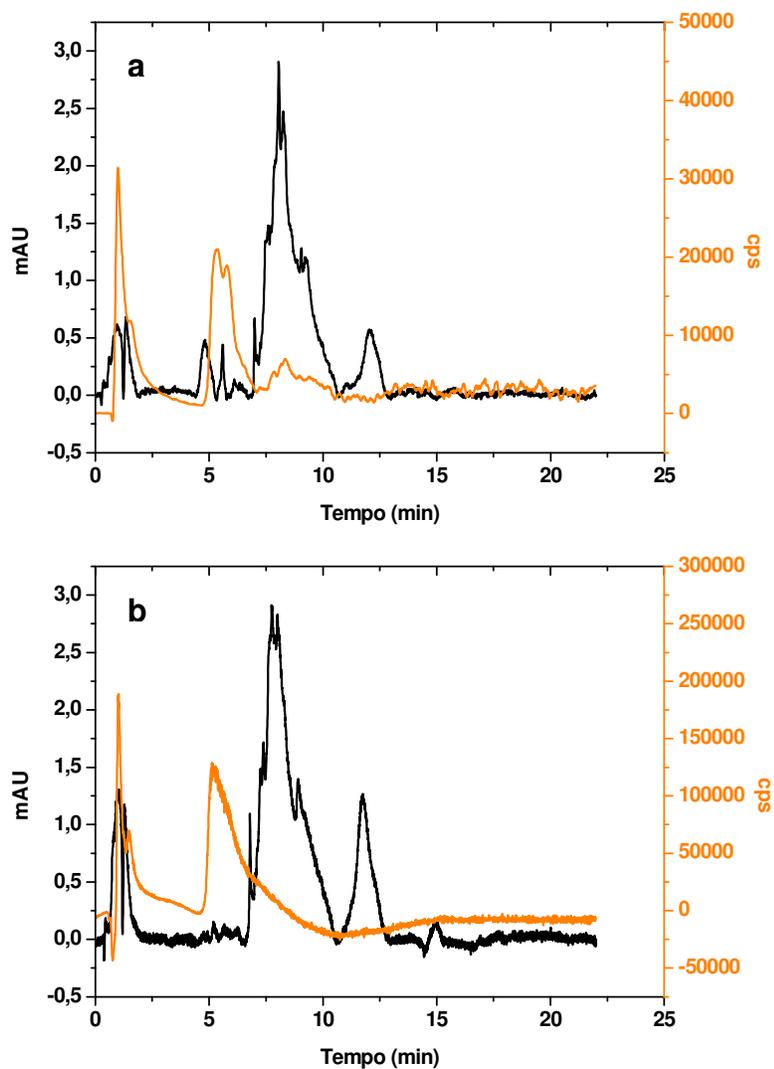


Figura 2.3 - Cromatogramas de IEX-ICP-MS de sementes de soja T (a) e NT (b). Perfis de absorção no UV a 280 nm (—) e da resposta para o Mg (—). Fração da SEC utilizada para injeção na segunda dimensão : 1.

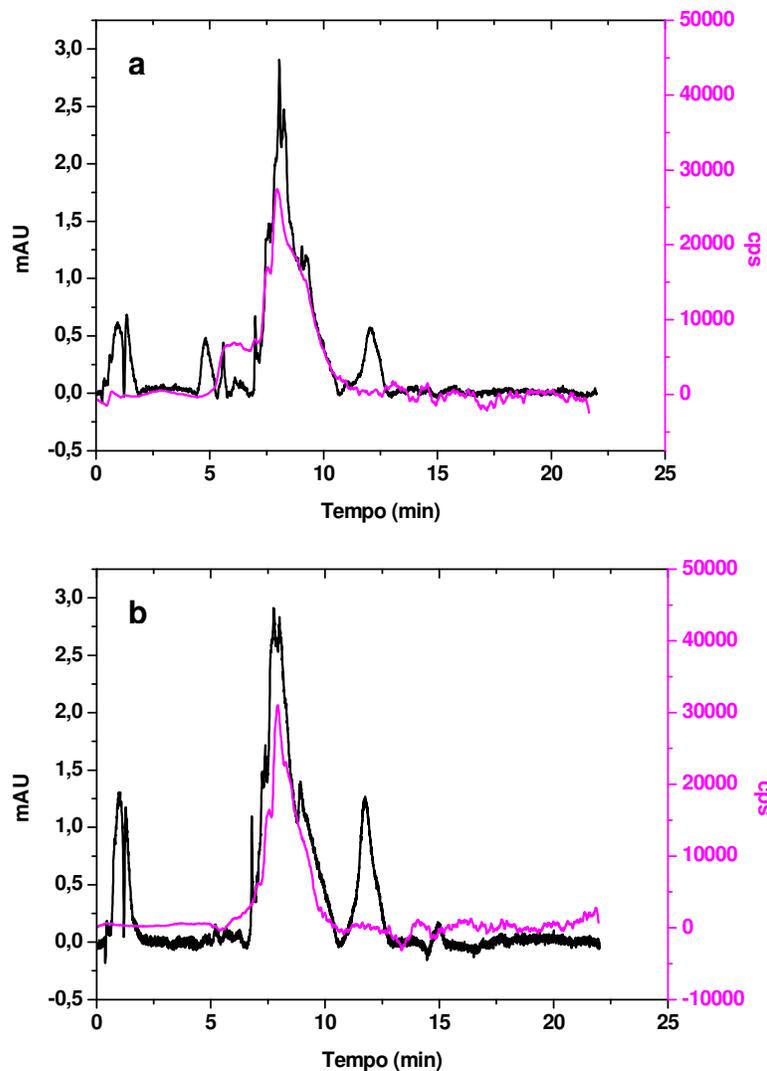


Figura 2.4 - Cromatogramas de IEX-ICP-MS de sementes de soja T (a) e NT (b). Perfis de absorção no UV a 280 nm (—) e da resposta para o Mn (—). Fração da SEC utilizada para injeção na segunda dimensão : 1.

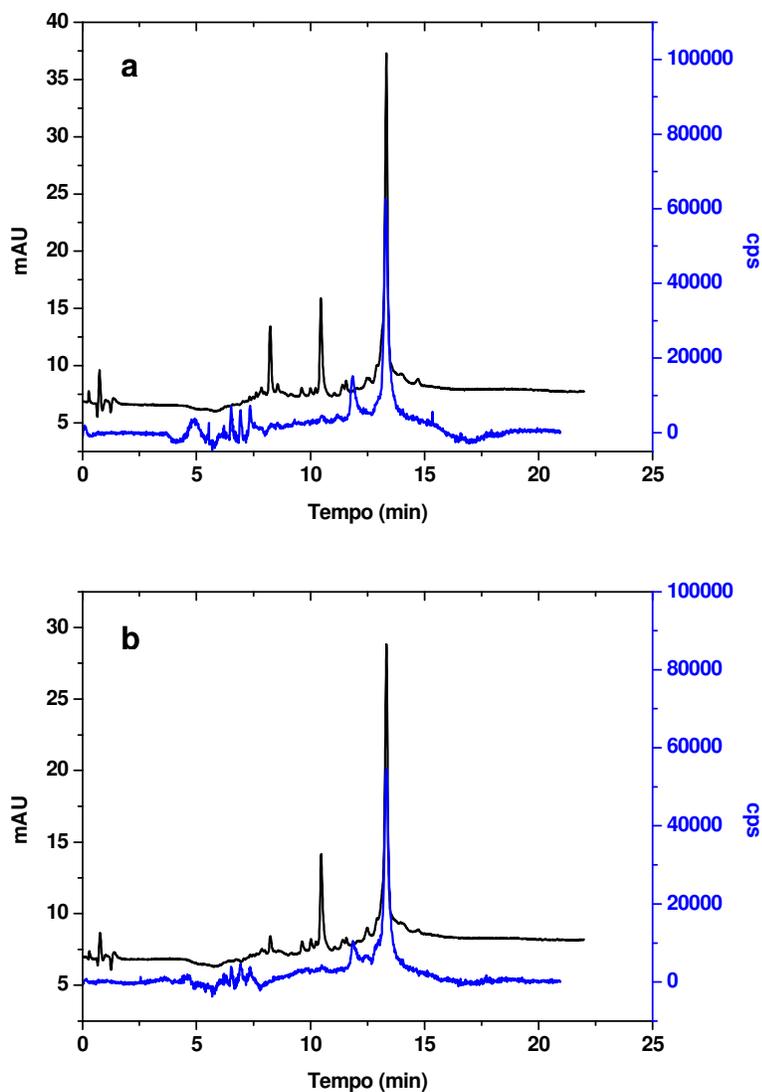


Figura 2.5 - Cromatogramas de IEX-ICP-MS de sementes de soja T (a) e NT (b). Perfis de absorção no UV a 280 nm (—) e da resposta para o Cu (—). Fração da SEC utilizada para injeção na segunda dimensão : 2.

Na fração 2, correspondendo a massas molares entre 17,7 e 8,2 kDa, apenas o Cu foi detectado, como mostra a Figura 2.5. Sendo assim, somente uma fração foi coletada: sub-fração 2 (coletada entre 12 e 15 min de corrida).

Na fração 3, que corresponde à fração de baixa massa molar, onde os sinais mais abundantes de metais de quase todos os elementos estudados (exceto Fe) foram separados em SEC, também a maior quantidade de sinais foi encontrada usando o segundo mecanismo de separação: dois sinais para Co, um

sinal para Cu, dois sinais para Mg, dois para Mn e dois para Zn. Os resultados podem ser vistos nas Figuras 2.6-2.10. Nesta fração foram coletadas 3 sub-frações: sub-fração 3.1 (coletada entre 1 e 4 min de corrida); sub-fração 3.2 (coletada entre 5 e 9 min de corrida) e sub-fração 3.3 (coletada entre 12 e 15 min de corrida).

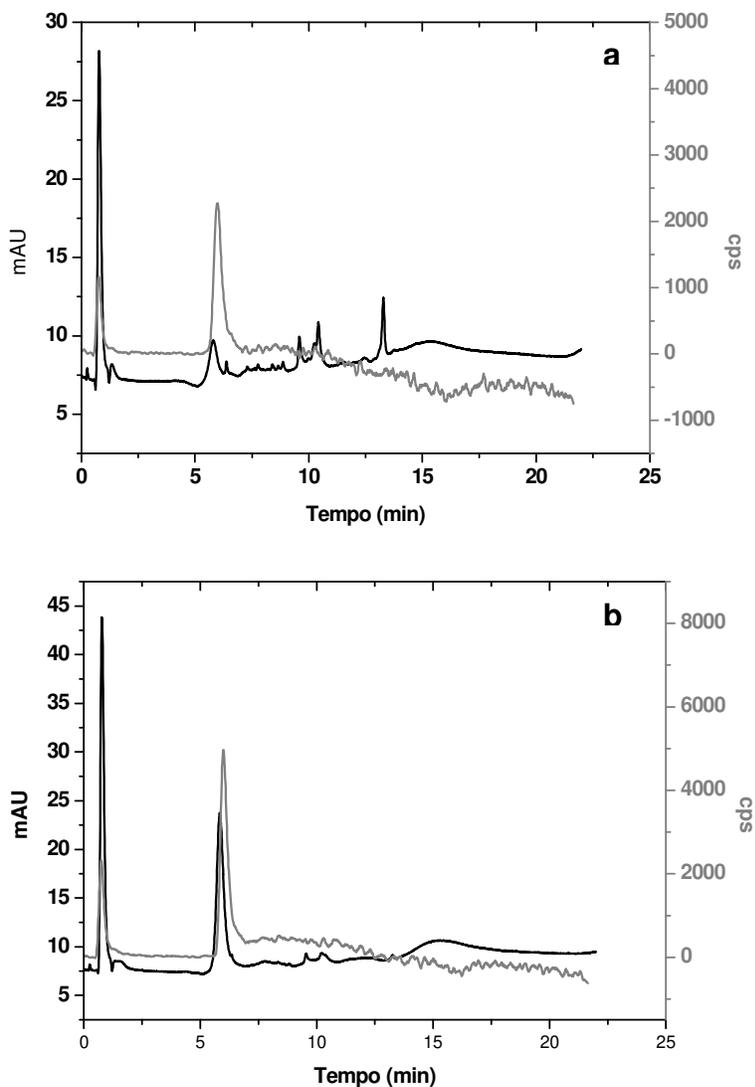


Figura 2.6 - Cromatogramas de IEX-ICP-MS de sementes de soja T (a) e NT (b). Perfis de absorção no UV a 280 nm (—) e da resposta para o Co (---). Fração da SEC utilizada para injeção na segunda dimensão : 3.

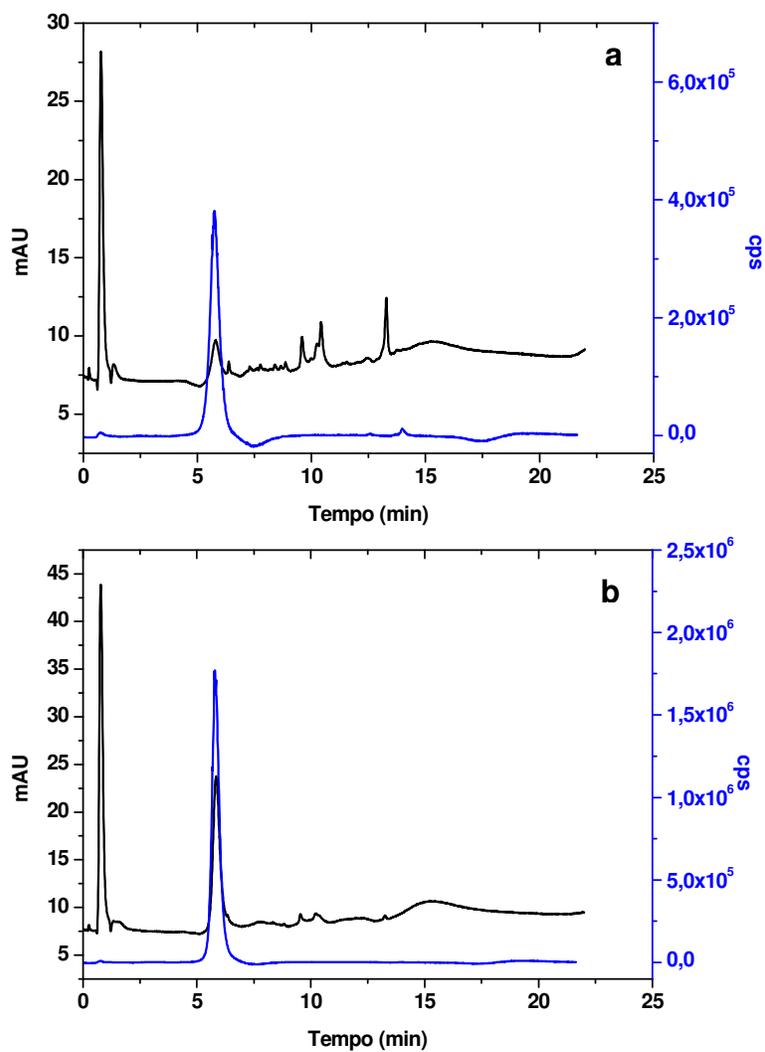


Figura 2.7 - Cromatogramas de IEX-ICP-MS de sementes de soja T (a) e NT (b). Perfis de absorção no UV a 280 nm (—) e da resposta para o Cu (—). Fração da SEC utilizada para injeção na segunda dimensão : 3.

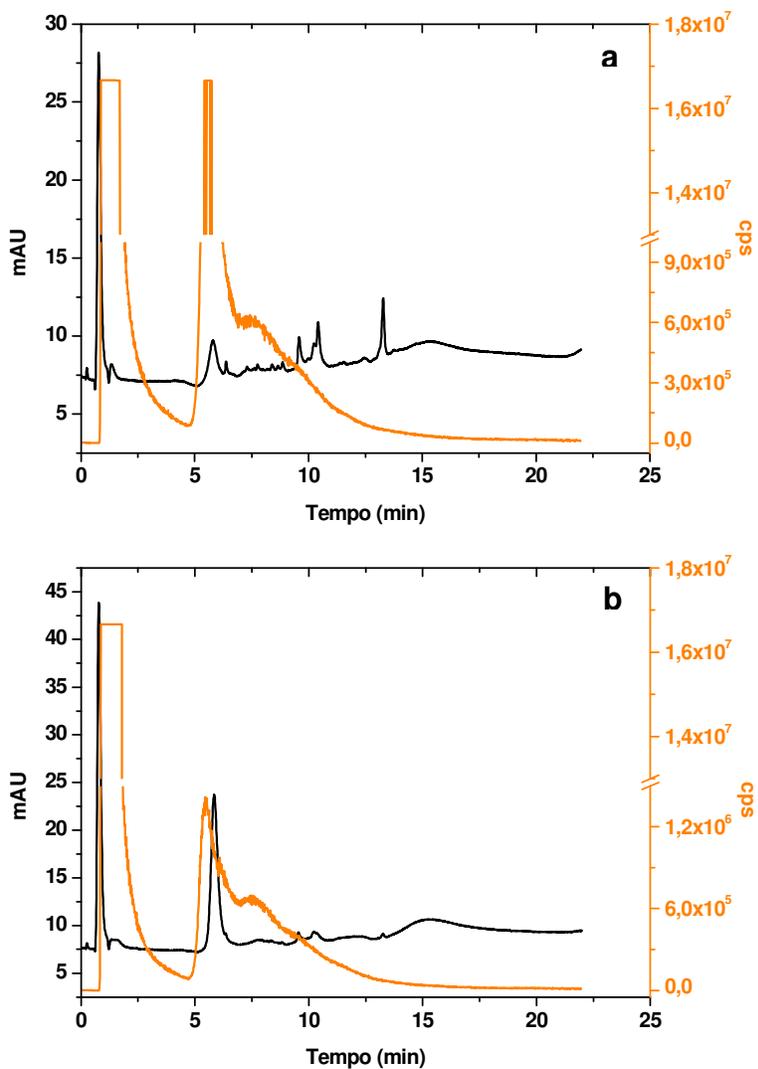


Figura 2.8 - Cromatogramas de IEX-ICP-MS de sementes soja T (a) e NT (b). Perfis de absorção no UV a 280 nm (—) e da resposta para o Mg (—). Fração da SEC utilizada para injeção na segunda dimensão : 3.

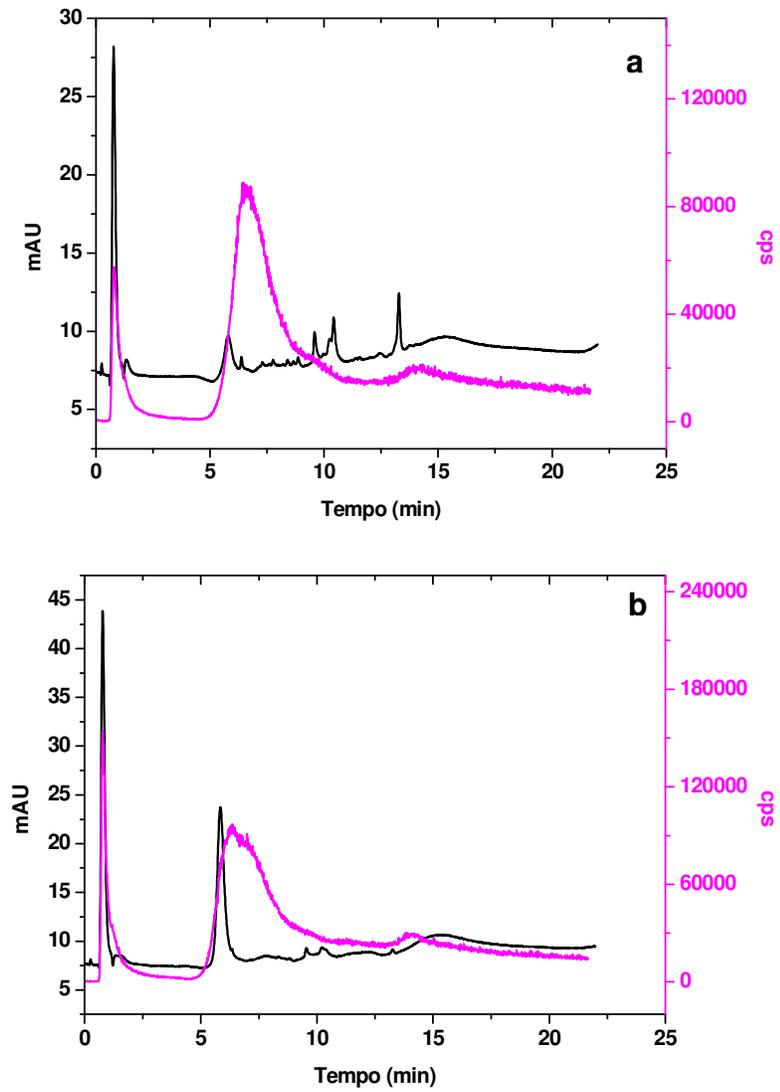


Figura 2.9 - Cromatogramas de IEX-ICP-MS de sementes de soja T (a) e NT (b). Perfis de absorção no UV a 280 nm (—) e da resposta para o Mn (—). Fração da SEC utilizada para injeção na segunda dimensão : 3.

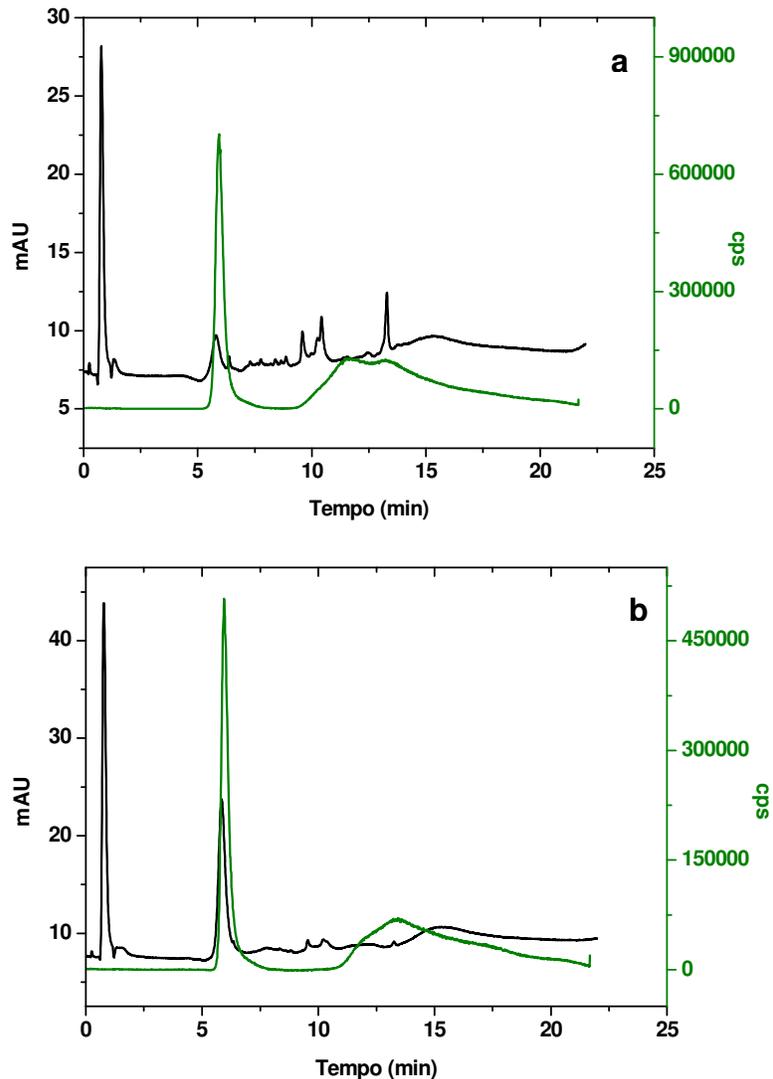


Figura2. 10 - Cromatogramas de IEX-ICP-MS de sementes de soja T (a) e NT (b). Perfis de absorção no UV a 280 nm (—) e da resposta para o Zn (—). Fração da SEC utilizada para injeção na segunda dimensão : 3.

A presença de vários sinais mostra a presença de mais de uma espécie se ligando aos metais estudados, e um segundo mecanismo de separação aumenta a possibilidade de identificação dessas espécies.

4.3 Identificação das proteínas

Após a separação por troca aniônica, as sub-frações foram digeridas e levadas ao espectrômetro de massas para identificação das proteínas. Os resultados estão mostrados na Tabela 2.3, onde as proteínas identificadas estão com o nome em inglês, como comumente encontrado na literatura.

Tabela 2.3 – Identificação das proteínas presentes nas sub-frações 1.1, 1.2, 1.3, 2, 3.1, 3.2 e 3.3. Todas as proteínas listadas na tabela foram identificadas como sendo proteínas de soja (*Glycine max*).

Proteína identificada	Massa molar (Da)	Score	Cobertura (%)	Código de acesso
Sub-fração F1.1				
Seed maturation protein PM30	15145	95	9	gi 4838147
Late embryogenesis abundant protein	50613	83	5	gi 170010
Seed maturation protein PM25	25827	285	42	gi 6648966
Seed maturation protein LEA 4 OS=Glycine max PE=4 SV=1	17595	95	25	Q541U1_SOYBN
Sub-fração F1.2				
Seed maturation protein PM25	25827	489	69	gi 6648966
Seed maturation protein PM26	26201	441	65	gi 6648968
Seed maturation protein PM24	26938	90	26	gi 6648964
Late embryogenesis abundant protein	50613	266	29	gi 170010
35 kDa seed maturation protein	35320	109	26	gi 4102190
Maturation-associated protein	23700	518	63	gi 170024

Recname: Full=Seed biotin-containing protein SBP65; alname: Full=Seed biotinylated protein of 65 kda	67894	76	5	gi 75102139
Lea protein	25354	68	18	gi 33303618
Maturation protein	25644	64	21	gi 170020
Unknown	32097	68	23	gi 255645839
Seed maturation protein PM30	15145	61	22	gi 4838147
Chain a, soybean agglutinin complexed with 2,6-pentasaccharide	27555	65	24	gi 6729836
Unknown	38544	45	3	gi 255647273
Unknown	27260	51	18	gi 255628279
Dehydrin	25261	94	32	gi 37495457
51 kda seed maturation protein	51065	56	17	gi 414977
Unknown	32097	53	14	gi 255645839

Sub-fração F1.3

Late embryogenesis abundant protein	50613	337	21	gi 170010
Seed maturation protein PM25	25827	273	58	gi 6648966
Seed maturation protein PM26	26201	204	57	gi 6648968

Seed maturation protein PM24	26938	176	50	gi 6648964
Chain a, soybean agglutinin complexed with 2,6-pentasaccharide	27555	192	21	gi 6729836
35 kda seed maturation protein	35320	97	34	gi 4102190
Maturation protein ppm32	18871	52	25	gi 5733686
Maturation-associated protein	23700	113	56	gi 170024
Seed lipoxygenase-1 OS=Glycine max GN=LOX1.1 PE=1 SV=2	94538	61	15	gi 126398
Unknown	32097	125	12	gi 255645839
Beta-conglycinin beta-subunit	50578	136	31	GLCB_SOYBN
Seed biotin-containing protein SBP65	67894	70	5	SBP65_SOYBN
Seed maturation protein PM30	15145	62	9	gi 4838147
Lectin	30909	62	30	LEC_SOYBN

Sub-fração F2

Chain a, soybean trypsin inhibitor	20310	212	49	gi 3318877
Napin-type 2S albumin 1 precursor	18393	90	45	gi 4097894
Seed maturation protein PM25	25827	87	40	gi 6648966

Seed maturation protein PM28	9506	47	49	gi 4836405
Recname: Full=Bowman-Birk type proteinase inhibitor C-II; Flags: Precursor	9993	155	45	gi 124029
Trypsin inhibitor subtype A	24346	61	35	gi 18770
Sub-fração F3.1				
Chain a, crystal structures of recombinant and native soybean beta- conglycinin beta homotrimers complexes with n-acetyl-d- glucosamine	47879	74	14	gi 21465628
Trypsin inhibitor C (Kunitz) - soybean	20382	59	16	gi 68821
Seed maturation protein PM30	15145	57	18	gi 4838147
Beta-conglycinin beta-subunit	50578	63	11	GLCB_SOYBN
18 kda seed maturation protein OS=Glycine max GN=GMPM1 PE=2 SV=1	17595	49	8	PM1_SOYBN
Sub-fração F3.2				
Seed maturation protein PM25	25827	211	63	gi 6648966
Seed maturation protein PM24	26938	63	28	gi 6648964
Maturation-associated protein	23700	121	36	gi 170024

Late embryogenesis-abundant protein	11485	110	36	gi 1762955
Unknown	11134	74	36	gi 255629381
Unknown	23257	55	18	gi 255637485
Late embryogenesis abundant protein	50613	52	11	gi 170010
Recname: Full=18 kda seed maturation protein	17595	45	18	gi 417494
Bowman-Birk proteinase isoinhibitor D-II	12343	40	11	gi 18572
<hr/>				
Sub-fração F3.3				
<hr/>				
Trypsin inhibitor subtype A	24346	83	31	gi 18770
<hr/>				

Foram identificadas 4 proteínas na sub-fração 1.1, 17 proteínas na sub-fração 1.2, 14 proteínas na sub-fração 1.2, 6 proteínas na sub-fração 2, 5 proteínas na sub-fração 3.1, 9 proteínas na sub-fração 3.2 e 1 proteína na sub-fração 3.3.

Pode-se perceber que foram encontradas uma maior quantidade de proteínas nas frações correspondentes à fração 1 da primeira dimensão cromatográfica (sub-frações 1.1, 1.2 e 1.3). Este resultado é esperado, pois, apesar de não conter os sinais mais abundantes correspondentes aos metais, esta apresenta o sinal mais intenso na absorção UV, indicando, possivelmente, maior quantidade de proteínas nesta fração.

Ainda, é possível verificar que existem proteínas que foram identificadas em mais de uma fração, como, por exemplo, seed maturation protein PM24, PM25, PM26, entre outras, que em sua maioria possuem função de crescimento e divisão celular e são comuns em sementes. Analisando as massas molares das proteínas encontradas em cada sub-fração, algumas são diferentes das faixas de massa molar previamente calculadas após a cromatografia de exclusão por tamanho. Este resultado pode ter duas explicações: as proteínas identificadas possuem estruturas diméricas (ou maiores), ou pode estar ocorrendo um segundo mecanismo de separação juntamente com a exclusão por tamanho, o que impede uma estimativa correta da massa molar.

A única metaloproteína identificada neste capítulo é a lipoxygenase 1, que foi encontrada na sub-fração 1.3 (onde está localizado único sinal de ferro encontrado na segunda dimensão de separação). Esta é uma enzima ligante de ferro que catalisa a hidroxidação de lipídios, e também está envolvida em vários aspectos da fisiologia da planta, tais como crescimento e desenvolvimento, resistência a pestes e respostas a ferimentos na planta [28].

5. CONCLUSÕES

As separações utilizando exclusão por tamanho acoplada ao ICP-MS permitiram a identificação de 3 frações que apresentaram metais: a primeira correspondendo a massas molares entre 181 e 38 kDa, a segunda correspondendo a massas molares entre 17,7 a 8,2 kDa, e a terceira correspondendo a massas molares entre 3,8 e 0,4 kDa. A pureza cromatográfica das frações de SEC para amostras complexas é baixa e as espécies ligadas aos metais geralmente não são identificadas. Por isso, a segunda dimensão cromatográfica foi implementada, utilizando a cromatografia de troca aniônica (AEX). Foram encontrados 3 sub-frações contendo metais na fração de alto massa molar (fração 1), uma sub-fração na fração de médio massa molar (fração 2) e 3 sub-frações na fração de baixo massa molar (fração 3). Após identificação das proteínas, foi encontrada uma metaloproteína ligante de ferro (lipoxygenase 1).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] S. S. Natarajan, C. Xu, H. Bae, B. A. Bailey, P. Cregan, T. J. Caperna, W. M. Garrett, D. Luthria. Proteomic and genetic analysis of glycinin subunits of sixteen soybean genotypes, *Plant Physiol. Biochem.* 2007, **45**, 436-444.
- [2] S. Mounicou, J. Szpunar, R. Lobinski. Metallomics: the concept and methodology, *Chem. Soc. Reviews* 2009, **38**, 1119-1138.
- [3] H. Haraguchi. Metallomics as integrated biometal science, *J. Anal. At. Spectrom.* 2004, **19**, 05-14.
- [4] R. Lobinski, D. Schaumlöffel, J. Szpunar. Mass spectrometry in bioinorganic analytical chemistry, *Mass Spectrom. Rev.* 2006, **25**, 255-289.
- [5] A. Sussulini, J. S. Garcia, M. F. Mesko, D. P. Moraes, E. M. M. Flores, C. A. Perez, M. A. Z. Arruda. Evaluation of soybean seed protein extraction focusing metalloprotein analysis, *Microchim. Acta* 2007, **158**, 173-180.
- [6] C. Xu, W. M. Garrett, J. Sullivan, T. J. Caperna, S. Natarajan. Separation and identification of soybean leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry, *Phytochem.* 2006, **67**, 2431-2440.
- [7] J. S. Garcia, C. S. Magalhães, M. A. Z. Arruda. Trends in metal-binding and metalloproteins analysis, *Talanta* 2006, **69**, 1-15.

- [8] K. Wagner, K. Racaityte, K. K. Unger, T. Miliotis, L. E. Edholm, R. Bischoff, G. Marko-Varga. Protein mapping by two-dimensional high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 2000, **893**, 293-305.
- [9] U. D. Neue, HPLC columns: theory, technology and practice. Wiley-VCH Inc., 1a edição (1997), Nova Iorque, Estados Unidos, 393 p.
- [10] M. A. O. Silva, L. R. V. Mataveli, M. A. Z. Arruda, Liquid chromatography for bioseparations: Fundamentals, developments and applications, *BrJAC* 2011, **1**, 234-245.
- [11] P. R. Levinson. Large-scale ion-exchange column chromatography of proteins: Comparison of different formats, *J. Chromatogr. B* 2003, **790**, 17-23.
- [12] A. Nordborg, E. F. Hilder. Recent advances in polymer monoliths for ion-exchange chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, **394**, 71-84.
- [13] E. P. Boschetti, in *Biochromatography: Theory and Practice*; M. A., Vijayalakshmi, Taylor & Francis: Londres, 2002, cap. 03.
- [14] M. I. Aguilar, in *HPLC of Peptides and Proteins methods and protocols*, volume 251; Humana Press Inc.: Totowa, 2004, cap. 03.
- [15] G. Xindu, L. Wang. Liquid chromatography of recombinant proteins and protein drugs, *J. Chromatogr. B* 2008, **866**, 133-153.
- [16] A B. Manadas, V. M. Mendes, J. English, M. J. Dunn. Peptide fractionation in proteomics approaches, *Expert Rev. Proteom.* 2010, **7**, 655-663.
- [17] L. Ly, V. C. Wasinger. Protein and peptide fractionation, enrichment and depletion: Tools for the complex proteome, *Proteom.* 2011, **11**, 513-534.
- [18] T. Peters Jr., in *All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications*, Academic Press: San Diego, 1995, Chap. 7.
- [19] S. Yamamoto, E. Miyagawa. Retention behavior of very large biomolecules in ion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* 1999, **852**, 25-30.
- [20] B. Domon, R. Aebersold. Mass spectrometry and protein analysis, *Science* 2006, **312**, 212-217.
- [21] R. Cozzolino, B. de Giulio. Application of ESI and MALDI-TOF MS for triacylglycerols analysis in edible oils, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2011, **113**, 160-167.
- [22] I. Manisali, D. D. Y. Chen, B. B. Schneider. Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: past, present, and future, *TrAC* 2006, **25**, 243-256.
- [23] R. D. Smith, C. G. E. Loo, C. J. Barinaga, H. R. Udseth. New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization, *Anal. Chem.* 1990, **62**, 882-899.
- [24] M. Wilm, Principles of electrospray ionization. Tutorial da American society for biochemistry and molecular biology, 2011.
- [25] L. R. V. Mataveli, P. Pohl, S. Mounicou, M. A. Z. Arruda, J. Szpunar. A comparative study of elements concentration and binding in transgenic and non-transgenic soybeans seeds, *Metallomics* 2010, **2**, 800-805.
- [26] R. Koplík, M. Borková, O. Mestek, J. Komínková, M. Suchánek, J. Chromatogr. B 2002. Application of size exclusion chromatography - inductively coupled plasma mass spectrometry for fractionation of element species in seeds of legumes, **775**, 179-187.

- [27] R. Koplík, M. Borková, B. Bikanová, J. Polák, O. Mestek, J. Komínková. Speciation analysis of elements in cereal flours by liquid chromatography – inductively coupled plasma mass spectrometry, *Food Chem.* 2006, **99**, 1658-1678.
- [28] Expasy proteomic server (2011). <http://ca.expasy.org>, acessado em outubro/2012.

CAPÍTULO 3

UTILIZAÇÃO DE SDS-PAGE COMO TERCEIRA DIMENSÃO DE SEPARAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO DE METAIS E IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS NAS BANDAS SEPARADAS

1. OBJETIVO

Este capítulo teve como objetivo utilizar géis de eletroforese unidimensionais (SDS-PAGE), a fim de separar as frações coletadas na segunda dimensão cromatográfica obtida previamente, permitindo ampliar, ainda mais, a resolução na separação das proteínas, bem como verificar possíveis diferenças de expressão entre as amostras de semente de soja T e NT, além de possibilitar a quantificação de metais nas bandas dos géis e a possível identificação de proteínas associadas aos metais quantificados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica deste capítulo faz considerações sobre a eletroforese em gel, sobre a coloração dos mesmos, bem como sua decomposição utilizando micro-ondas.

2.1 Considerações sobre a eletroforese em gel

Devido à complexidade das amostras biológicas, é geralmente necessário separar os analitos antes da análise no espectrômetro de massas, a fim de que a complexidade do que é introduzido no equipamento seja compatível com o desempenho do instrumento no modo de medição escolhido [1]. Esta separação pode ser feita nas proteínas da amostra ou nos peptídeos resultantes da digestão das proteínas (ou ambos). Como analitos, as proteínas são muito mais complexas que os peptídeos, mas também muito mais fáceis de separar, diferindo muito em tamanho, ponto isoelétrico e hidropatia [1,2]. A espinha dorsal polipeptídica das proteínas é muito menos importante se comparada com as cadeias laterais de aminoácidos, e o comportamento físico-químico das proteínas é extremamente complexo e depende da composição e sequência de cada proteína. Ainda, esta complexidade leva à formação da estrutura tridimensional das proteínas, induzindo

uma química de superfície complexa, pois as proteínas apresentam superfícies com várias características (catiônica, aniônica, hidrofóbica) [2,3].

Entre os vários modos de separação disponíveis para proteínas e peptídeos, cromatografia e eletroforese são quase que exclusivamente usados nos dias de hoje.

Como o nome diz, a eletroforese em gel consiste em realizar a separação em um gel condutor, ou seja, um polímero com poros de tamanho aproximadamente definidos. Historicamente falando, a eletroforese em sua forma moderna nasceu na década de 1970, quando Laemmli [4] associou o alto poder de resolução do sistema utilizado previamente ao conhecido poder desnaturante do SDS, que já era usado em menores concentrações na eletroforese. Este método se mostrou extremamente versátil, e seu uso foi difundido rapidamente.

As cadeias poliméricas que delimitam os poros do gel limitam a difusão, o que por sua vez aumenta a resolução [1]. Por fim, a fricção dos analitos no material do gel adiciona outro parâmetro de separação que pode ser usado para aumentar a resolução da técnica, especialmente quando o tamanho do analito é o parâmetro de separação [1, 2]. O preço a se pagar com o uso de gel é a perda da automação, mas esta perda é compensada em parte pelo fato de que a separação no gel é contínua e pode ser paralela, com várias amostras por gel no caso da separação unidimensional, ou promover um processo bidimensional contínuo [1, 5].

Os géis devem ter poros de tamanho adequado e que possam ser modificados. Mais importante os géis não devem conter cargas elétricas que poderiam complicar ou perturbar as separações e não devem também adsorver proteínas, pois isso causaria um arraste nas separações. Também devem ser resistentes a solventes orgânicos usados em procedimentos de lavagem, digestão e extração das proteínas que serão analisadas no espectrômetro de massas. Esta série de restrições confinaram os géis usados em eletroforese a poli(acrilamida). Devido à sua natureza, este polímero é estável em muitas situações adversas [1,2].

Em quase todos os esquemas proteômicos onde a separação das proteínas é feita por eletroforese em gel, a SDS-PAGE é encontrada. Esta pode ser usada como único modo de separação, mas, também, pode ser usada em conjunto com outros processos de separação, tais como eletroforese nativa, cromatografia de troca iônica, eletroforese denaturante, e focalização isoelétrica (constituindo a 2D-PAGE). O SDS apresenta um compromisso de sucesso entre hidrofobicidade e hidrofiliabilidade, e se liga muito bem a quase todas as proteínas. Além de promover a desnaturação de proteínas, confere a elas uma carga negativa forte, mascarando suas cargas nativas.

Na SDS-PAGE, a migração é medida no gel comparada com a migração de uma frente de íons pequenos, visualizada com o corante. Por causa da grande distribuição de tamanhos das proteínas, é interessante otimizar essa resolução de acordo com as necessidades experimentais. A resolução é mudada principalmente trocando-se o tamanho do poro do gel de separação, e, portanto, a concentração de acrilamida. Quando os géis possuem baixa concentração de acrilamida, a migração das proteínas de baixa massa molar é realizada com facilidade pelo gel, e correrão quase ao mesmo tempo em que a frente de íons pequenos que demarca a corrida. Enquanto isso, as proteínas de maior massa molar apresentam mais dificuldade para permear os poros do gel, o que pode resultar em maior separação entre elas. Ao contrário, se a concentração do gel aumentar, as proteínas de baixa massa molar vão migrar mais lentamente que os íons pequenos que demarcam a frente de corrida, e estarão mais separadas umas das outras, enquanto muitas das proteínas de maior massa molar serão incapazes de permear na matriz polimérica, e irão permanecer próximos da borda do gel, com quase nenhuma separação. Um bom compromisso é utilizar um gradiente de concentração de acrilamida, porém existem alguns problemas quando se usa esta estratégia como, por exemplo, os géis de baixa concentração podem não apresentar consistência adequada, enquanto géis com altas concentrações podem quebrar facilmente, limitando a otimização da resolução [1,2].

Apesar de suas ótimas capacidades em termos de solubilização de proteínas, versatilidade e flexibilidade, a SDS-PAGE, sozinha, não tem resolução para ser

usada com única técnica de separação em proteômica, e deve ser acompanhada de outras técnicas de separação, que podem ser realizadas antes ou após a eletroforese em gel. Entretanto, quando racionalizando as possíveis escolhas, deve-se levar em conta que as proteínas desnaturadas com SDS são solúveis na presença do SDS, porém, podem se tornar facilmente insolúveis quando este reagente é removido. Portanto, quase sempre, as outras separações protéicas são realizadas em etapa prévia à eletroforese em gel [1,2].

2.2 Considerações sobre a coloração dos géis

Para tornar visíveis as bandas ou spots proteicos (no caso de 1-DE e 2-DE, respectivamente), os géis são corados com Azul de Coomassie, nitrato de prata ou outros corantes comerciais [6, 7].

As técnicas de coloração com nitrato de prata [8, 9] consistem na saturação dos géis com íons prata, lavando os íons metálicos mais fracamente ligados da matriz do gel, e reduzindo as proteínas ligadas aos metais para formar prata metálica. Hoje mais de 100 variações dos protocolos de coloração com prata são utilizados, porém, em geral, existem duas grandes categorias: alcalinas e ácidas, dependendo das condições usadas para a impregnação da prata. Os métodos alcalinos trabalham com um complexo diamino de nitrato de prata em meio altamente alcalino (amônia e hidróxido de sódio). Os géis são revelados em soluções ácidas diluídas de formaldeído. Já os métodos ácidos usam nitrato de prata em água (soluções fracamente ácidas) para impregnação do gel, e a revelação é feita com soluções de formaldeído em valores de pH altos. Os protocolos de coloração com prata são procedimentos com muitos passos, sendo quatro os mais comuns (além de diversos procedimentos de lavagem): (i) fixação, para a não solubilização das proteínas e remover compostos interferentes presentes no gel, (ii) sensibilização, para aumentar a subsequente formação da imagem, (iii) impregnação com prata e (iv) revelação com prata, utilizando formaldeído. A coloração do gel é cessada com soluções apropriadas, e este é preservado.

Devido ao procedimento de revelação não possuir um ponto final específico, as intensidades de coloração variam de gel para gel. A sensibilidade desta coloração é em torno de 50 vezes maior do que a realizada com Azul de Comassie [6]. Entretanto, para que os géis corados com prata possam ser analisados no espectrômetro de massas, o glutaraldeído e o formaldeído não devem ser usados no protocolo, o que diminui a sensibilidade da coloração. Sendo assim, este protocolo não foi usado para a identificação de proteínas, mas para a quantificação dos metais utilizando o ICP-MS. Este procedimento de coloração é vantajoso na determinação de metais, pois não se espera encontrar a prata, principal componente do corante, em proteínas, além de apresentar menor interferência de impurezas metálicas devido à qualidade dos reagentes.

O Azul de Comassie [8] é frequentemente usado em eletroforese. É um corante têxtil trifenilmetano dissulfonado, que existe em duas variações: o Comassie R-250 (corante em tom de vermelho) e o G-250 (corante em tom de verde, forma dimetilada), sendo esta última a mais usada para coloração de géis. Em soluções ácidas, o corante se liga aos grupos amino das proteínas por interações eletrostáticas e hidrofóbicas.

O CBB (do inglês, Comassie Brilliant Blue) G coloidal foi usado neste trabalho. Quando usando este corante, um fundo menor é observado, devido à conversão do corante a um estado coloidal. Com o corante na forma coloidal, é possível estabilizar o complexo proteína-corante, permitindo período prolongado de estocagem sem perda da coloração (a lixiviação é notada em géis corados com Azul de Comassie na presença de solventes). O metanol é utilizado na solução corante, a fim de mudar o equilíbrio da forma coloidal para o corante molecularmente disperso, para facilitar e aumentar a velocidade do processo de coloração. Neste trabalho este corante foi utilizado no procedimento de identificação de proteínas, uma vez que este é compatível com análises no espectrômetro de massas.

2.3 Decomposição das amostras utilizando mini-frascos

Atualmente, os métodos analíticos para a análise de elementos em baixas concentrações requerem, principalmente, o emprego de pequenas quantidades de reagentes, de materiais inertes como recipientes, e, ainda, a facilidade de processamento de maior número de amostras, bem como a miniaturização [9].

A decomposição em sistema fechado com aquecimento por radiação micro-onda destaca-se dentre os métodos de decomposição de amostras devido ao fato de requerer quantidades reduzidas de reagentes, ser executado em menor tempo que os métodos convencionais, evitar a perda de espécies voláteis e minimizar problemas de contaminação [9]. O uso de frascos fechados é indicado para amostras de difícil decomposição, pois o aquecimento causa um aumento na pressão devido à evaporação dos ácidos empregados e à produção de gases durante o processo, aumentando o ponto de ebulição dos ácidos utilizados [10].

O emprego de mini-frascos de polipropileno é altamente adequado para a decomposição por via úmida devido à capacidade de decompor um grande número de amostras, de maneira simples e com pequeno consumo de reagentes e de amostra (ponto crucial na análise de bandas do gel de eletroforese), além de mínima diluição da amostra, tornando mais fácil a análise de elementos em baixas concentrações nestas amostras [10].

Um trabalho realizado por Sussulini *et al.* [11] reporta o uso de mini-frascos na digestão de spots de géis 2D-PAGE de sementes de soja T e NT para posterior análise de metais em absorção atômica. Quatro spots de até 3 mg foram selecionados e decompostos, e os seguintes metais puderam ser quantificados: Ca, Cu e Fe.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparo de soluções e limpeza de materiais

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

Antes do uso, todos os frascos plásticos, vidrarias e demais materiais de laboratório foram lavados e colocados primeiramente em banho de Extran[®] (Merck, Darmstadt, Alemanha) 1% (v/v), e em seguida em banho de ácido nítrico 10% (v/v) (Merck, Darmstadt, Alemanha) por no mínimo 12h. Posteriormente, foram lavados utilizando água deionizada e secos em estufa, exceto materiais volumétricos, secos à temperatura ambiente.

3.2 Determinação de proteínas totais

A quantificação do teor de proteínas totais nas sub-frações previamente separadas por cromatografia de troca aniônica foi feita pelo método de Bradford. O reagente de Bradford [12] foi preparado em laboratório, com menos de uma semana de intervalo entre o preparo e a quantificação das proteínas, a fim de evitar a degradação do mesmo.

O reagente era constituído de uma solução contendo 0,01% (m/v) de CBB G-250, 5,0% (v/v) de etanol anidro e 10,0% (v/v) de ácido fosfórico 85%, adicionados a um balão volumétrico, respectivamente nesta ordem, e completando-se o volume com água deionizada. Após 15 min de agitação, a solução foi filtrada duas vezes em papel de filtro quantitativo e estocada ao abrigo da luz.

As curvas analíticas foram construídas para cada determinação utilizando albumina de soro bovino (ASB), dissolvida em água, na faixa de concentração de 2,5 a 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

As determinações espectrofotométricas foram realizadas a 595 nm, utilizando um espectrofotômetro Micronal modelo B 582. Para estas medidas, foram pipetados 200 μL da amostra em cubetas de plástico de 3 mL, e foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. Após 5 min de reação, mediu-se a absorbância.

3.3 Preparo das amostras para obtenção dos géis

As amostras, previamente liofilizadas, foram dissolvidas em volume adequado de tampão Tris-HCl $0,0625 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,8 contendo 2% (v/v) de SDS, 10% (v/v) de glicerol, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de DTT e 0,01% (v/v) de azul de bromofenol. O tampão utilizado foi o mesmo sugerido pelo fabricante (GE Healthcare) para reconstituição do kit de calibração de massas molares. Antes da aplicação no gel as amostras dissolvidas foram aquecidas a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 min.

3.4 Preparo dos géis de poliacrilamida

A separação eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida seguindo o método de Laemmli. Os co-polímeros utilizados na separação eram constituídos de um gel superior, denominado gel concentrador ou empilhador, de ~5 cm e um gel inferior, denominado gel separador. A composição dos géis e função dos reagentes utilizados está mostrada na Tabela 3.1.

Após a completa polimerização, as amostras foram aplicadas na região superior do gel, totalizando um volume de $30 \text{ } \mu\text{L}$ por poço, e deu-se início à separação das proteínas. Para proporcionar a passagem da corrente elétrica, utilizou-se nos reservatórios da cuba de eletroforese uma solução tampão constituída de $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ de Tris-base, $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de glicina e 0,1% (m/v) de SDS. A cuba de eletroforese foi ligada a uma fonte de corrente contínua, e a corrida foi conduzida a 6,5 mA por gel, com voltagem máxima fixada a 200 V e duração aproximada de 18 h.

Para a marcação da frente de corrida adicionou-se no reservatório superior da cuba de eletroforese aproximadamente $200 \text{ } \mu\text{L}$ de uma solução 0,05% (m/v) de azul de bromofenol.

Tabela 3.1 – Composição dos géis concentrador e separador para um volume final de 100 mL de solução

Reagentes	Função	Gel concentrador (concentração final = 5%)	Gel separador (concentração final = 10%)
Acrilamida + Bis- acrilamida	Acrilamida: monômero Bis-acrilamida: porogênico	16,7 mL	33,3 mL
Solução tampão Tris-HCl 1,5 mol L⁻¹ (pH 8,8)	Estabiliza o pH do meio e permite a passagem da corrente elétrica	25 mL	25 mL
SDS 10% (m/v)	Anula o efeito de cargas das moléculas protéicas, deixando-as com cargas negativas	1 mL	1 mL
Água deionizada	Solvente	56,8 mL	40,2 mL
TEMED	Catalisador	500 µL	500 µL
Persulfato de Amônio 10% (m/v)	Gerador de radicais livres	33µL	33 µL

3.5 Procedimentos para revelação dos géis

Para análise de imagens e decomposição das bandas, os géis foram corados com um kit de coloração de prata, conforme instruções do fabricante. O procedimento está descrito na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Procedimento para revelação dos géis com o kit de coloração de prata

Solução	Composição	Duração da etapa (min)
Fixação, 30% (v/v) etanol	Etanol, 75 mL Ácido acético glacial, 25 mL Água para atingir volume final de 250 mL	60
Sensibilização	Etanol, 75 mL Tiosulfato de sódio (5% m/v), 10 mL Acetato de sódio, 17 g Água para atingir volume final de 250 mL Glutaraldeído (25% m/v) 1,25 mL, adicionado imediatamente antes do uso	60
Lavagem Prata	Água deionizada Nitrato de prata (2,5% m/v), 25 mL Água para atingir volume final de 250 mL	15 (4x) 60
Lavagem Desenvolvimento	Água deionizada Carbonato de sódio, 6,25 g Água para atingir volume final de 250 mL Formaldeído (37% m/v), adicionado imediatamente antes do uso	1 (2x) 4 a 6
Parada da reação de prata	EDTA-Na ₂ .2H ₂ O, 3,65 g Água para atingir volume final de 250 mL	60
Preservação	Glicerol (87% m/m), 11,5 mL Água para atingir volume final de 250 mL	60

Para identificação das proteínas no espectrômetro de massas, os géis foram revelados da seguinte forma: após a corrida, os géis foram imersos em solução fixadora composta de 10% (v/v) de ácido acético e 40% (v/v) de etanol por 1 h. Posteriormente, os géis foram lavados com água deionizada por 30 min, sendo que a água foi trocada de 10 em 10 min. Após, os géis foram imersos em solução contendo 8% (m/v) de sulfato de amônio, 1,6% (v/v) de ácido fosfórico, 25% (v/v) de metanol e 0,08% (v/v) de Comassie Brilliant Blue G-250. Os géis permaneceram nesta solução entre 24 e 48 h, e, depois, foram lavados com água deionizada para retirada do excesso de corante.

Após a revelação das bandas, estas foram digitalizadas utilizando um digitalizador de imagens (Amershan Biosciences, Uppsala, Suécia) e analisadas pelo software Gel-Pro Analyser 3.0 (Media Cybernetics, EUA) para estimativa de massa molar e densidade óptica das bandas.

3.6 Digestão das bandas para identificação de proteínas

O procedimento de digestão das bandas do gel de eletroforese foi modificado de [13], sendo descrito a seguir:

- As bandas foram cortadas em pedaços de aproximadamente 1 mm e colocadas em tubos tipo eppendorf.
- Descoloração das bandas: 0,5 mL de solução contendo metanol 50% (v/v) e ácido acético 2,5% (v/v) em água deionizada foi adicionado ao tubo e incubado por 2 h a temperatura ambiente. A solução foi removida, e o procedimento repetido, sendo que o tempo de incubação foi de 1h a temperatura ambiente.
- Desidratação do gel: a solução anterior foi removida e foram adicionados 200 µL de acetonitrila por 5 min. Este passo foi repetido uma vez, e o restante da acetonitrila foi evaporado em fluxo de N₂.
- Redução das proteínas: foram adicionados 30 µL de DTT 10 mmol L⁻¹ e incubou-se a amostra por 30 min em temperatura ambiente. A solução foi retirada.
- Alquilação das proteínas: foram adicionados 30 µL de IAA 10 mmol L⁻¹ e incubou-se a amostra por 30 min em temperatura ambiente. A solução foi retirada.

- Os géis foram lavados com 100 μL de bicarbonato de amônio 100 mmol L^{-1} por 10 min. A solução foi retirada.
- Desidratação do gel: a solução anterior foi removida e foram adicionados 200 μL de acetonitrila por 5 min. A acetonitrila foi retirada.
- Reidratação dos géis: os géis foram reidratados com 200 μL de bicarbonato de amônio 100 mmol L^{-1} por 10 min. A solução foi retirada.
- Desidratação do gel: a solução anterior foi removida e foram adicionados 200 μL de acetonitrila por 5 min. Este passo foi repetido uma vez, e o restante da acetonitrila foi evaporado em fluxo de N_2 .
- Preparou-se uma solução de tripsina cuja concentração final era de 20 $\text{ng } \mu\text{L}$, e foram adicionados 40 μL da solução nos tubos, e os géis foram reidratados em banho de gelo por 30 min. O excesso da solução de tripsina foi retirado, e foi colocada solução de bicarbonato de amônio 50 mmol L^{-1} suficiente para cobrir o gel. As amostras foram deixadas durante a noite a 37 $^{\circ}\text{C}$.
- Extração das proteínas do gel (1): foram adicionados 20 μL de solução de ácido fórmico 5% (v/v) em água deionizada. Incubou-se a amostra por 10 min a temperatura ambiente, e o sobrenadante foi colocado em outro tubo.
- Extração das proteínas do gel (2): foram adicionados 12 μL de solução de ácido fórmico 5% (v/v) em acetonitrila 50% (v/v). Incubou-se a amostra por 10 min a temperatura ambiente, e o sobrenadante foi colocado no mesmo tubo do passo anterior.
- A amostra foi evaporada em evaporador, e armazenada a -20 $^{\circ}\text{C}$ até análise no espectrômetro de massas.

3.7 Procedimento de decomposição das bandas dos géis em mini-frascos

Primeiramente, as bandas dos géis foram recortadas utilizando-se um bisturi, e secas a 40 $^{\circ}\text{C}$ até peso constante. Cada banda foi pesada em balança analítica, e colocada em mini-frascos de polipropileno. Foram adicionados 286 μL

de HNO₃ sub-destilado, 214 µL de H₂O₂ 30% (m/m), e os frascos permaneceram abertos por 30 min (tempo de pré-reação).

Após o tempo de pré-reação, os mini-frascos foram fechados e colocados em um suporte de PTFE, sendo que cada frasco do micro-ondas suportava 4 mini-frascos. Assim, 48 amostras foram digeridas por programa de decomposição. Cada suporte foi colocado dentro do micro-ondas contendo 15 mL de água deionizada, a fim de manter a pressão do sistema equilibrada. O programa de decomposição utilizado é mostrado na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Programa utilizado para decomposição das bandas proteicas

Etapa	Tempo (min)	Potência (W)
1	1	300
2	1	500
3	1	500
4	1	800
5	1	800
6	1	800
7	1	500

Após a decomposição, as amostras foram avolumadas para 5mL com água deionizada e quantificadas em ICP-MS, cujas condições estão mostradas na Tabela 3. 4.

Tabela 3.4 – Condições de operação do ICP-MS

Parâmetro	
Potência de radiofrequência	1200 W
Vazão do gás nebulizador	0,94 L min ⁻¹
Vazão do gás do plasma	15 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	1,2 L min ⁻¹
Nebulizador	Meinhard
Câmara de nebulização	Ciclônica
Gás da cela de reação	CH ₄
Isótopos monitorados	⁵⁹ Co, ⁵⁷ Fe, ⁵⁵ Mn, ⁶³ Cu, ⁶⁶ Zn, ²⁴ Mg

3.8 Identificação das proteínas

Os espectros foram obtidos em um equipamento Q-Tof Ultima (Waters Co., Milford, EUA). Uma alíquota dos peptídeos foi inicialmente separada usando um equipamento de nanoUPLC (Waters Co.) equipado com coluna C18 (75 μ m x 100 mm) acoplado ao espectrômetro de massas, o qual possui uma fonte de nano *electrospray* com uma vazão de 0,6 μ L min⁻¹. Os peptídeos foram eluídos em um gradiente de 2-90% de acetonitrila em ácido fórmico 0,1% (v/v).

A ferramenta de busca MASCOT versão 2.3 foi usada para processar os dados gerados no espectrômetro de massas. As buscas foram feitas nos bancos de dados NCBI e SwissProt, que contêm proteínas gerais, utilizando os seguintes parâmetros: digestão com tripsina, carbamidometilação como modificação fixa, oxidação em metionina como modificação variável, e erro em massa de 0,1 Da.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Quantificação de proteínas pelo método de Bradford

A curva de calibração obtida pelo método de quantificação de proteínas de Bradford obtida é mostrada na Figura 3.1 abaixo.

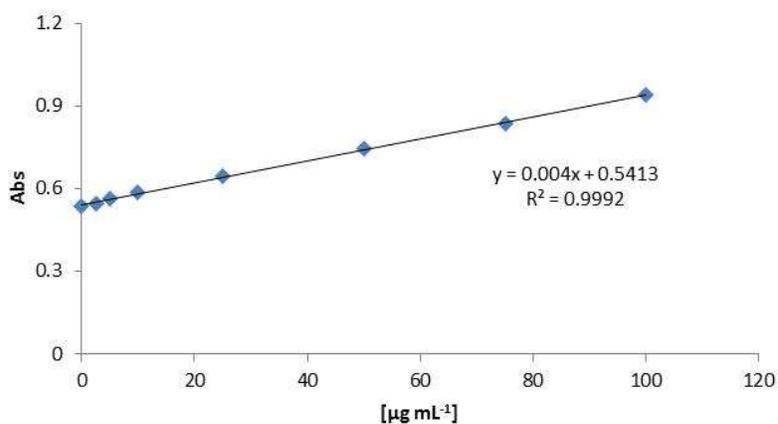


Figura 3.1- Curva analítica obtida utilizando-se ASB como padrão. Concentrações entre 2,5 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, n=3.

As concentrações obtidas para as diferentes sub-frações obtidas previamente na segunda dimensão cromatográfica estão mostradas na Tabela 3.5.

Tabela 3. 5 – Concentração das proteínas (n=3±desvio padrão) nas frações separadas por cromatografia de troca iônica.

Sub-fração	Concentração, $\mu\text{g g}^{-1}$	
	T	NT
1.1	601 ± 51	841 ± 97
1.2	302 ± 21	209 ± 2
1.3	592 ± 5	330 ± 3
2	865 ± 21	589 ± 16
3.1	295 ± 18	586 ± 62
3.2	259 ± 2	298 ± 17
3.3	420 ± 21	477 ± 25

As diferenças de concentrações de proteínas nas sub-frações analisadas podem ser explicadas devido às diferenças de concentração existentes entre as próprias amostras, ou, ainda, pelos diversos processos pelos quais as amostras foram submetidas (extração, separações cromatográficas, liofilizações).

Nos géis de SDS-PAGE, as mesmas massas de proteína foram aplicadas para as duas amostras após a verificação da melhor condição a ser utilizada.

4.2 Concentração de proteína a ser aplicada no gel de SDS-PAGE corado com nitrato de prata

A sub-fração 1.1 foi utilizada para verificar a melhor concentração de proteínas a ser aplicada no gel de SDS-PAGE, resultando na Figura 3.2.

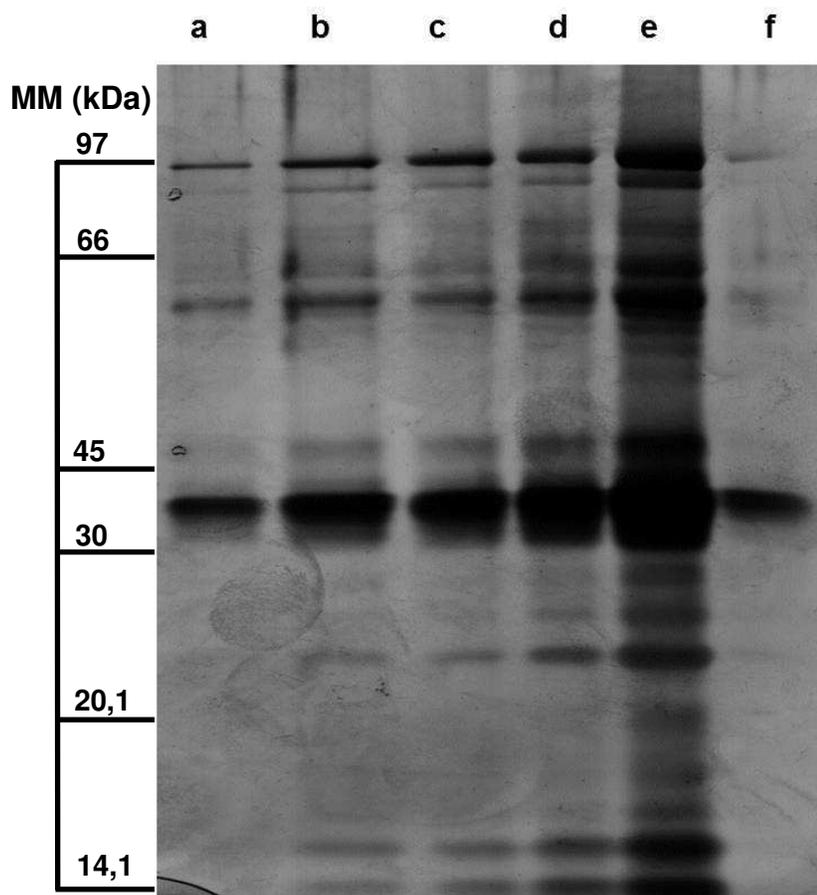


Figura 3.2 – Gel de eletroforese SDS-PAGE mostrando as diferentes concentrações de proteínas aplicadas nos poços do: a – 5 μg , b - 10 μg , c - 20 μg , d- 30 μg , e – 30 μg , com utilização de Amicon[®] (3kDa) (solução na parte superior do filtro), f - 30 μg , com utilização de Amicon[®] (3kDa) (solução na parte inferior do filtro). Coloração – prata.

As corridas eletroforéticas representadas em a, b e c mostram, respectivamente, a aplicação de 5, 10 e 20 μg de proteína, gerando bandas menos intensas, como pode ser observado na Figura 3.2. A concentração de proteínas aplicada em "d" e "e" foi a mesma (30 μg), porém no poço "e" foi utilizado um filtro de massa de 3 kDa (Amicon[®], Millipore, Bedford, EUA), a fim de retirar sais decorrentes do processo cromatográfico, que poderiam causar distorções nas bandas. O poço "f" refere-se à parte desprezada da filtração, mostrando a pouca perda de proteína decorrente do processo.

A concentração de 30 μg de proteína sem a utilização do filtro de massa foi escolhida, pois a utilização deste gerou maior coloração de fundo, além de

encarecimento do processo e maior dificuldade para recortar as bandas, a fim de quantificar os metais.

4.3 Géis obtidos para as diferentes sub-frações

Após a separação na segunda dimensão cromatográfica, as sub-frações (vide Capítulo 2) foram liofilizadas, e um gel de eletroforese SDS-PAGE foi obtido para cada uma delas. Deve-se comentar que a tentativa de separação em géis de duas dimensões (2D-PAGE) não foi bem sucedida, o que pode ter explicação no excesso de sal presente na amostra resultante do processo de separação cromatográfica. Os resultados para cada uma das sub-frações estão mostrados a seguir, sendo que os géis correspondentes às sementes de soja T e NT foram obtidos em uma mesma corrida eletroforética.

Pode-se perceber a semelhança entre os géis das sementes de soja T e NT, não só para a sub-fração 1.1 representada na Figura 3.3, mas, também, para as outras apresentadas ao longo desta discussão.

Os géis da sub-fração 1.1 continham, aproximadamente, 11 bandas, sendo que é possível perceber por meio do gráfico de densidade óptica que as bandas localizadas em torno de 100 kDa e 40 kDa são mais abundantes no gel das amostras de sementes de soja NT. Porém, como já discutido em outros trabalhos, uma variação de abundância é dita significativa quando superior a 90%, ou seja, 1,8 vezes [14, 15]. Dados mais detalhados sobre a variação de expressão das proteínas podem ser obtidos utilizando 2D-PAGE, onde spots, e não bandas, são separados, podendo verificar a diferença de expressão de uma única proteína.

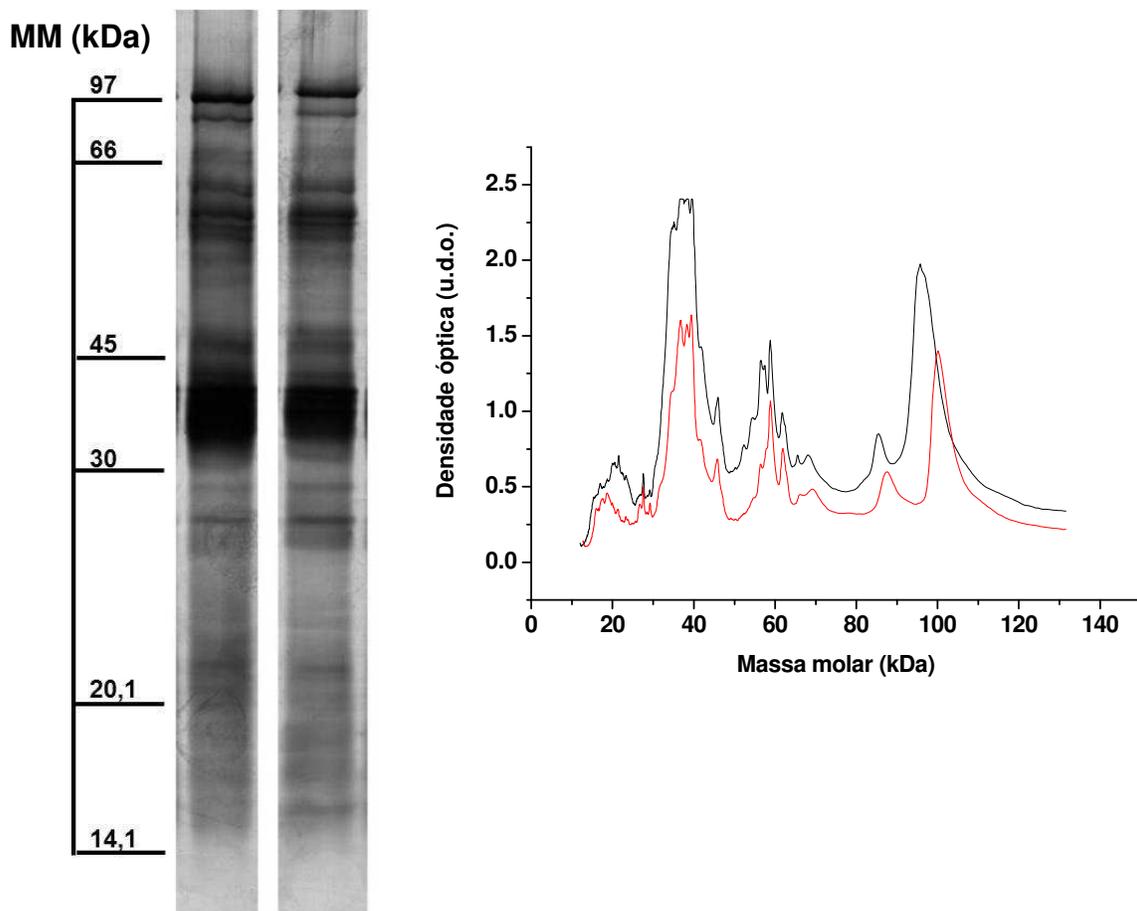


Figura 3.3 – Gel obtido para sub-fração 1.1. O gel da esquerda corresponde a sementes de soja T e o da direita corresponde a sementes de soja NT. O gráfico representa a densidade óptica mostrada pelas bandas do gel. (—) sementes de soja T, (—) sementes de soja NT. Corante = nitrato de prata, MM = massa molar.

A Figura 3.3 mostra bandas com massas molares diferentes das faixas de massa molar previamente calculada após a cromatografia de exclusão por tamanho (neste caso, entre 38,1 e 181,1 kDa). Isto indica que pode estar ocorrendo um segundo mecanismo de separação juntamente com a exclusão por tamanho, tal como troca iônica, impedindo uma estimativa correta da massa molar das proteínas.

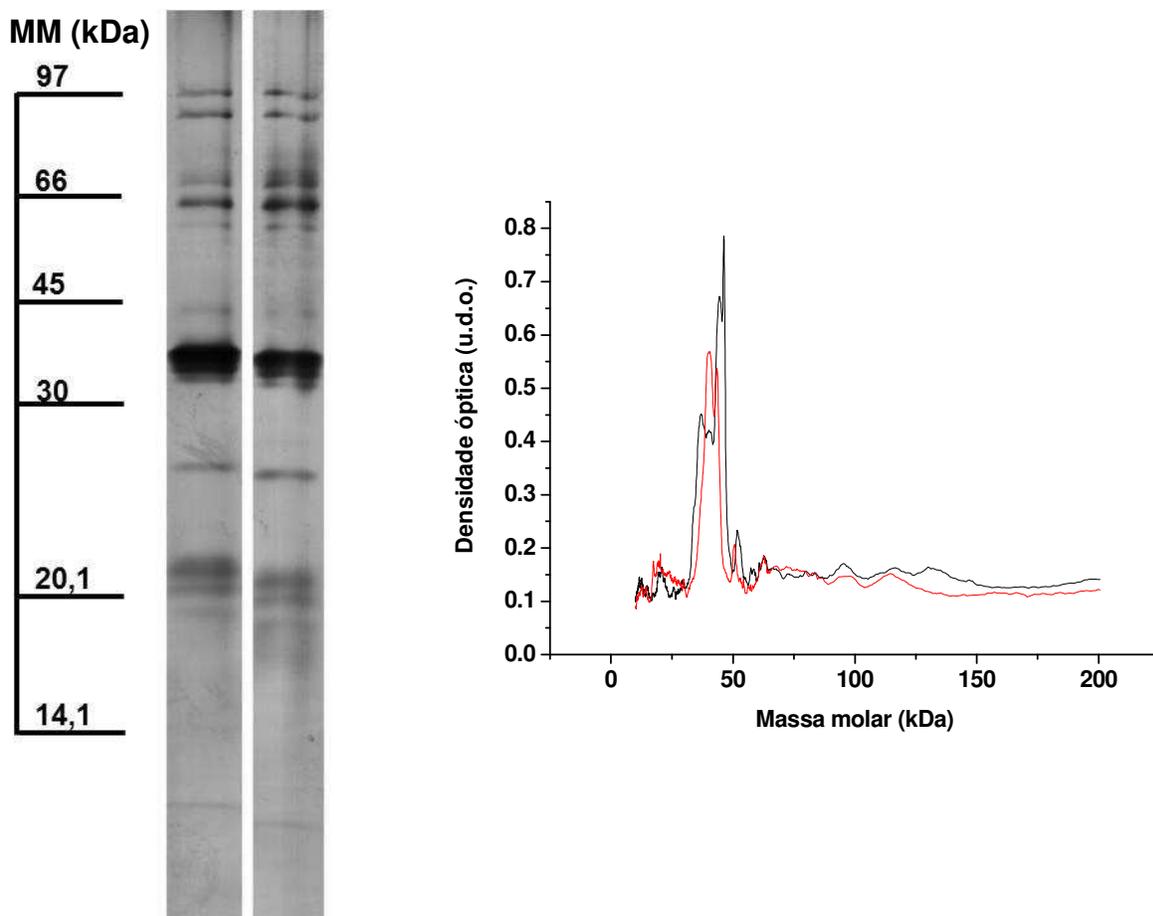


Figura 3.4 – Gel obtido para sub-fração 1.2. O gel da esquerda corresponde a sementes de soja T e o da direita corresponde a sementes de soja NT. O gráfico representa a densidade óptica mostrada pelas bandas do gel. (—) sementes de soja T, (—) sementes de soja NT. Corante = nitrato de prata, MM = massa molar.

A sub-fração 1.2, mostrada na Figura 3.4, apresentou 10 bandas, e também se pode notar que foram encontradas bandas com massas molares menores que a faixa de massa molar pré-estabelecida na cromatografia de exclusão por tamanho (38,1-181,1 kDa). Ainda, pode-se notar que a densidade óptica para ambas as amostras é praticamente a mesma.

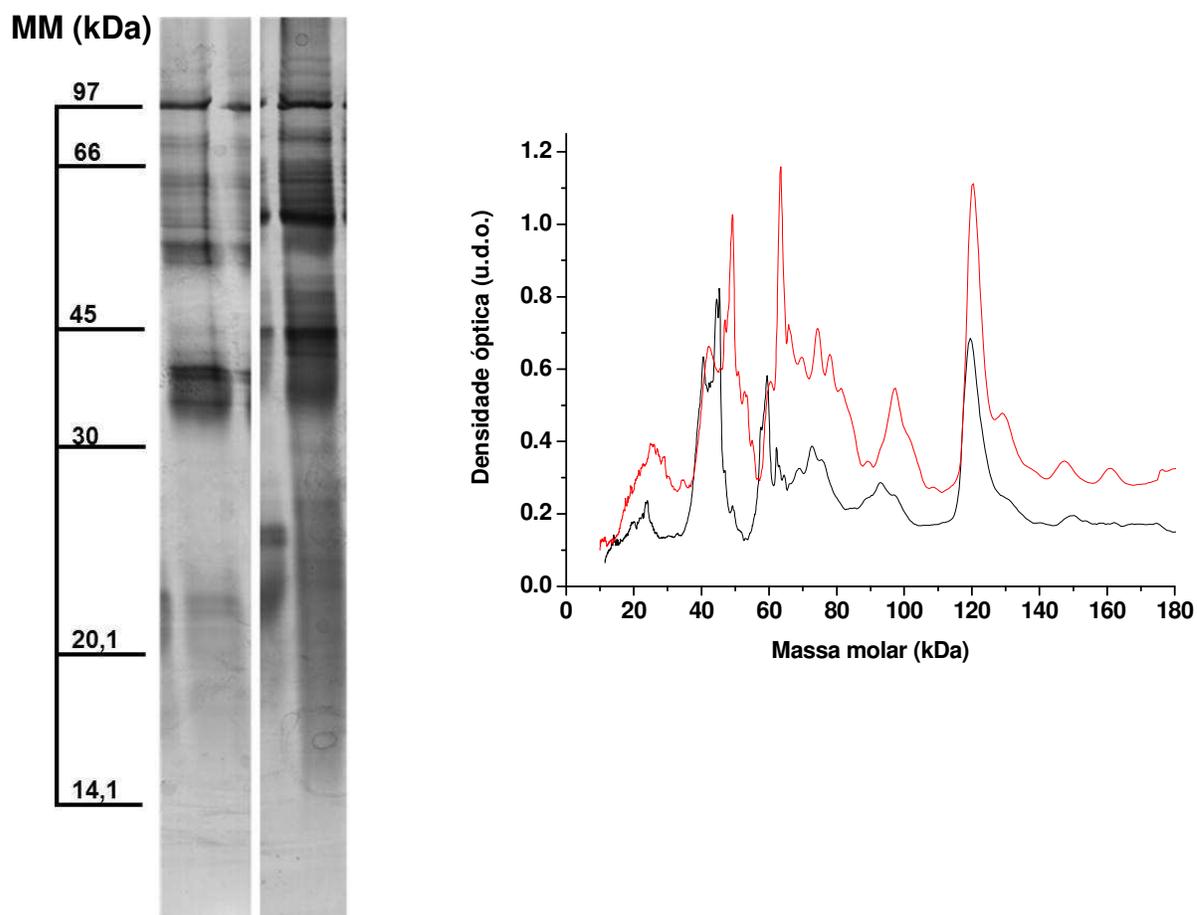


Figura 3.5 - Gel obtido para sub-fração 1.3. O gel da esquerda corresponde a sementes de soja T e o da direita corresponde a sementes de soja NT. O gráfico representa a densidade óptica mostrada pelas bandas do gel. (—) sementes de soja T, (—) sementes de soja NT. Corante = nitrato de prata, MM = massa molar.

Na Figura 3.5 pode-se notar uma maior densidade óptica das bandas no gel de sementes de soja NT. Nesta sub-fração as bandas se concentraram na parte superior do gel, proporcionando bandas de massas molares condizentes com a faixa de massa molar pré estabelecida na cromatografia de exclusão por tamanho (38,1-181,1 kDa).

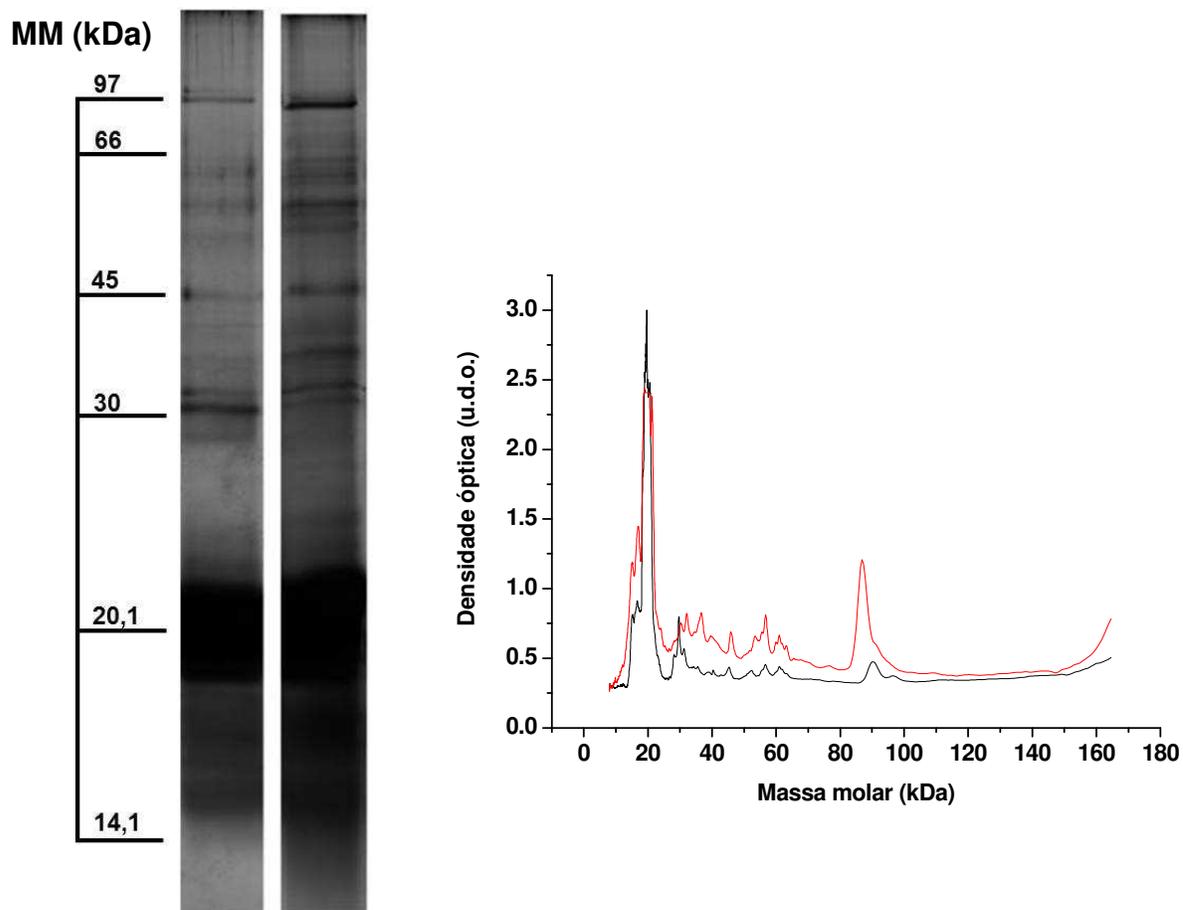


Figura 3.6 – Gel obtido para sub-fração 2. O gel da esquerda corresponde a sementes de soja T e o da direita corresponde a sementes de soja NT. O gráfico representa a densidade óptica mostrada pelas bandas do gel. (—) sementes de soja T, (—) sementes de soja NT. Corante = nitrato de prata, MM = massa molar.

A sub-fração 2 foi a sub-fração com maior concentração de proteínas quantificadas nas sementes de soja T, e a segunda maior nas sementes de soja NT, porém, pode-se notar pela Figura 3.6 que quase todas as proteínas existentes nesta sub-fração estão concentradas em uma grande banda em torno de 20 kDa. Neste gel podemos observar que a banda separada em torno de 100 kDa pode ser considerada como tendo diferença de abundância entre as duas amostras (diferença maior que 90%), porém, não foi possível a posterior identificação das proteínas nesta banda.

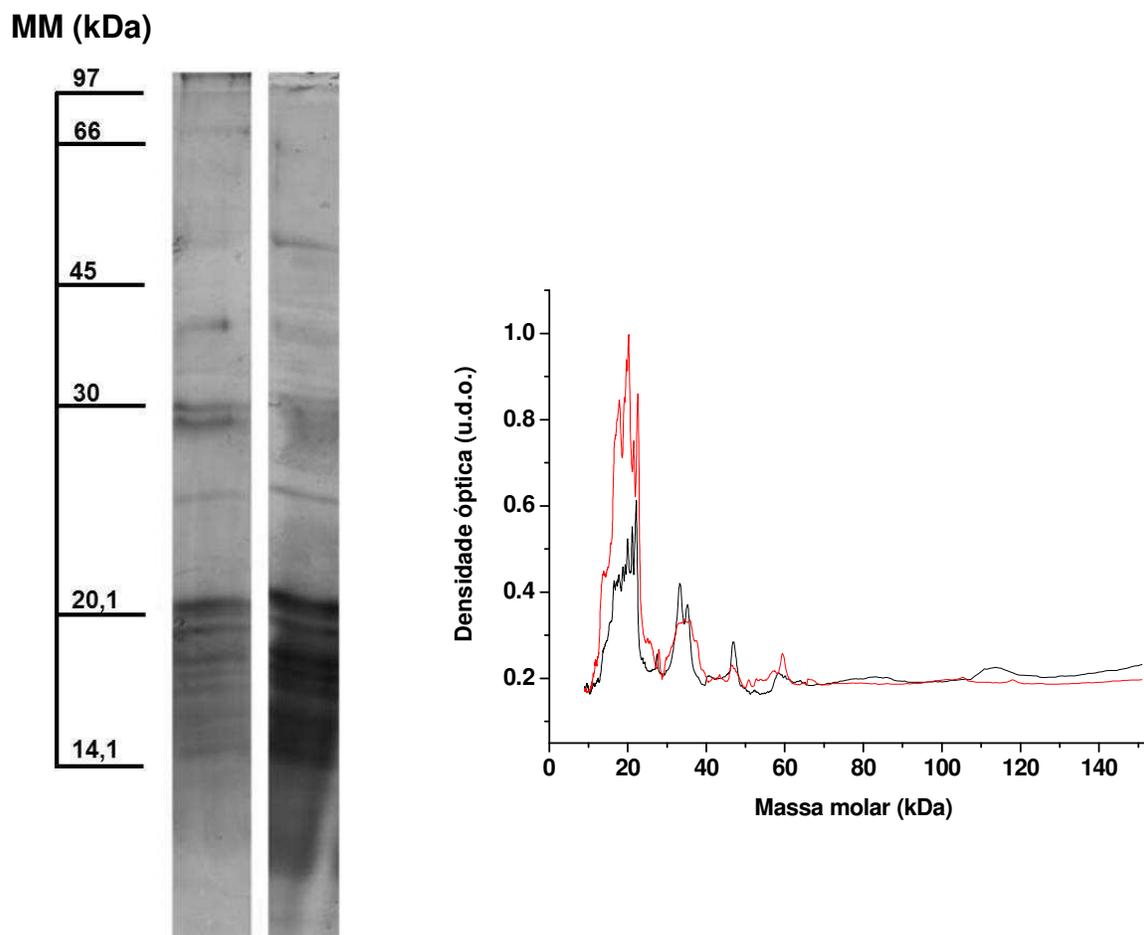


Figura 3.7 – Gel obtido para sub-fração 3.1. O gel da esquerda corresponde a sementes de soja T e o da direita corresponde a sementes de soja NT. O gráfico representa a densidade óptica mostrada pelas bandas do gel. (—) sementes de soja T, (—) sementes de soja NT. Corante = nitrato de prata, MM = massa molar.

A sub-fração 3.1 também apresenta uma grande concentração de bandas em torno de 20 kDa, com maior densidade óptica para as sementes de soja NT, e fora da faixa de massa molar pré-estabelecida na cromatografia de exclusão por tamanho (0,4-3,8 kDa).

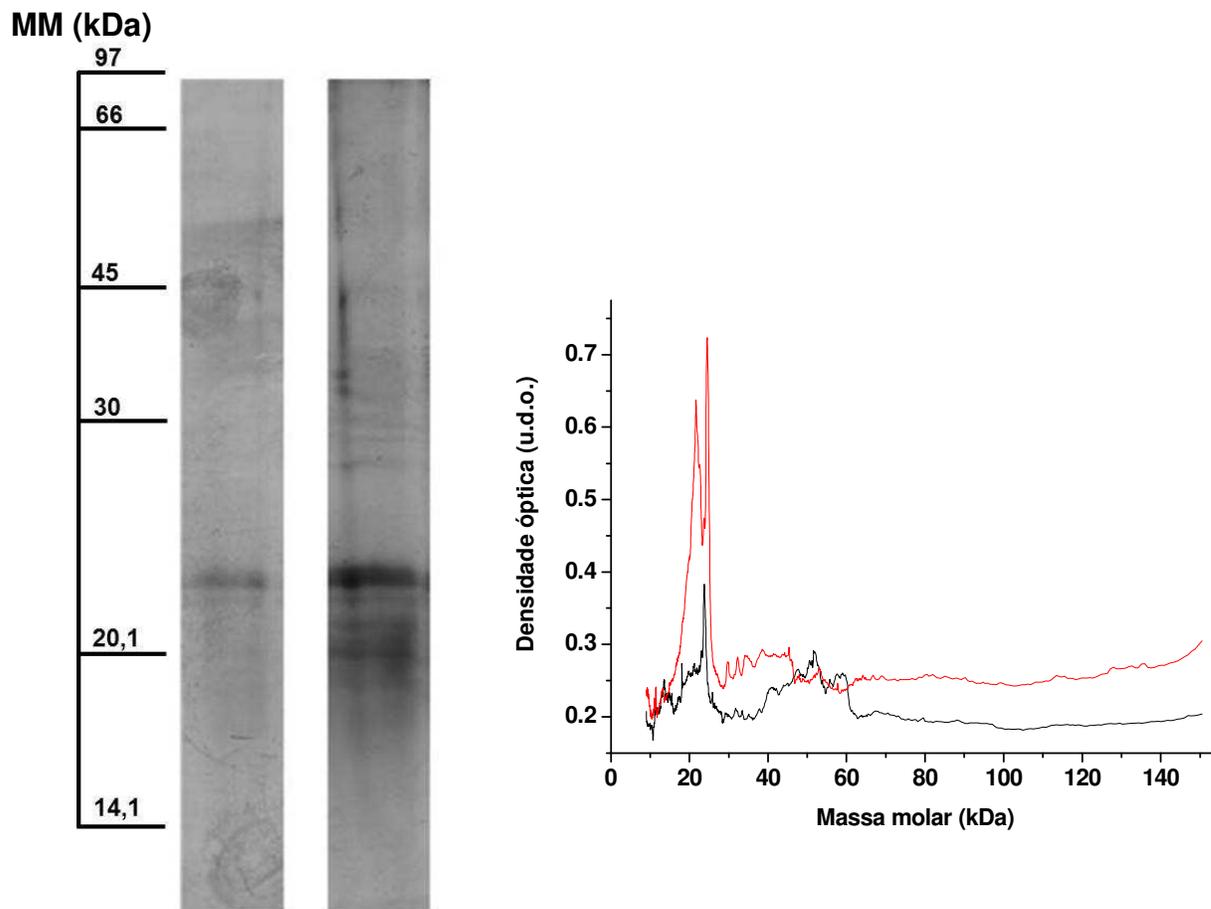


Figura 3.8 – Gel obtido para sub-fração 3.2. O gel da esquerda corresponde a sementes de soja T e o da direita corresponde a sementes de soja NT. O gráfico representa a densidade óptica mostrada pelas bandas do gel. (—) sementes de soja T, (—) sementes de soja NT. Corante = nitrato de prata, MM = massa molar.

Assim como para a sub-fração anterior, na sub-fração 3.2 (Figura 3.8) as sementes de soja NT apresentaram bandas mais concentradas, sendo que nas sementes de soja T somente uma banda é visível, entre 20 e 30 kDa.

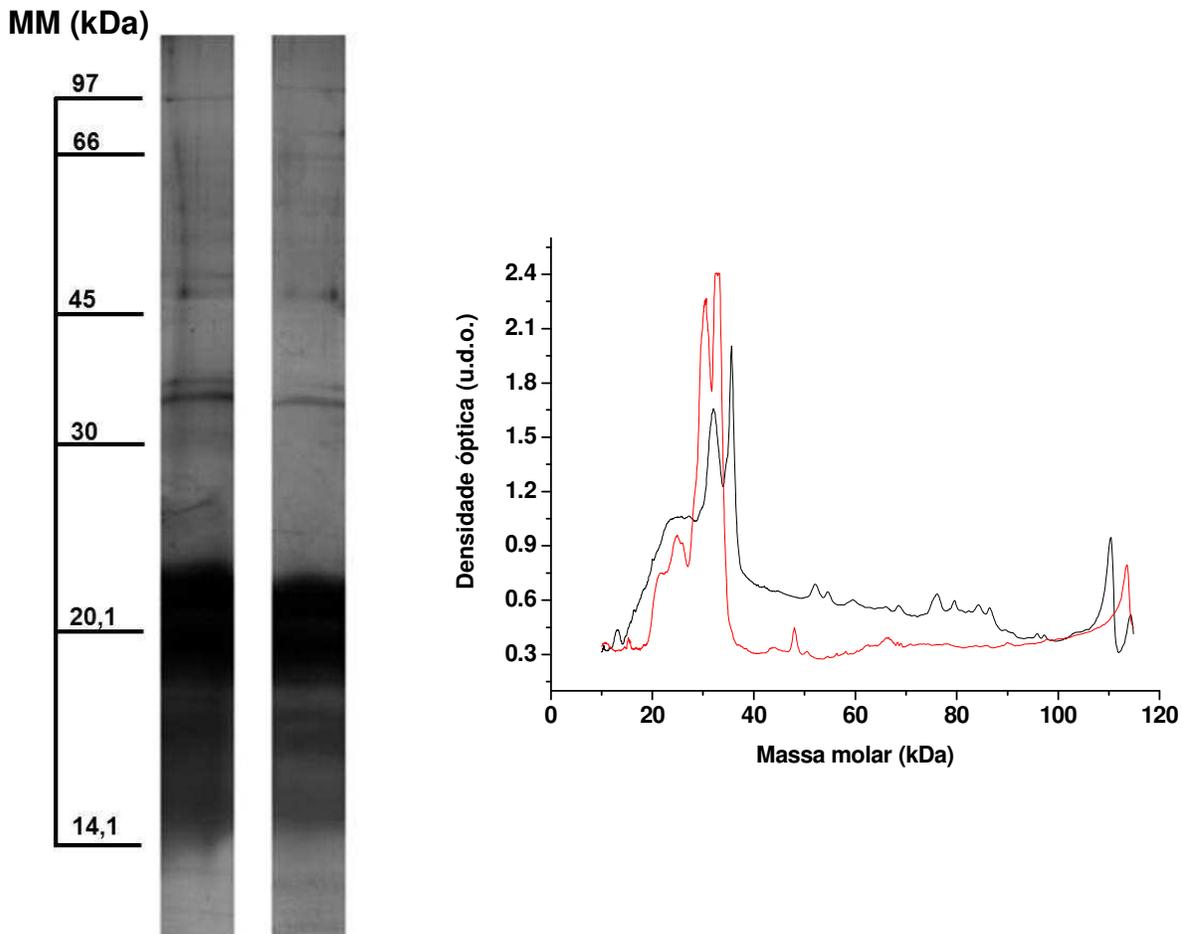


Figura 3.9 - Gel obtido para sub-fração 3.3. O gel da esquerda corresponde a sementes de soja T e o da direita corresponde a sementes de soja NT. O gráfico representa a densidade óptica mostrada pelas bandas do gel. (—) sementes de soja T, (—) sementes de soja NT. Corante = nitrato de prata, MM = massa molar.

Foram separadas 6 bandas na sub-fração 3.3, e assim como na sub-fração 2 a maioria das proteínas desta sub-fração estão concentradas em uma banda em torno de 20 kDa.

Considerando os géis das figuras anteriores, pode-se observar que esta estratégia melhorou a resolução das separações, o que refletiu-se nos resultados apresentados no item 4.5 deste Capítulo.

4.4 Quantificação de metais nas bandas utilizando ICP-MS

As bandas obtidas no gel de eletroforese foram recortadas e digeridas em mini-frascos, conforme procedimentos descritos na seção de materiais e métodos. Como pode ser observado por meio da Figura 3.10, não foi possível recortar todas as bandas obtidas, uma vez que a digitalização da imagem permite uma melhor visualização das bandas, se comparada com visualização a olho nu. Assim, optou-se por recortar aquelas bandas que realmente puderam ser vistas a olho nu, realçadas na Figura 3.10 por retângulos vermelhos.

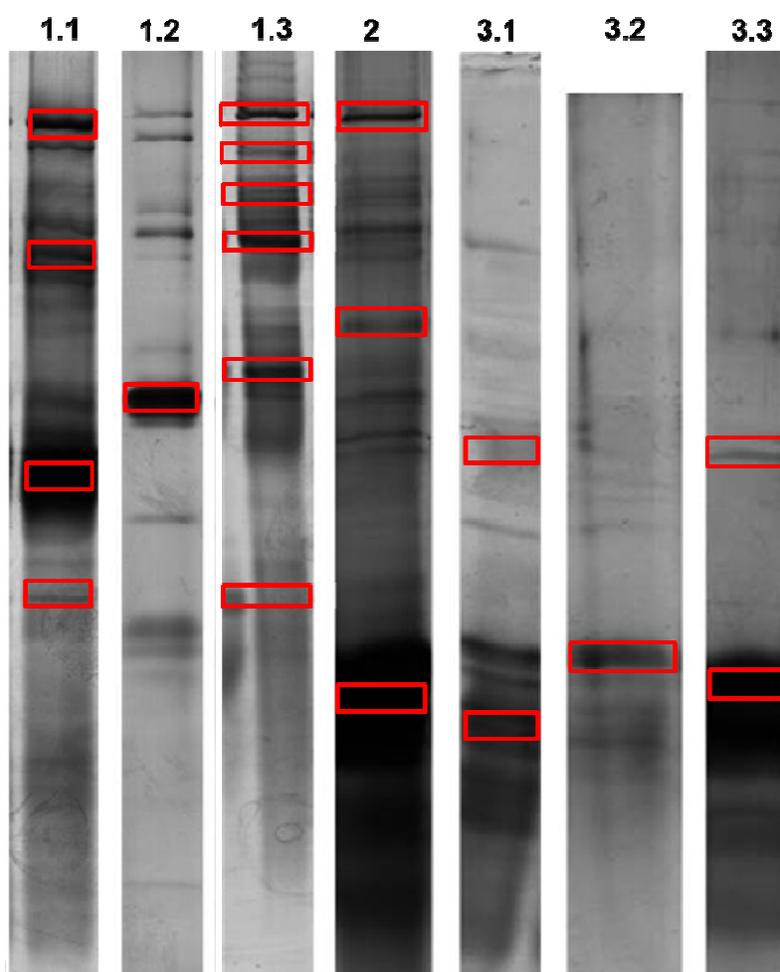


Figura 3.10 – Em vermelho estão em destaque as bandas recortadas para cada uma das sub-frações mencionadas (1.1-3.3). Para apresentação dos resultados, as bandas foram numeradas em ordem crescente, da maior para a menor massa molar.

Os limites de detecção e quantificação encontrados para os elementos estão apresentados na Tabela 3.6. Os analitos foram os mesmos das separações cromatográficas previamente realizadas.

Tabela 3.6 – Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os elementos quantificados utilizando ICP-MS

Elemento	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Co	0,001	0,004
Cu	0,007	0,024
Fe	0,1	0,3
Mg	0,1	0,3
Mn	0,008	0,025
Zn	0,3	1,0

Os analitos quantificados nas diferentes bandas estão mostrados nas tabelas a seguir, destacando que Co, Cu e Mn não foram quantificados em nenhuma das bandas recortadas. As concentrações estão representadas como a concentração estimada dos elementos nas sementes de soja (em $\mu\text{g g}^{-1}$), obtida levando-se em conta quantas vezes as frações foram concentradas antes da terceira dimensão de separação (20 vezes).

Tabela 3.7 – Concentração estimada de Fe nas sementes de soja T e NT (n=3 ± desvio padrão)

Banda	Concentração, $\mu\text{g g}^{-1}$
F1.3 T 1	6,1 ± 0,1
F1.3 NT 1	6,7 ± 0,2
F1.3 T 2	0,8 ± 0,1
F1.3 NT 2	11,8 ± 0,2
F1.3 T 3	2,8 ± 0,2
F1.3 NT 3	8,1 ± 0,1
F1.3 T 4	3,3 ± 0,2
F1.3 NT 4	7,2 ± 0,4
F1.3 NT 5	10,7 ± 0,1
F1.3 NT 6	5,9 ± 0,1

O Fe foi quantificado somente na sub-fração 1.3, tanto em bandas de sementes de soja T quanto de soja NT. Cabe salientar que foi somente nesta sub-fração que um sinal de Fe foi obtido nos estudos anteriores desta Tese, mostrando que este metal está fortemente ligado a proteínas presentes nesta sub-fração. Porém, pode-se notar por meio da Tabela 3.7 que apesar de uma maior concentração de Fe ter sido encontrada nas amostras T, este metal foi mais encontrado nas sementes de soja NT nesse experimento.

Tabela 3.8 – Concentração estimada de Mg nas sementes de soja T e NT (n=3 ± desvio padrão)

Banda	Concentração, $\mu\text{g g}^{-1}$
F1.1 T 4	0,2 ± 0,2
F2 T 3	0,7 ± 0,2
F2 NT 3	0,05 ± 0,04
F3.3 T 1	0,60 ± 0,01
F3.3 NT 1	1,75 ± 0,05
F3.3 T 2	1,31 ± 0,01
F3.3 NT 2	1,05 ± 0,05

O Mg foi quantificado na banda 4 da sub-fração 1.1 das sementes de soja T, onde um sinal para este metal foi observado nos estudos anteriores desta Tese (Capítulo 2, item 5.3). Este metal não foi detectado anteriormente nas outras sub-frações onde o Mg foi quantificado.

Tabela 3.9 – Concentração estimada de Zn nas sementes de soja T e NT (n=3 ± desvio padrão)

Banda	Concentração, $\mu\text{g g}^{-1}$
F1.1 T 2	5,1 ± 0,1
F1.1 NT 3	21,6 ± 0,6
F1.1 T 4	7,5 ± 0,8
F1.3 T 3	28 ± 1
F1.3 T 5	10,0 ± 0,2
F2 T 3	4 ± 1
F2 NT 3	1,5 ± 0,1
F3.3 T 1	4,6 ± 0,5
F3.3 NT 1	4,1 ± 0,2
F3.3 T 2	2,05 ± 0,05
F3.3 NT 2	1,1 ± 0,1

Nos estudos realizados anteriormente (Capítulo 2, item 5.3), Zn foi detectado somente na sub-fração 3.3, dentre as sub-frações onde este metal foi identificado.

4.5 Identificação das proteínas presentes nas bandas

As bandas foram coradas com o corante Comassie Blue, compatível para introdução no espectrômetro de massas, a fim de identificar as proteínas contidas nas bandas. A Figura 3.11 destaca em vermelho as bandas que puderam ser recortadas para posterior identificação de proteínas. Nota-se um perfil diferente dos géis corados com prata devido à diferença em sensibilidade entre os dois corantes.

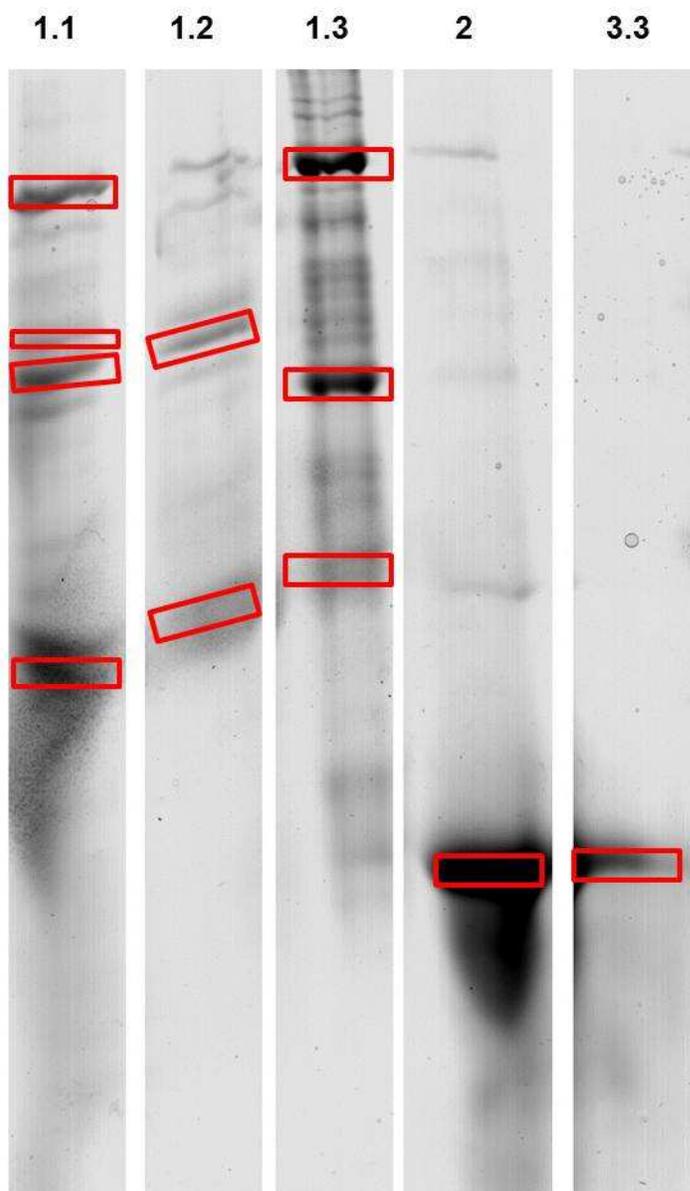


Figura 3.11 – Em vermelho estão em destaque as bandas recortadas para cada uma das sub-frações mencionadas na figura (1.1, 1.2, 1.3, 2 e 3.3) e levadas ao espectrômetro de massas. Para apresentação dos resultados, as bandas foram numeradas em ordem crescente, da maior para a menor massa molar. Coloração = Comassie Blue.

Foram aplicados em torno de 100 μg de proteína em cada poço do gel, devido à menor sensibilidade do corante, porém, nenhuma banda foi corada nas sub-frações 3.1 e 3.2.

As proteínas identificadas estão mostradas na Tabela 3.10, a seguir.

Tabela 3.10 – Proteínas identificadas nas bandas recortadas no gel de eletroforese

Banda	Proteína	MM	Score	Cobertura (%)	Código de acesso
F1.1 1	Chain A, lipoxygenase-3 (soybean) complex with 13(S)-hydroperoxy- 9(Z),11(E)-octadecadienoic acid	97137	273	11	gi 17942578
F 1.1 2	Late embryogenesis abundant protein [<i>Glycine max</i>]	50613	93	7	gi 170010
F 1.1 3	Beta-amylase [<i>Glycine max</i>]	53983	121	6	gi 169913
	Late embryogenesis abundant protein [<i>Glycine max</i>]	50613	101	7	gi 170010
F1.1 4	Chain A, soybean agglutinin complexed with 2,6-pentasaccharide	27555	377	33	gi 6729836
	Trypsin inhibitor subtype A [<i>Glycine max</i>]	24346	311	25	gi 18770
	Unknown [<i>Glycine max</i>]	32097	93	7	gi 255645839
F 1.2 2	Chain A, soybean agglutinin complexed with 2,6-pentasaccharide	27555	325	33	gi 6729836
F1.3 1	RecName: Full=Seed lipoxygenase-1; Short=L-1	94538	482	20	gi 126398
	Chain A, Lipoxygenase-3 (Soybean) Complex With 13(S)-Hydroperoxy- 9(Z),11(E)-Octadecadienoic Acid	97137	174	4	gi 17942578
	Lipoxygenase [<i>Glycine max</i>]	96355	131	3	gi 1262440
	RecName: Full=Seed lipoxygenase-2 (<i>Pisum sativum</i>)	97415	91	3	gi 126402
	RecName: Full=Lipoxygenase (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	84258	65	2	gi 126410
F 1.3 2	Chain A, crystal structures of recombinant and native soybean beta-conglycinin beta homotrimers complexes with n-acetyl-d-glucosamine	47879	718	40	gi 21465628

	Beta-conglycinin beta subunit [<i>Glycine max</i>]	48358	649	40	gi 63852207
	RecName: Full=Beta-conglycinin, beta chain; Flags: Precursor	50578	645	38	gi 121282
	seed storage protein A [<i>Vigna luteola</i>]	49839	76	2	gi 70672850
F 1.3 3	Trypsin inhibitor subtype A [<i>Glycine max</i>]	24346	369	31	gi 18770
F2 1	Trypsin inhibitor subtype A [<i>Glycine max</i>]	24346	464	37	gi 18770
	Kunitz trypsin inhibitor [<i>Glycine tomentella</i>]	23796	74	5	gi 195972725
	24 kDa protein SC24 [<i>Glycine max</i>]	24611	86	10	gi 18448973
F3.3 1	Trypsin inhibitor subtype A [<i>Glycine max</i>]	24346	397	31	gi 18770

Foram identificadas 16 proteínas diferentes, sendo que algumas se repetiram em diferentes sub-frações, como, por exemplo, a *late embryogenesis abundant protein*, identificada na sub-fração 1.2 e 1.3. Como salientado no item 4.3 do capítulo anterior desta Tese, a identificação da mesma proteína em mais de uma fração se justifica pela possível existência de um segundo mecanismo de separação ainda na primeira dimensão cromatográfica, que permitiu a separação da mesma proteína em frações diferentes. Algumas das proteínas identificadas foram atribuídas a outros organismos, porém, com massas molares condizentes com a banda recortada, e obtenção de bons *scores*.

Dentre as proteínas identificadas, foram encontradas 5 lipoxigenases, nas sub-frações 1.1 e 1.3. Esta é uma metaloproteína ligante de ferro que catalisa a hidroxidação de lipídios, e também está envolvida em vários aspectos da fisiologia da planta, tais como crescimento e desenvolvimento, resistência a pestes e respostas a ferimentos na planta [16]. A sub-fração 1.3, como mencionado anteriormente, apresenta o único sinal correspondente a este metal identificado na segunda dimensão cromatográfica [17], além de este ter sido quantificado nas bandas desta mesma sub-fração como mostrado no item anterior desse Capítulo.

A *β -conglycinin*, identificada na sub-fração 1.3, é uma das proteínas mais abundantes da soja, tendo função de estocagem, e pode mascarar o isolamento e caracterização de proteínas menos abundantes [18]. Além disso, é conhecida por se associar ao ácido fítico, que tem grande afinidade por Zn, Fe [19], quantificados na sub-fração em questão, além de outros minerais. Esta proteína já foi identificada como tendo maior intensidade para Fe em sementes de soja T quando utilizando fluorescência de raios-X com radiação síncrotron (SR-XRF) para realização das análises [11].

Além das proteínas mencionadas anteriormente, a β -amylase, identificada na sub-fração 1.1 também é considerada ligante de cátions [20], sendo que Mg e Zn foram quantificados nessa sub-fração.

5. CONCLUSÕES

As sete sub-frações obtidas anteriormente na segunda dimensão cromatográfica (AEX) foram separadas novamente utilizando SDS-PAGE, e as bandas dos géis foram digeridas para a determinação de metais utilizando ICP-MS, sendo que Fe, Mg e Zn foram quantificados nas sub-frações F1.1 F1.3, F2 e F3.3. Cu e Mn não foram quantificados em nenhuma das sub-frações.

Após a análise das bandas por ICP-MS, as proteínas foram identificadas, dentre elas lipoxigenase 1 de semente, lipoxigenase 2 de semente, lipoxigenase 3 de semente, todas metaloproteínas ligantes de Fe, que foram identificadas na sub-fração 1.3, a única fração onde Fe foi encontrado, tanto na segunda quanto na terceira dimensão de separação. Além destas metaloproteínas, beta-conglicina e beta-amilase, conhecidas proteínas ligantes de metais, foram identificadas nas sub-frações 1.1 e 1.3.

Cabe destacar que, apesar do menor número de proteínas identificadas utilizando a eletroforese em gel, se comparado com o item 4.3 do Capítulo anterior desta Tese, a terceira dimensão aumentou o número de metaloproteínas identificadas, de uma para cinco, além de ter identificado outra proteína ligante de cátions. Estes resultados demonstram a complementariedade das técnicas de separação utilizadas nesta Tese.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] S. Magdeldin. Gel electrophoresis – principles and basics, Intech, 1a edição (2012), Nova Iorque, Estados Unidos, 346 p.
- [2] T. Rabilloud, A. R. Vaezzadeh, N. Potier, C. Lelong, E. Leize-Wagner, M. Chevallet. Power and limitations of electrophoretic separations in proteomics strategies, *Mass Spectrom. Rev.* 2009, **28**, 816-843.
- [3] D. Penque. Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry for biomarker discovery, *Proteom. Clin. Applic.* 2009, **3**, 155-172.
- [4] U. K. Laemmli. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature* 1970, **227**, 680-685.
- [5] M. Zhou, L. Yu. Proteomic analysis by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, *Adv. Protein Chem.* 2003, **65**, 57-84.

- [6] L. Valledor, J. Jorrín. Back to the basics: Maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses, *J. Proteom.* 2011, **74**, 1-18.
- [7] E. B. Barbosa, A. Vidotto, G. M. Polachini, T. Henrique, A. B. T. de Marqui, E. H. Tajara. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas, *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2012, **58**, 366-375.
- [8] I. Miller, J. Crawford, E. Gianazza. Protein stains for proteomic applications: *Which, when, why?*, *Proteom.* 2006, **6**, 5385-5408.
- [9] A. Sussulini, Avaliação das alterações protéicas e metaloprotéicas em soja após o processo de modificação genética 2007. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Química da Unicamp.
- [10] A. Sussulini, J. S. Garcia, M. A. Z. Arruda. Microwave-assisted decomposition of polyacrylamide gels containing metalloproteins using mini-vials: An auxiliary strategy for metallomics studies, *Anal. Biochem.* 2007, **361**, 146-148.
- [11] A. Sussulini, G. H. M. F Souza, M. N. Eberlin, M. A. Z. Arruda. Comparative metallomics for transgenic and non-transgenic soybeans, *J. Anal. At. Spectrom.* 2007, **22**, 1501-1506.
- [12] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 1976, **72**, 248-254.
- [13] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels, *Anal. Chem.* 1996, **68**, 850-858.
- [14] A. R. Brandão, H. S. Barbosa, M. A. Z. Arruda. Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds, *J. Proteom.* 2010, **73**, 1433-1440.
- [15] J. S. Garcia, G. H. M. F. Souza, M. N. Eberlin, M. A. Z. Arruda. Evaluation of metal-ion stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves through proteomic changes, *Metallomics* 2010, **1**, 107-113.
- [16] Expasy proteomic server (2011). <http://ca.expasy.org>, acessado em 24 de outubro.
- [17] L. R. V. Mataveli, M. Fioramonte, F. C. Gozzo, M. A. Z. Arruda. Improving metallomics information related to transgenic and non-transgenic soybean seeds using 2D-HPLC-ICP-MS and ESI-MS/MS, *Metallomics* 2012, **4**, 373-378.
- [18] S. S. Natarajan, H. B. Krishnan, S. Lakshman, W. M. Garrett. An efficient extraction method to enhance analysis of low abundant proteins from soybean seed. *Anal. Biochem.*, 2009, **394**, 259-268.
- [19] P. Kwanyuen, J. W. Burton. A simple and rapid procedure for phytate determination in soybeans and soy products, *JAOCS*, 2005, **82**, 81-85.
- [20] Expasy proteomic server (2012). <http://ca.expasy.org>, acessado em 07 de dezembro.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo desta Tese, foi demonstrado que as sementes de soja T e NT mostram diferenças nas concentrações de alguns dos elementos estudados. Esta afirmação foi comprovada por meio de determinações das concentrações totais dos elementos, além da análise de diversas frações separadas das sementes. Quanto às frações bioacessíveis de Cu, Fe, Mn, S e Zn, estas mostraram diferenças estatísticas entre as duas amostras, sendo as sementes de soja T possuem frações apresentando maiores concentrações destes elementos.

As separações utilizando exclusão por tamanho acoplada ao ICP-MS permitiram a identificação de 3 frações que apresentaram metais, que, após a segunda dimensão cromatográfica (utilizando cromatografia de troca aniônica), foram divididas em 7 sub-frações. Dentre as proteínas presentes nas sub-frações foi identificada uma metaloproteína ligante de Fe (lipoxigenase 1) na sub-fração onde este elemento foi localizado anteriormente por meio das separações cromatográficas.

As 7 sub-frações, separadas novamente utilizando SDS-PAGE, e as bandas obtidas foram analisadas por ICP-MS, sendo que Fe, Mg e Zn puderam ser quantificados. As proteínas identificadas, dentre elas lipoxigenase 1 de semente, lipoxigenase 2 de semente, lipoxigenase 3 de semente, todas metaloproteínas ligantes de Fe, foram identificadas na sub-fração 1.3, a única fração onde Fe foi encontrado, tanto na segunda quanto na terceira dimensão de separação. Além destas metaloproteínas, beta-conglicinina e beta-amilase, conhecidas proteínas ligantes de metais, foram identificadas nas sub-frações 1.1 e 1.3. Cabe destacar que a terceira dimensão aumentou o número de metaloproteínas identificadas, de uma para cinco, além de ter identificado outra proteína ligante de cátions. Estes resultados demonstram a complementariedade das técnicas de separação utilizadas nesta Tese.

A combinação de HPLC e 1D-PAGE melhorou os resultados obtidos neste estudo, o que refletiu-se nas metaloproteínas e proteínas metal-ligantes identificadas. Ainda, os resultados deste trabalho permitiram ampliar as informações sobre o metaloma das sementes soja T e NT, dando continuidade aos trabalhos já realizados pelo Grupo de Espectrometria, Preparo de Amostras e Mecanização (GEPAM), e abrindo possibilidades para a identificação de possíveis marcadores fisiológicos do processo de modificação genética das sementes de soja.